

Importancia del etileno en el desarrollo y maduración del albaricoque (*Prunus armeniaca* L. cv Búlida).

A. AMOROS, M. SERRANO, F. RIQUELME y F. ROMOJARO*

IMPORTANCE OF ETHYLENE IN THE DEVELOPMENT AND RIPENING OF THE APRICOT (*PRUNUS ARMENIACA* L. CV. BULIDA).

A. AMOROS, M. SERRANO, F. RIQUELME and F. ROMOJARO.
Fruits, Mar. 1989, vol. 44, nº 3, p.171-175.

ABSTRACT - The physiological evolution is studied during the development and ripening of the Bulida apricot, presenting, on the basis of the ethylene emission level and respiratory activity, three distinct stages. The evolution of ACC and MACC levels and EFE activity is also studied, and it is concluded that what seems to influence the control of ethylene production most in the apricot ripening process is EFE activity, as it presents a peak parallel to the ethylene climacteric peak, while ACC levels are already high at the preclimacteric stage.

IMPORTANCE DE L'ETHYLENE DANS LE DEVELOPPEMENT ET LA MATURATION DE L'ABRICOT (*PRUNUS ARMENIACA* L. CV. BULIDA).

A. AMOROS, M. SERRANO, F. RIQUELME et F. ROMOJARO.
Fruits, Mar. 1989, vol. 44, nº 3, p.171-175.

RESUME - Etude de l'évolution physiologique pendant le développement et la maturation de l'abricot Bulida qui présente trois étapes bien différentes selon le niveau d'éthylène dégagé et selon son activité respiratoire. L'évolution des niveaux d'ACC et MACC et de l'activité EFE est analysée ; on en déduit que pendant la maturation de l'abricot l'activité EFE semble avoir une influence plus importante sur le contrôle de la production d'éthylène étant donné qu'elle présente un sommet parallèle au sommet climactérique de l'éthylène alors que les niveaux d'ACC sont plus élevés que dans l'état préclimactérique.

INTRODUCCION

Los frutos climatéricos experimentan durante su maduración un aumento en la tasa respiratoria (BIALE, 1960), acompañado de un incremento en la producción de etileno, hormona que desempeña un papel esencial en el inicio de dicho proceso, así como en otros fenómenos que hacen que el fruto adquiera sus características organolépticas óptimas para el consumo (McGLASSON *et al.*, 1978). Actualmente se admite que el etileno es sintetizado en los tejidos vegetales a partir del aminoácido metionina, vía S-adenosilmetionina (SAM) y del ácido 1-aminociclopropa-1-carboxílico (ACC) como intermediarios (ADAMS y YANG, 1979). El ACC tiene otra vía metabólica alternativa que es su conjugación, fundamentalmente con malonil-CoA, para formar malonil-ACC (MACC) (HOFFMAN *et al.*, 1983).

A pesar de la gran importancia económica en nuestro país del albaricoque, considerado climatérico por presentar crisis respiratoria y etilénica (BIALE y YANG, 1981), no

se ha abordado todavía de forma sistemática el estudio de ambos procesos. Ante estas circunstancias nos parece de gran interés el estudio de la crisis respiratoria y etilénica de esta especie frutícola, así como el análisis de los cambios que sufren el precursor del etileno (ACC), su conjugado (MACC) y el enzima responsable de la transformación de ACC en etileno (EFE), durante el desarrollo y maduración del albaricoque en el árbol.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal.

Los albaricoques (*Prunus armeniaca*, cv. Búlida) fueron recolectados de 20 árboles fisiológicamente normales, situados en la finca experimental de Molina de Segura (Murcia). Los muestreos se realizaron periódicamente a partir del día 46 desde el cuaje del fruto, recolectándose 100 frutos (5 frutos/árbol), en base a su tamaño, tomando como referencia 100 frutos que habían sido marcados en el momento del cuaje y que sirvieron de control para todos los muestreos.

* - Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura
Avda. de La Fama, 1 - 30003 MURCIA, Spain.

Medidas de desprendimiento de etileno y CO₂.

La producción de etileno y CO₂ de los frutos enteros se determinó inmediatamente después de ser recolectados. Treinta frutos se introdujeron en grupos de cinco en recipientes de cristal calibrados, provistos de cierre hermético con septum de silicona, a través del cual se extraía una muestra de la atmósfera al cabo de 1 h de estar los frutos confinados en ellos. La cuantificación del etileno se realizó inyectando 1 ml de esta atmósfera en un cromatógrafo Hewlett-Packard, modelo 5890, con detector de ionización de llama y columna de acero inoxidable de 3 m de longitud y 1/8" de diámetro interno, con relleno de alúmina activada de 80/100 mesh. El CO₂ se cuantificó a partir de 1 ml de la misma atmósfera en un analizador de infrarrojos Beckman.

Determinación de ACC y MACC.

La extracción de ACC se realizó según APELBAUM *et al.* (1981). El tejido liofilizado se homogeniza con etanol al 80 % en proporción 1:20 (p/v). El homogenizado se somete a ebullición con reflujo durante 15 minutos y se concentra en rotavapor para eliminar el alcohol. El residuo se lleva a 10 ml con agua destilada y se cuantifica el ACC libre presente en el extracto según LIZADA y YANG (1979). La extracción del MACC se realiza mediante hidrólisis ácida del extracto con ClH 6N durante 25 minutos a 120°C (MANSOUR *et al.*, 1982). El hidrolizado se neutraliza con NaOH y se usa para cuantificar el ACC presente según LIZADA y YANG (1979). El ACC así cuantificado es el ACC total, y del MACC se calcula por diferencia con el ACC libre cuantificado antes de la hidrólisis.

Medidas de la actividad EFE.

La actividad EFE se determina midiendo la conversión de ACC a etileno *in vivo*. Discos de pericarpio de albaricoque se colocan en viales de 25 ml conteniendo 3 ml de tampón HEPES-TRIS 25 mM pH 7.5 con y sin ACC 1 mM. Los viales se cierran herméticamente con septum y se mide el etileno acumulado al cabo de 2 h. La actividad EFE se expresa como nl de etileno procedentes de la incubación con ACC-exógeno, producidos por gramo de tejido el cabo de dos horas de incubación.

RESULTADOS Y DISCUSION

Producción de etileno y actividad respiratoria durante el desarrollo y maduración del albaricoque Búlida.

La producción de etileno del albaricoque Búlida es muy baja durante los primeros 60 días desde el cuaje del fruto, del orden de 0.5 nl/g x h. Durante los siete días siguientes la tasa de producción de etileno aumenta ligeramente, alcanzando valores de 1.0 nl/g x h y posteriormente, aumenta de forma muy acusada hasta alcanzar el máximo climatérico con valores de 6 nl/g x h, a los 74 días del cuaje del fruto. Finalmente se observa una disminución de la producción de etileno (figura 1), indicativa de que se han iniciado en el fruto los procesos de senescencia (YANG y HOFFMAN, 1984).

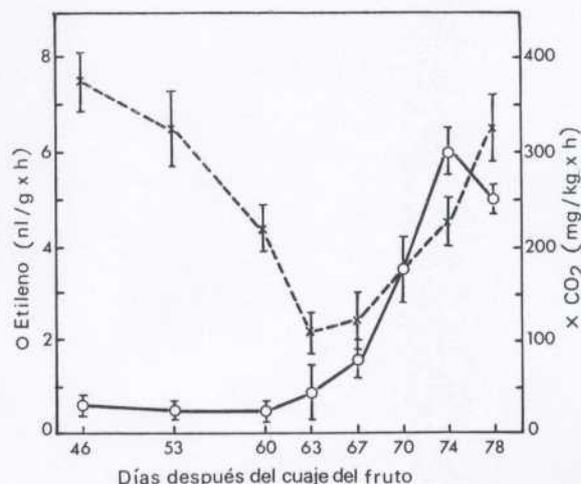


FIGURA 1 - Tasa de producción de etileno (o) y actividad respiratoria (x) del albaricoque Búlida a lo largo de su desarrollo y maduración, medido en días desde el cuaje del fruto. Cada punto corresponde a la media $\pm \sigma$ de las medidas efectuadas en 10 frutos individuales.

La actividad respiratoria expresada en mg de CO₂ desprendidos por kg de fruto y por hora, es muy elevada en los dos primeros muestreos (figura 1). Estas altas tasas de respiración se ha demostrado que están asociadas con divisiones celulares rápidas, que se producen en la fase más temprana del desarrollo del fruto y requieren un gran gasto energético (DONNEL y BECK, 1945 ; BEATTY, 1946). Posteriormente, conforme avanza el desarrollo del fruto la actividad respiratoria desciende alcanzando un mínimo los días 60 y 63. Finalmente, la tasa de respiración aumenta progresivamente siendo máxima en el último muestreo, con valores de 325 mg CO₂/Kg x h. Así pues, se comprueba que el albaricoque Búlida posee el comportamiento típico de los frutos climatéricos, los cuales presentan durante su maduración un aumento en la producción de etileno acompañado de un pico en la actividad respiratoria (LESHEM *et al.*, 1986).

El hecho de que el pico de etileno preceda, sea simultáneo o posterior al pico respiratorio, parece ser una característica de cada especie de frutos climatéricos, encontrándose ejemplos de cada uno de estos casos (BIALE y YOUNG, 1981), e incluso existen diferencias entre variedades de un mismo fruto ; así por ejemplo, en albaricoque de la variedad Moopark la crisis respiratoria y etilénica coinciden temporalmente (REID, 1975), mientras que en la variedad Búlida, estudiada en el presente trabajo, el máximo en la tasa de desprendimiento de etileno precede al máximo en la actividad respiratoria (figura 1).

En base a la tasa de producción de etileno y a la actividad respiratoria se pueden distinguir tres etapas en el desarrollo y maduración del albaricoque Búlida :

- una primera etapa en la que la producción de etileno es muy baja y la actividad respiratoria elevada y comprende hasta el día 53 desde el cuaje del fruto ;
- una segunda etapa, que comprende los diez días siguientes

tes, en la que la producción de etileno aumenta ligeramente y la actividad respiratoria desciende hasta alcanzar un mínimo ;

- una tercera etapa en la que se produce el máximo climático tanto en la tasa de producción de etileno como en la actividad respiratoria y que comprendería desde el día 63 hasta la total madurez del fruto.

Estas tres etapas se corresponden con las encontradas al analizar la evolución de los parámetros físico-químicos a lo largo del desarrollo y maduración de estos frutos (AMOROS *et al.*, 1989). Las dos primeras etapas representarían el período de desarrollo del fruto, con grandes modificaciones de los parámetros físico-químicos y reducida producción de etileno, mientras que la tercera etapa, correspondería al período de maduración, con menores transformaciones en la composición química de los frutos, siendo más acusados los cambios físicos referentes al color y a la dureza y en el que se desencadena la producción autocatalítica de etileno. Debemos destacar que a los 67 días al fruto ya ha alcanzado su tamaño definitivo y ha comenzado la producción de etileno, por tanto, podría recolectarse a partir de este momento y gracias a la síntesis autocatalítica de etileno la maduración progresaría de forma normal, adelantándose el momento de la recolección 10 días.

Niveles de ACC y MACC durante el desarrollo y maduración del albaricoque Búlida.

A los 46 días desde el cuaje del fruto los niveles de ACC y MACC son muy elevados, 0.54 y 24 nmoles/g de peso fresco, respectivamente. Posteriormente ambos niveles descienden hasta llegar al día 60, a partir del cual los niveles de ACC aumentan y alcanzan un máximo el día 70 y los de MACC disminuyen y permanecen en niveles de 9 nmoles/g, unas tres veces menor que el encontrado en el día 46. A partir del día 74 tanto el ACC como el MACC aumentan de nuevo (figura 2).

Puede observarse que la crisis climática está precedida de un aumento en los niveles de ACC, el cual será transformado en etileno, mientras que durante este período los niveles de MACC disminuyen. Estos datos indican que el enzima responsable de la conjugación del ACC puede ser un factor muy importante para regular la producción de etileno en el albaricoque, al igual que ocurre en otros frutos climatéricos (YANG y HOFFMAN, 1984), ya que los niveles de MACC disminuyen cuando la producción de etileno aumenta, momento en el que se necesita disponer de ACC en su forma libre para ser transformado en etileno. Estas consideraciones concuerdan con la propuesta efectuada por otros investigadores (AMRHEIN *et al.*, 1982 ; YANG *et al.*, 1982 ; HOFFMANN *et al.*, 1983) en el sentido que el MACC es un producto final, biológicamente inactivo para eliminar el exceso de ACC más que una forma de almacenamiento del precursor del etileno.

Por otra parte, observamos que los niveles de ACC, tanto libre como conjugado, son muy elevados desde estados muy tempranos del desarrollo del fruto (figura 2) lo cual indica que el enzima ACC-sintetasa ya está activo en este momento. Por el contrario en otros frutos climatéricos como el aguacate la actividad ACC-sintetasa es muy baja durante el estado preclimático y aumenta significativa-

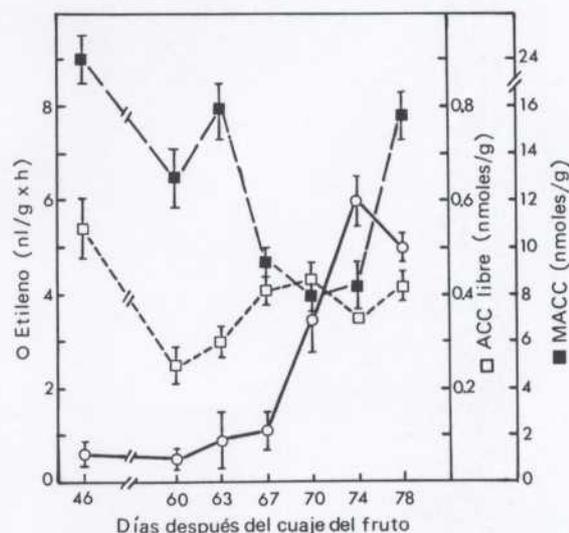


FIGURA 2 - Relación entre la tasa de producción de etileno (o) y los niveles de ACC libre (□) y ligado (MACC) (■) a lo largo del desarrollo y maduración del albaricoque Búlida. La producción de etileno se mide en 10 frutos individuales y posteriormente son utilizados para la extracción y cuantificación del ACC y MACC, realizándose cada una de ellas por triplicado, y siendo los datos representados la media \pm SE de dichas determinaciones.

mente un día antes del aumento climático en la producción de etileno (SITRIT *et al.*, 1986). De igual forma los niveles de ACC y ACC-sintetasa son muy bajos en tomates preclimáticos y sólo aumentan durante la maduración (KENDE y BOLLER, 1981). También en manzanas es la disponibilidad de ACC la que limita la producción de etileno (MANSOUR *et al.*, 1986). Sin embargo en los albaricoques la disponibilidad de ACC no es el factor limitante que controla la producción de etileno, ya que durante la primera etapa del desarrollo del fruto existe ACC en forma libre y no se produce etileno. Estas diferencias en cuanto a la regulación de la biosíntesis de etileno en diferentes tejidos vegetales también han sido puestas de manifiesto por otros investigadores (ROMOJARO *et al.*, 1986).

Actividad EFE a lo largo del desarrollo y maduración del albaricoque Búlida.

La actividad EFE se determinó «*in vivo*» como la capacidad del tejido de transformar ACC exógeno en etileno. En la figura 3 se puede observar que la actividad EFE es muy baja hasta los 60 días desde el cuaje del fruto y a partir de este momento presenta un pico paralelo al pico climático de producción de etileno (figura 3). La actividad EFE en el tejido preclimático es de 0.2 nl/g x h y pasa a ser en el tejido climático de 2.85 nl/g x h, lo que indica que se multiplica por un factor de diez, aproximadamente. Si hacemos la misma observación para la tasa de producción de etileno comprobamos que también aumenta unas diez veces desde el estado preclimático hasta el climático (figura 3). Por tanto, el hecho de que durante los primeros días desde el cuaje del fruto la producción de etileno sea muy baja (figura 1) a pesar de que los

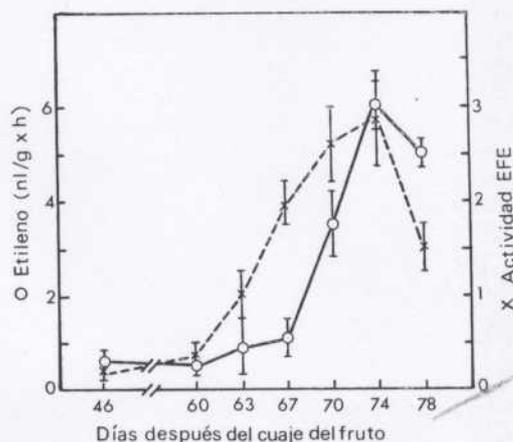


FIGURA 3 - Relacion entre la tasa de producción de etileno (o) y la actividad EFE (x) a lo largo del desarrollo y maduración del albaricoco Bulida. En cada muestra la actividad EFE se determino por triplicado en secciones de tejido procedentes de tres frutos diferentes, representándose la media \pm SE de tales determinaciones.

niveles de ACC son elevados (figura 2) puede explicarse en base a que la actividad EFE es muy escasa durante este período (figura 3). Por su parte, el aumento climatérico en la producción de etileno también podría atribuirse a la actividad EFE, ya que tanto EFE como etileno aumentan unas diez veces.

Durante el estado postclimatérico la producción de etileno decae mientras que los niveles de ACC aumentan ligeramente y los de MACC se duplican (figura 2). Por su parte, la actividad EFE en este estado disminuye y es un 50 % más baja que la encontrada en el máximo climatérico (figura 3). Con estos resultados podemos proponer que en el estado postclimatérico la producción de etileno no decae porque no haya ACC disponible, sino por disminución de la actividad EFE, posiblemente a causa de los daños que sufren las membranas celulares en tejidos tan senescentes (MAYAK *et al.*, 1981 ; YANG *et al.*, 1984).

Por tanto se observa que durante la maduración del albaricoco Bulida es la actividad EFE la que parece tener mayor influencia en el control de la producción de etileno. Mientras que en otros sistemas climatéricos, tanto frutos como ciertos tipos de flores como el clavel, son ACC-sintetasa y EFE, conjuntamente las que regulan la producción de etileno, ya que ambas presentan un pico en su actividad paralelo al pico de producción de etileno (YANG *et al.*, 1984 ; SITRIT *et al.*, 1986).

AGRADECIMIENTOS

Los autores reconocen la colaboración de I. MONTOYA, I. MORATILLA y C. SAURA en la realización de parte de las experiencias de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ADAMS (D.O.) and YANG (S.F.). 1976.
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.
- AMOROS (A.), SERRANO (M.), RIQUELME (F.) y ROMOJARO (F.). 1989.
Cambios físicoquímicos durante el desarrollo y maduración del albaricoco (*Prunus armeniaca* L. cv. Búliida).
Rev. Agroq. y Tec. de Alim., (en prensa).
- AMRHEIN (N.), BREUING (F.), EBERLE (J.), SKORUPKA (M.) and TOPHOF (S.). 1982.
The metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid.
In: *Plant Growth Substances*. (Ed.) P.F. Wareing, p. 249-258. London Academic.
- APELBAUM (A.), BURGOON (A.C.), ANDERSON (J.D.), SOLOMOS (T.) and LIEBERMAN (M.). 1981.
Some characteristics of the System Converting 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene.
Plant Physiol., 67, 280-284.
- BIALE (Y.B.). 1960.
in: *Encyclopaedia of plant physiology*, vol. 12.
(Ed.) Springer-Verlag, Berlin, p. 536-592.
- BIALE (J.B.) and YOUNG (R.A.). 1981.
In: *Recent advances in the biochemistry of fruits and vegetables*. (Ed.) M.J.C. Rodhes and J. Friend. Academic Press. London, p.1-39.
- HOFFMAN (M.E.), FU (J.R.) and YANG (S.F.). 1983.
Identification and metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in germinating peanut seeds.
Plant Physiol., 71, 197-199.
- KENDE (H.) and BOLLER (T.). 1981.
Wound ethylene and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in ripening tomato fruit.
Planta, 154, 476-481.
- LESHEM (Y.Y.), HALEVY (A.H.) and FRENKEL (C.). 1986.
In: *Processes and control of plant senescence*. Elsevier Science Publishers, B.V. Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo.
- LIZADA (M.C.C.) and YANG (S.F.). 1979.
A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid.
Anal. Biochem., 100, 140-145.
- MANSOUR (R.), LATCHE (A.) et PECH (J.C.). 1982.
Extraction et dosage de l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique précurseur de l'éthylène dans la pomme Golden delicious.
Fruits, 37 (2), 785-791.
- MANSOUR (R.), LATCHE (A.), VAILLANT (V.), PECH (J.C.) and REID (M.S.). 1986.
Metabolisms of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in ripening apple fruits.
Physiol. Plant., 66 (3), 495-502.
- MAYAK (S.), LEGGE (R.L.) and THOMPSON (J.E.). 1981.
Ethylene formation from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid by microsomal membranes from senescing carnations flowers.
Planta, 153, 49-55.
- McGLASSON (W.B.), WADE (N.L.) and ADATO (I.). 1978.
In: *Phytohormones and related compounds*, vol. II. Elsevier, p. 447-491.
- MONET (R.), BASTARD (Y.) et CAMPOY (B.). 1974.
Etude de la variation de la dureté du fruit *in situ* chez le pêcher.
Ann. Rev. Agric., 23 (1), 39-50.
- REID (M.S.). 1975.
Facteurs et régulation de la maturation des fruits.
Coll. Int. CNRS n° 238. (Ed.) R. Ulrich, p. 177-182.
- ROMOJARO (F.), VAILLANT (V.), LATCHE (A.) et PECH (J.C.). 1986.
Influencia de los D-aminoácidos en la malonización del ácido 1-aminocyclopropano-1-carboxílico (ACC) y sobre la síntesis de etileno en manzana.
Rev. Agroq. Y Tec. de Alim., 26 (2), 213-218.
- SITRIT (Y.), RIOV (J.) and BLUMENFELD (A.). 1986.
Regulation of ethylene biosynthesis in avocado fruit during ripening.
Plant Physiol., 81, 130-135.
- YANG (S.F.) and HOFFMAN (N.E.). 1984.
Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants.
Ann. Rev. Plant Physiol., 35, 155-189.

BEDEUTUNG VON ÄTHYLEN BEI ENTWICKLUNG UND REIFEN DER ABRIKOSE (*PRUNUS ARMENIACA* L. CV. BULIDA).

A. AMOROS, M. SERRANO, F. RIQUELME und F. ROMOJARO.

Fruits, Mar. 1989, vol. 44, nº 3, p. 171-175.

KURZFASSUNG - Studium der physiologischen Entwicklung der Aprikose Bulida bis zur Reife mit drei klar differenzierten Etappen, je nach dem freigesetzten Äthylenaufkommen und nach der Atmungs-tätigkeit der Frucht. Die Entwicklung der ACC- und MACC-Werte sowie der EFE-Aktivität wird untersucht. Man gelangt zu dem Schluss, dass die EFE-Aktivität während des Reifeprozesses offenbar die Kontrolle der Äthylenproduktion stärker beeinflusst, da ihr Spitzenwert parallel zum klimakterischen Spitzenwert des Äthylens verläuft, während die ACC-Werte höher ausfallen als im vorklimakterischen Zustand.

IMPORTANCIA DEL ETILENO EN EL DESARROLLO Y MADURACIÓN DEL ALBARICOQUE (*PRUNUS ARMENIACA* L. CV. BULIDA).

A. AMOROS, M. SERRANO, F. RIQUELME y F. ROMOJARO.

Fruits, Mar. 1989, vol. 44, nº 3, p. 171-175.

RESUMEN - Se estudia la evolución fisiológica durante el desarrollo y maduración del albaricoque Bulida, el cual presenta, en base al nivel de etileno emitido y a su actividad respiratoria, tres etapas bien diferenciadas. Por otra parte, también se analiza la evolución de los niveles de ACC y MACC y de la actividad EFE, concluyéndose que en la maduración del albaricoque es la actividad EFE la que parece tener mayor influencia en el control de la producción de etileno, ya que presenta un pico paralelo al pico climatérico de etileno, mientras que los niveles de ACC ya son elevados en el estado preclimaterico.

