

Biosynthèse et mode d'action de l'hormone végétale éthylène

A LATCHÉ
R AYUB
G MARTINEZ
M GUIB
M BEN AMOR
C ROMBALDI
JC PECH
M BOUZAYEN
École nationale supérieure
agronomique
UA INRA Éthylène
et maturation des fruits
145, av de Muret
31076 Toulouse
France

Reçu : avril 1995
Accepté : janvier 1996

Biosynthèse et mode d'action de l'hormone végétale éthylène.

RÉSUMÉ

L'éthylène est une hormone végétale qui intervient dans de nombreux aspects du développement des plantes, en particulier dans la maturation des fruits climactériques. Sa voie de biosynthèse inclut les étapes suivantes: S-adenosyl-méthionine → acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC) → éthylène. Ces étapes sont catalysées par l'ACC synthétase et l'ACC oxydase. L'ACC peut, par ailleurs, être converti en malonyl ACC par l'ACC N-malonyltransférase. Les gènes codant pour l'ACC synthétase et l'ACC oxydase ont été isolés et caractérisés, permettant ainsi la manipulation génétique de la biosynthèse de l'éthylène. Des fruits dont la production d'éthylène est inhibée par des ARN antisens de l'ACC synthétase et de l'ACC oxydase ont été obtenus. Des découvertes importantes ont été faites récemment sur la voie de perception et de transduction du signal éthylène. Une protéine réceptrice de l'éthylène a été caractérisée et de nouveaux antagonistes d'action de l'éthylène ont été conçus.

MOTS CLÉS

Fruit, maturation, hormone, biosynthèse, éthylène, activité enzymatique, inhibiteur d'enzyme, biocatalyseur, métabolisme des protéines, antagonisme d'hormone.

Biosynthesis and action of the plant hormone ethylene.

ABSTRACT

Ethylene is a plant hormone which is involved in many aspects of plant development, including ripening of climacteric fruits. Its biosynthetic pathway involves the following steps: S-adenosyl-methionine → 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) → ethylene. These steps are catalyzed ACC synthase and ACC oxidase. ACC can also be converted into malonyl-ACC by the ACC N-malonyltransferase. Genes encoding ACC synthase and ACC oxidase have been isolated and characterized thus allowing genetic manipulation of ethylene biosynthesis. Fruits in which ethylene production has been inhibited by antisense ACC synthase and ACC oxidase genes have been obtained. Important discoveries have been made recently on the ethylene perception and transduction pathway. The ethylene receptor protein has been characterized and new chemical antagonists have been devised.

KEYWORDS

Fruit, ripening, hormones, biosynthesis, ethylene, enzymatic activity, enzyme inhibitors, biocatalysts, protein metabolism, hormone antagonists.

Biosíntesis y su modo de acción de la hormona vegetal etileno.

RESUMEN

El etileno es una hormona vegetal que interviene en numerosos aspectos del desarrollo de las plantas, particularmente en la maduración de frutos climactericos. Su ruta de biosíntesis incluye las siguientes etapas: S-adenosil-metionina → ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) → etileno. Estas etapas están catalizadas por la ACC sintetasa y la ACC oxidasa. Por otro lado, el ACC puede ser convertido en malonil-ACC por acción de la ACC N-malonyltransferasa, enzima que, por el momento, se encuentra poco caracterizada. Los genes codificantes para la ACC sintetasa y la ACC oxidasa han sido aislados y caracterizados, permitiendo, de este modo, la manipulación genética de la biosíntesis del etileno. Se han obtenido frutos en los que la producción de etileno se encuentra inhibida por ARNs antisentido de la ACC sintetasa y de la ACC oxidasa. Recientemente se han llevado a cabo importantes descubrimientos sobre la ruta de percepción del etileno y la transducción de la señal. Se ha caracterizado una proteína receptora del etileno y se han sintetizado nuevas antagonistas de acción del etileno.

PALABRAS CLAVES

Fruto, maduramiento, hormonas, biosíntesis, etileno, actividad enzimática, inhibidores de enzimas, biocatalyseur, métabolismo proteico, antagonistas de las hormonas.

● introduction

Cette revue vise à faire le point des connaissances acquises en matière de biosynthèse et de mode d'action de l'éthylène, hormone végétale jouant un rôle important dans plusieurs phases du développement des plantes, en particulier au cours de celle de la maturation des fruits.

NELJUBOW (1901) a été le premier à montrer que l'éthylène présent dans les gaz d'éclairage avait des effets sur la croissance des plantes. Plus tard, DENNY (1924) a démontré que l'éthylène était également l'élément actif des gaz de combustion d'hydrocarbures utilisés pour le déverdissement des agrumes. La démonstration que les tissus végétaux émettent de l'éthylène a été réalisée pour la première fois sur des fruits en maturation par GANE (1934). Depuis, l'intervention de cette phytohormone a été décrite dans de nombreuses phases du développement des plantes : germination, embryogenèse, croissance des racines, tiges et feuilles, abscission et sénescence des feuilles, maturation des fruits (tableau I). Dans certains cas l'éthylène peut avoir des effets opposés selon l'espèce végétale considérée (élongation des tiges et des racines, par exemple). Les raisons de ces effets opposés sont peu connues.

Par ailleurs, il est maintenant bien établi que certains effets des auxines, la stimulation de l'abscission par exemple, sont dus à l'éthylène dont la synthèse est stimulée par l'auxine (MORGAN et HALL, 1964). Les interactions entre hormones jouent donc un rôle important dans le développement des végétaux, mais les mécanismes impliqués dans ces interactions sont encore peu connus.

La synthèse d'éthylène est fortement stimulée au cours d'agressions extérieures subies par les plantes (tableau II). Cela pourrait faire penser à un mécanisme d'adaptation ou de défense. Ainsi, l'irritation tactile de tiges, en stimulant la production d'éthylène, entraîne une réduction de croissance appelée thigmomorphogenèse (BOYER, 1967). De même, l'anaérobiose racinaire provoque l'épinastie des feuilles situées à la base des tiges (JACKSON et CAMPBELL, 1976 ; BRADFORD et YANG, 1980). Dans les autres types d'agressions, la réponse morphogénétique n'est pas observable macroscopiquement. Cependant, comme dans les cas cités précédemment, de profondes modi-

fications biochimiques ont lieu à la suite de l'induction de la synthèse d'enzymes telles que la phénylalanine ammonia lyase impliquée dans la synthèse de phénols ou la chitinase impliquée dans la dégradation de la paroi des agents pathogènes. L'éthylène intervient donc, comme il est montré plus loin, au niveau moléculaire dans l'expression de certains gènes par l'intermédiaire d'une chaîne de transduction de signaux. Plusieurs ouvrages généraux récents ou revues font le point sur les effets physiologiques de l'éthylène et/ou sur son mode d'action (YANG et HOFFMAN, 1984 ; MATTOO et SUTTLE, 1991 ; ABELES *et al*, 1992 ; PECH *et al*, 1993 ; KENDE, 1993 ; THEOLOGIS, 1993 ; ZAREMBINSKI et THEOLOGIS, 1994).

L'éthylène suscite un grand intérêt économique puisqu'il intervient dans plusieurs secteurs de la production agricole en particulier dans le contrôle de la maturation des fruits (PECH *et al*, 1994), la modulation de la croissance des tiges et la maîtrise de l'abscission. Une connaissance approfondie de la voie de biosynthèse de l'éthylène et de sa régulation s'avère indispensable pour le contrôle de ces processus.

● voie de biosynthèse de l'éthylène

La démonstration du rôle précurseur de la méthionine (LIEBERMAN et MAPSON, 1964) et de l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC) (ADAMS et YANG, 1979 ; LÜRSEN *et al*, 1979) constituent les étapes essentielles de la découverte de la voie de biosynthèse de l'éthylène. Aujourd'hui, les différentes étapes de la biosynthèse de l'hormone sont connues et comprennent la chaîne métabolique présentée dans la figure 1.

La première étape correspond à la conversion de la méthionine en S-adenosyl méthionine (SAM) par incorporation d'ATP (ADAMS et YANG, 1977). Le groupement $\text{CH}_3\text{S}-$ de la méthionine est libéré sous forme de méthylthioadénosine, rapidement hydrolysée en méthylthioribose. Cette dernière molécule fournit à la fois la partie thiométhyle et la partie 2-aminobutyrique de la méthionine qui récupère ainsi son groupement $\text{CH}_3\text{S}-$, alors que son squelette carboné, dont la molécule d'éthylène est issue, est régénéré par le motif ribose de l'ATP.

La SAM est transformée en ACC qui est le pré-curseur direct de l'éthylène. La conversion d'ACC en éthylène se fait avec libération de CO₂ et de HCN selon un processus encore mal connu. La molécule d'éthylène dérive donc des carbones 3 et 4 de la méthionine. Par ailleurs, l'ACC peut subir une malonylation pour former un dérivé métaboliquement inactif, le MACC (AMRHEIN *et al.*, 1981 ; HOFFMAN *et al.*, 1982a).

Les enzymes intervenant dans la chaîne de biosynthèse de l'éthylène chez les plantes sont l'ACC synthétase, l'ACC oxydase et l'ACC malonyl-transférase.

ACC synthétase

La conversion de la SAM en ACC est réalisée par l'ACC synthétase (EC 4.4.1.14). Très tôt après la découverte de l'ACC, l'ACC synthétase a été identifiée et extraite à partir de tissu de tomate (BOLLER *et al.*, 1979 ; YU *et al.*, 1979). Elle a été ensuite trouvée dans divers autres tissus végétaux, dont la pomme dans laquelle son activité augmente considérablement au cours de la maturation (MANSOUR *et al.*, 1986). L'induction de l'ACC synthétase a pu être constatée au cours de la blessure ou de la sénescence des fleurs et des feuilles, mais aussi après un traitement avec du chlorure de lithium ou des phytohormones telles que l'auxine, les cytokinines et l'éthylène. La purification partielle de l'enzyme a conduit à l'obtention d'anticorps monoclonaux contre l'ACC synthétase de tomate (BLEECKER *et al.*, 1988). Cet outil a permis de révéler que la protéine subit une modification post-traductionnelle expliquant l'écart qui était constaté entre le poids moléculaire du produit de traduction *in vitro* (56 kDa) et celui de l'enzyme *in vivo* isolée à partir d'un extrait végétal (50 kDa). Cette protéolyse de la protéine naissante a été confirmée par les études menées sur d'autres végétaux (NAKAJIMA et IMASEKI, 1986 ; NAKAGAWA *et al.*, 1990 ; SATO *et al.*, 1991). L'existence de plusieurs isoformes de l'ACC synthétase a été envisagée lorsqu'on a pu montrer que les anticorps anti-ACC synthétase de blessure ne réagissaient pas avec ceux obtenus contre l'enzyme induite par l'auxine (NAKAGAWA *et al.*, 1988). L'étude du mécanisme réactionnel a permis de montrer qu'il s'agit d'une enzyme à pyridoxal phosphate qui convertit la SAM en ACC selon un processus de α - γ élimination

(RAMALINGAM *et al.*, 1985 ; WIESENDANGER *et al.*, 1986a et 1986b). L'enzyme est inhibée par son substrat à la suite de liaisons entre le site enzymatique et le résidu 2-aminobutyrique de la SAM. L'enzyme catalyse en fait deux réactions : la formation d'ACC par α - γ élimination et celle de

Tableau I
Effets de l'éthylène sur le développement des plantes.
(+) Stimulation ; (-) inhibition.

Organe ou tissu	Action
Graines, spores et pollen	Germination (+)
Graines, bourgeons, tubercules, bulbes	Levée de dormance (+)
Embryons somatiques	Embryogénèse (+)
Coléoptiles, tiges, racines	Croissance (-), parfois (+) Modification du géotropisme
Pétioles Racines	Epinastie (+) Formation d'aérenchyme (+) Racines adventives (+) Poils absorbants (+)
Fleurs	Induction florale (broméliacées) (+) Différentiation fleurs femelles cucurbitacées (+) Sénescence (+) Abscission (+)
Fruits	Croissance (+) Maturation (+) Déverdissement agrumes et ananas (+)
Stomates	Fermeture (+)
Laticifères	Écoulement de latex Hévéa (+)

Tableau II
Agressions extérieures provoquant une stimulation de la synthèse d'éthylène.

Type d'agressions	Nature de l'agression
Physiques	Blessure Irritation mécanique
Chimiques	Ozone, polluants (Hg ²⁺ , Cu ²⁺)
Infectieuses	Champignons, virus, bactéries, insectes
Environnementales	Basse température (<i>chilling injury</i>) Anorexie racinaire

vinylglycine par β - γ élimination (SATO et YANG, 1989a). La vinylglycine se lie de façon covalente au site enzymatique inhibant ainsi son activité de façon irréversible (SATO et YANG, 1989b). Cette propriété de l'enzyme a été exploitée pour le marquage de la protéine avec son substrat, puis pour isoler, après digestion partielle par la trypsine, un dodécapeptide de séquence SLSKDLGLPGFR correspondant au site actif (YIP *et al*, 1990). Il est à noter que les quatre premiers acides aminés de cette séquence sont

caractéristiques de toutes les enzymes fonctionnant avec le pyridoxal phosphate comme coenzyme. Plusieurs ACC synthétases ont été purifiées à partir de différents tissus végétaux ; des anticorps ont été obtenus contre la protéine et de nombreux gènes codant pour cette enzyme ont été clonés (SATO et THEOLOGIS, 1989 ; VAN DER STRAETEN *et al*, 1990 ; NAKAJIMA *et al*, 1990 ; OLSON *et al*, 1991 ; DONG *et al*, 1991). Les protéines dérivées des séquences nucléotidiques de ces différents clones présentent une homologie dans la séquence de leurs acides aminés, qui varie de 48 à 97 %.

Dans le cas de la tomate, des sondes spécifiques de deux gènes codant pour l'ACC synthétase ont été construites et leur utilisation dans des analyses par Northern a révélé une expression différentielle de ces gènes au cours de la maturation du fruit et en réponse à la blessure (OLSON *et al*, 1991). De la même façon YIP *et al* (1992) ont pu montrer que, pour une même espèce végétale, la tomate, quatre ACC synthétases différentes sont exprimées différemment selon qu'il s'agisse du fruit, de cellules en culture ou d'hypocotyles. L'accumulation de l'ARNm de l'ACC synthétase induite par la blessure est fortement inhibée par l'acide salicylique, connu pour inhiber la transduction du signal de blessure, et par les polyamines, connues pour inhiber la synthèse d'éthylène (SUTTLE, 1981). De leur côté, NAKAGAWA *et al* (1990) ont constaté que l'auxine et la blessure exerçaient une régulation différentielle sur deux gènes codant pour l'ACC synthétase dans *Cucurbita maxima*. L'ensemble de ces travaux indique que cette enzyme est différemment régulée par des facteurs hormonaux, environnementaux et chimiques. Le niveau de régulation de l'ACC synthétase reste cependant un point controversé. En effet, alors que les études citées précédemment concluent à une régulation au niveau transcriptionnel, les travaux conduits par CHAPPELL *et al* (1984) et FELIX *et al* (1991) montrent que l'enzyme répond à une régulation post-transcriptionnelle. Il est possible que les deux niveaux de régulation coexistent et soient mis en œuvre par la cellule dans des contextes différents.

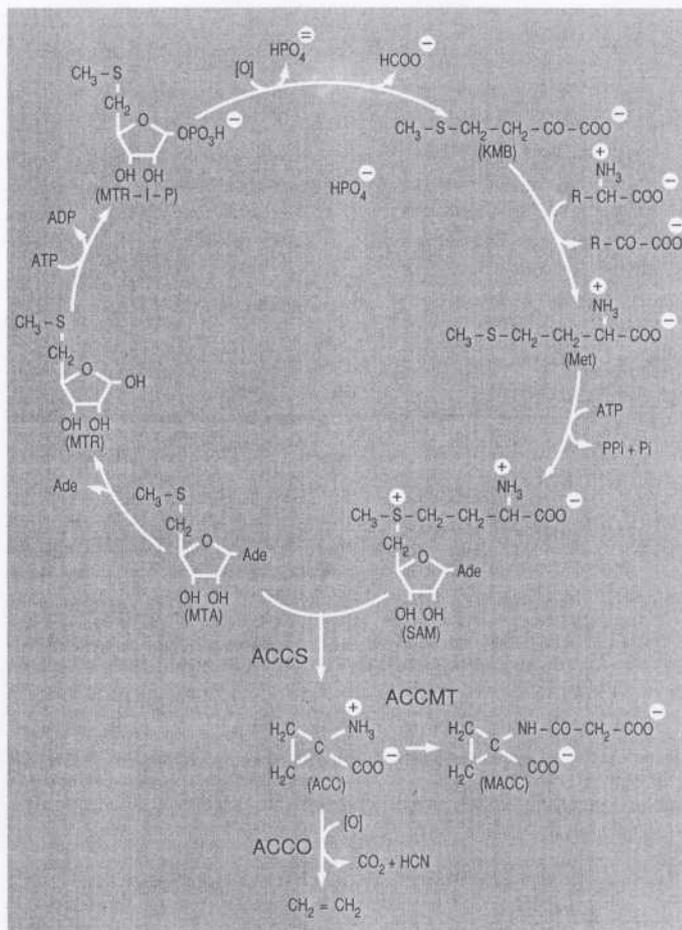


Figure 1
Le cycle de la méthionine en relation avec la biosynthèse de l'éthylène
(d'après MIYAZAKI ET YANG, 1987, modifié).

ACC : acide 1-aminocyclopropane -1-carboxylique ; Ade : adénine ; KMB : acide 2-keto-4-méthylthiobutyrique ; Met : méthionine ; MTA : 5'-méthylthioadénosine ; MTR : 5-méthylthioribose ; MTR-1-P : 5-méthylthioribose-1-phosphate ; SAM : S-Adénosylméthionine ; ACCS : ACC synthétase ; ACCO : ACC oxydase ; ACCMT : ACC malonyltransférase.

ACC oxydase

Les progrès rapides réalisés sur l'étude de l'ACC synthétase contrastent avec le *statu quo* qui a longtemps caractérisé la situation de l'ACC oxy-

dase. Cette dernière enzyme, précédemment appelée enzyme-formant l'éthylène (EFE) n'avait jamais pu être isolée dans des systèmes acellulaires. La mesure de son activité était réalisée sur des fragments de tissus. Cette méthode a cependant permis de mettre en évidence un certain nombre d'effecteurs de l'enzyme. Ainsi, on a pu établir que l'oxygène (ADAMS et YANG, 1979) et l'ion Fe^{2+} (BOUZAYEN *et al.*, 1991) sont des co-substrats. De même, plusieurs inhibiteurs ont été identifiés, dont certains sont connus pour affecter l'intégrité des membranes, comme les agents découplants de la pompe à protons (YU *et al.*, 1980), les fortes pressions osmotiques (IMASEKI et WATANABE, 1978) et les sondes lipophiles (MATTOO *et al.*, 1979). Les difficultés d'extraction et le rôle des effecteurs cités ci-dessus laissaient penser que l'EFE était constituée par un complexe enzymatique lié aux membranes et exigeait une intégrité membranaire totale pour son fonctionnement. Par ailleurs, bien que la molécule d'ACC ne possède pas de centre de chiralité, les tissus végétaux sont capables de discriminer entre les quatre stéréo-isomères de l'acide 1-amino-2-éthylcyclopropane-1-carboxylique (AEC), analogue de l'ACC, en convertissant préférentiellement l'isomère [1S, 2R] (HOFFMAN *et al.*, 1982b). Cette capacité de stéréodiscrimination est devenue le critère essentiel de l'identification d'une authentique activité EFE. Seules les activités de tissus entiers, de protoplastes (ANDERSON *et al.*, 1979), de vacuoles (GUY et KENDE, 1984) ou de vésicules tonoplastiques (MITCHELL *et al.*, 1988) en étaient dotés. Les conversions non stéréospécifiques de l'ACC ont été attribuées à des systèmes aspécifiques de production de radicaux libres (VENIS, 1984 ; DIOLEZ *et al.*, 1986).

La découverte de la nature et des propriétés de l'EFE a été le résultat d'avancées importantes réalisées dans le domaine de la biologie moléculaire de la maturation des fruits. Chez les fruits climactériques tels que la tomate, le processus de maturation est précédé d'une augmentation spectaculaire de la respiration et de la synthèse d'éthylène. Ce phénomène, appelé crise climactérique, s'accompagne de changements dans l'expression des gènes, qui semblent être à l'origine du processus de maturation (MAUNDERS *et al.*, 1987 ; LINCOLN *et al.*, 1987). Plusieurs clones d'ADNc, correspondant à des ARNm, qui s'accumulent en

abondance lors de la maturation, ont été isolés (SLATER *et al.*, 1985), mais seul celui codant pour la polygalacturonase a pu être identifié (GRIERSON *et al.*, 1986).

Afin d'isoler les gènes impliqués dans la biosynthèse et la perception de l'éthylène, des clones s'exprimant à la fois durant la maturation et au cours de la blessure ont été répertoriés, sachant que les deux phénomènes induisent une forte synthèse d'éthylène (SMITH *et al.*, 1986). Cette stratégie a abouti à l'isolement d'un clone, nommé pTOM13, qui satisfaisait à ces critères et qui se trouvait, en plus, fortement exprimé dans les feuilles sénescentes (DAVIES et GRIERSON, 1989). Le séquençage du clone pTOM13 (HOLDSWORTH *et al.*, 1987) et des clones génomiques correspondants (HOLDSWORTH *et al.*, 1988) n'a pu fournir aucune information sur la fonction de la protéine codée par cette famille de gènes. Le rôle du clone pTOM13 a été ensuite recherché par la mise en œuvre de la stratégie des ARNs antisens.

Des plantes de tomates ont été transformées par le plasmide Ti modifié d'*Agrobacterium tumefaciens* comportant une construction antisens de l'ADNc pTOM13 placé sous la dépendance du promoteur CaMV 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (HAMILTON *et al.*, 1990). Dans les plantes transgéniques ainsi obtenues, la synthèse d'éthylène ainsi que l'accumulation de l'ARNm correspondant au clone pTOM13 sont fortement réduites, démontrant ainsi l'implication du clone pTOM13 dans la production d'éthylène. En raison de l'absence d'homologie de séquence avec les gènes connus de l'ACC synthétase, les auteurs ont émis l'hypothèse que ce clone codait pour l'ACC oxydase. La fonction de la protéine a été définitivement déterminée par expression hétérologue de l'ADNc pTOM13 dans des organismes qui sont naturellement incapables de produire de l'éthylène à partir de l'ACC. Les deux modèles cellulaires utilisés au cours de ces expériences ont été la levure *Saccharomyces cerevisiae* (HAMILTON *et al.*, 1991) et les oocytes de batracien *Xenopus* (SPANU *et al.*, 1991). À l'inverse des souches sauvages, les levures transformées sont capables de convertir l'ACC en éthylène selon les mêmes modalités biochimiques que les plantes et notamment en discriminant les différents stéréo-isomères de l'AEC analogue de l'ACC. Ces résultats, obtenus avec des systèmes d'expression très diffé-

rents, apportent la preuve directe qu'un polypeptide de 35 kDa codé par un gène unique est capable à lui seul de convertir l'ACC en éthylène. Cette découverte est très éloignée de l'idée d'un complexe multienzymatique associé aux membranes, qui prédominait jusqu'alors. Compte tenu des homologues de séquence avec un ADNc codant pour une flavanone-3-hydroxylase, VERVERIDIS et JOHN (1991) ont eu l'idée d'utiliser les conditions d'extraction et de dosage permettant de solubiliser et de mesurer la flavanone-3-hydroxylase. Ils ont pu ainsi mesurer une activité EFE soluble chez le melon. Dès lors, la purification jusqu'à homogénéité de l'enzyme a été réalisée chez la pomme (DUPILLE *et al.*, 1992; DONG *et al.*, 1992a; DUPILLE *et al.*, 1993; PIRRUNG *et al.*, 1993) et les propriétés biochimiques ont pu être déterminées. On sait maintenant que l'enzyme, outre le fer (BOUZAYEN *et al.*, 1991), a besoin de l'ascorbate et du CO₂ (DONG *et al.*, 1992a; SMITH et JOHN, 1993).

L'histoire de la découverte de cette enzyme, actuellement appelée ACC oxydase, est un cas exemplaire de biochimie inverse dans lequel on est parti du gène pour isoler l'enzyme. Depuis, plusieurs clones codant pour l'ACC oxydase ont été isolés dans divers types de fruits (avocat : MCGARVEY *et al.*, 1990; pomme : DONG *et al.*, 1992b; ROSS *et al.*, 1992; melon : BALAGUÉ *et al.*, 1993), de fleurs (WANG et WOODSON, 1991), et d'autres végétaux (KENDE, 1993; ZAREMBISKI et THEOLOGIS, 1994).

Des questions restent en suspens sur la localisation subcellulaire de l'ACC oxydase. L'analyse structurale de la protéine dérivée de la séquence nucléotidique du clone pTOM13 et de celle des gènes qui lui sont apparentés indique que l'ACC oxydase ne renferme pas de peptide signal ou de région transmembranaire, suggérant que la protéine est cytosoluble. Une localisation cytosolique de l'ACC oxydase semble incompatible avec certaines caractéristiques observées *in vivo* telles que la perte de la majeure partie de l'activité des protoplastes isolés à partir de plusieurs matériels végétaux, et l'inhibition par les agents non perméants, les détergents, les agents découplants de la pompe à protons ainsi que les agents osmotiques. Un système non conventionnel d'excrétion pourrait être à l'origine de la localisation apoplastique de l'enzyme, à moins qu'elle ne soit due à

l'existence d'autres gènes codant pour une ACC oxydase comportant les séquences consensus permettant le transport transmembranaire de la protéine. On peut noter cependant que les données récentes concernant les familles multigéniques codant pour l'ACC oxydase tendent à exclure cette dernière hypothèse (BOUZAYEN *et al.*, 1993; TANG *et al.*, 1993). Des méthodes biochimiques utilisant des gradients de radioactivité spécifique de l'ACC entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule ont permis de montrer que l'éthylène était généré à la fois par l'ACC extra- et l'ACC intracellulaire (BOUZAYEN *et al.*, 1990). Grâce à l'obtention d'anticorps contre l'ACC oxydase, il a été possible de vérifier l'existence de la protéine dans la paroi chez la tomate et la pomme (ROMBALDI *et al.*, 1994). Toutefois, la présence d'une faible quantité de protéine active au niveau du cytosol n'est pas à exclure. Les mécanismes moléculaires d'adressage de la protéine vers la paroi restent à élucider.

ACC N-malonyltransférase

Cette enzyme qui conduit à la formation de MACC peut jouer un rôle dans la réduction de la production d'éthylène, en limitant la disponibilité de l'ACC. C'est ainsi que l'auto-inhibition de la synthèse d'éthylène dans le flavedo d'agrumes (LIU *et al.*, 1985) et la réduction de la production d'éthylène à la suite d'une illumination de plantules étioilées (JIAO *et al.*, 1987; VANGRONVELD *et al.*, 1988) seraient sous la dépendance d'une synthèse accrue de MACC. Chez les pommes en début de phase climactérique, plus de 40% de l'ACC synthétisé dans la pelure et plus de 5% de celle de la pulpe sont dirigés vers la formation de MACC (MANSOUR *et al.*, 1986). Au niveau cellulaire, on sait que la malonylation de l'ACC a lieu dans le cytoplasme (BOUZAYEN *et al.*, 1988); le MACC formé est par la suite transporté dans le compartiment vacuolaire par un transporteur transstomoplastique (BOUZAYEN *et al.*, 1989). Depuis la vacuole, le MACC peut être exporté vers le cytoplasme par un processus de diffusion lipophile associé à la protonation de la molécule, et donc dépendant du pH vacuolaire (PEDREÑO *et al.*, 1991). On connaît peu de choses sur la malonyltransférase, sinon qu'elle est également capable de convertir certains acides aminés de la série D en dérivés malonylés. Il s'agirait donc d'une enzyme de détoxification débarrassant la cellule d'acides aminés « anormaux » dont l'in-

corporation dans les protéines pourrait être létale. On sait que de tels acides aminés sont produits, de même que l'ACC, dans le cas de stress (REKOSLAVSKAYA *et al*, 1988). Il est donc intéressant de noter que l'ACC est reconnu comme un D-acide aminé. Récemment, GUO *et al* (1992) ont réussi à purifier une malonyltransférase d'hypocotyles de *Phaseolus mungo* et ont montré que la forme active de l'enzyme correspond à un monomère de 50-55 kDa. Au contraire, BENICHOU *et al* (1995) ont purifié partiellement, à partir du même matériel végétal, une ACC N-malonyltransférase de 36 kDa. Cela indique qu'il existe plusieurs isoformes de l'enzyme ; elles pourraient avoir des rôles physiologiques différents en raison d'affinités plus fortes pour les acides aminés D (50-55 kDa) ou pour l'ACC (36 kDa). Le séquençage des protéines et l'isolement de(s) gène(s) correspondant(s) n'ont pas encore été réalisés.

● manipulation génétique de la biosynthèse de l'éthylène

Le génie génétique appliqué aux végétaux vise à créer des mutants par l'introduction de constructions géniques destinées soit à exalter ou à inhiber l'expression d'un gène endogène, soit à introduire un gène étranger qui confère un caractère nouveau à la plante. Conformément à la procédure standard, il s'agit d'abord de réaliser une construction contenant le gène accompagné des séquences qui vont réguler sa transcription, puis de l'insérer dans un vecteur apte à transférer la construction dans le tissu à transformer. Une des caractéristiques principales des végétaux réside dans la totipotence de leurs cellules qui possèdent la capacité de régénérer une plante entière. Les méthodologies de transformation génétiques s'appliquent donc soit à des tissus végétatifs (cotylédons, jeunes feuilles, cellules en culture, protoplastes, etc), soit à des cellules germinales (pollen, ovules) qui subiront par la suite des processus d'organogénèse ou d'embryogénèse donnant ainsi naissance à une plante entière.

La méthode de transfert de gènes la plus répandue et la mieux maîtrisée consiste à utiliser *Agrobacterium tumefaciens*, responsable de la galle du collet chez un grand nombre de plantes dicotylédones.

Au cours de l'infection, cette bactérie possède la propriété de transférer une partie de son ADN (ADN-T) à la cellule hôte. Le schéma simplifié d'un processus standard de transformation de plantes *via Agrobacterium* est donné sur la figure 2. En fait, on utilise un système à deux vecteurs (système binaire). Dans l'un des vecteurs (plasmide), l'ADN-T a été éliminé (excepté les bordures droite et gauche) et remplacé par le gène d'intérêt associé à un gène de résistance à un antibiotique (R), généralement la kanamycine ; le gène de résistance à un antibiotique permet ensuite de sélectionner les plantes transformées. L'autre vecteur renferme les éléments permettant le transfert de l'ADN-T « de remplacement » (c'est-à-dire le gène d'intérêt associé au gène de résistance à un antibiotique). Ce système de transfert naturel de gènes a été manipulé pour les besoins du génie génétique, afin d'éliminer les effets pathogènes en ne conservant que les fonctions indispensables au processus de transfert. Bien qu'étant très efficace, cette méthode n'est applicable qu'aux plantes hôtes de la bactérie, excluant ainsi la plupart des monocotylédones et notamment les céréales, dont l'intérêt agronomique est primordial.

Les méthodologies de génie génétique ont ouvert des perspectives nouvelles en matière de manipulation de la biosynthèse de l'éthylène et de la maturation des fruits. GRAY *et al* (1992) ont passé en revue les différentes voies de mise en œuvre de la stratégie des ARN antisens pour le contrôle de la maturation des fruits. Les travaux cités par ces auteurs portent essentiellement sur la tomate, qui a servi de système modèle facile à régénérer et à transformer par *Agrobacterium tumefaciens*. Nous ne considérerons ici que les données les plus récentes dans le domaine de l'éthylène. Comme cela a été précisé plus haut, HAMILTON *et al* (1990) ont réalisé la transformation des tomates avec une construction antisens du clone pTOM13 impliqué dans la synthèse d'éthylène. Les fruits transgéniques obtenus présentaient une forte réduction de la production d'éthylène et un retard de maturation qui se traduisaient par une durée de conservation considérablement augmentée. Le mécanisme supposé d'inhibition de l'expression d'un gène par la stratégie des ARN antisens est représenté sur la figure 3.

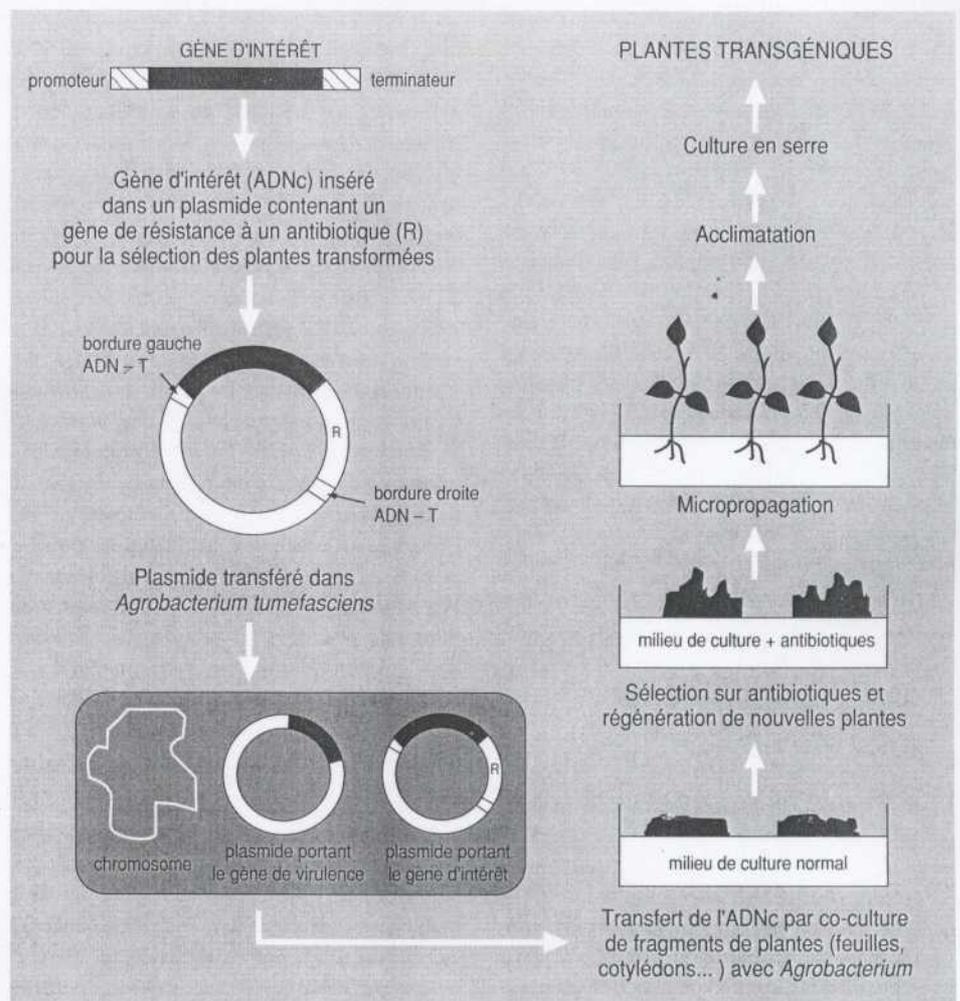


Figure 2
Représentation schématique
de la transformation d'une
plante par *Agrobacterium*
tumefaciens.

Nous avons nous-mêmes réalisé, en laboratoire, la transformation génique du melon cantaloup charentais avec un gène antisens codant pour l'ACC oxydase de melon. Ce gène avait été isolé précédemment par BALAGUÉ *et al* (1993). Les melons obtenus présentent une réduction considérable de la synthèse d'éthylène (AYUB *et al*, 1995 ; PECH *et al*, 1995). Contrairement aux fruits témoins non transformés, ils ne manifestent pas de crise climactérique de production d'éthylène, aussi bien sur pied qu'après récolte. Il en résulte une inhibition de la maturation, se traduisant par l'absence de jaunissement de l'écorce (fig 4) et par un ramollissement très réduit. En revanche, la couleur de la chair n'est pas affectée. De plus, la teneur en sucre est plus élevée en raison

de l'absence de formation de zone d'abscission, ce qui permet de prolonger l'apport d'éléments nutritifs par la plante.

Une approche similaire utilisant un gène antisens codant pour l'ACC synthétase a conduit à la réduction de 99,5 % de la production d'éthylène chez la tomate et à une suppression totale de la maturation (OELLER *et al*, 1991). Une autre stratégie a été utilisée avec succès chez la tomate dans laquelle l'ACC est dévié de sa voie métabolique naturelle vers l'éthylène par surexpression d'un gène bactérien codant pour une ACC déaminase (KLEE *et al*, 1991) ou d'un gène de bactériophage codant pour une S-adenosylméthionine hydrolase (GOOD *et al*, 1994), entraînant une réduction de la synthèse d'éthylène et un retard de maturation

(KLEE, 1993). Dans tous les cas évoqués, la maturation des fruits transgéniques peut être restaurée ou accélérée par application d'éthylène exogène.

Dans certains cas, les retards ou blocages de maturation ne peuvent être observés que si les fruits sont récoltés à l'état vert-mature. Les fruits laissés sur pied mûrissent normalement ou parfois même plus rapidement que les fruits témoins non transformés (PICTON *et al.*, 1993 ; KLEE 1993). Ce phénomène, sans doute lié à une inhibition insuffisante de la synthèse d'éthylène, pose le problème des relations plante-fruit sous un angle nouveau puisque, dans le cas des fruits non transformés, l'acte de la récolte accélère au contraire la maturation (SEAKIOTAKIS et DILLEY, 1973). Toutefois, lorsque l'inhibition de la synthèse est très forte, l'inhibition de la maturation est observée aussi bien sur pied qu'après récolte, comme dans le cas du melon transgénique obtenu par AYUB *et al.* (1995).

Lors d'essais d'identification d'un clone d'ADNc E8 associé à la maturation, PENARUBIA *et al.* (1992) ont montré que des tomates transformées avec une construction E8-antisens présentaient un retard de maturation associé à une stimulation de la synthèse d'éthylène. Ces expériences n'ont pas fourni d'indication sur la fonction de la protéine codée par ce gène ; on sait cependant que ce clone présente une homologie de séquence significative avec le clone pTOM13 codant pour l'ACC oxydase.

Ces nouvelles approches de génie génétique sont extrêmement utiles pour la compréhension des mécanismes de maturation des fruits. Elles présentent également un intérêt appliqué dans le domaine de la maîtrise de l'évolution des fruits après récolte.

● inhibiteurs de synthèse de l'éthylène

Les études fondamentales portant sur la régulation de la chaîne de biosynthèse de l'éthylène ont permis de découvrir un certain nombre de substances inhibant la production d'éthylène de manière relativement spécifique.

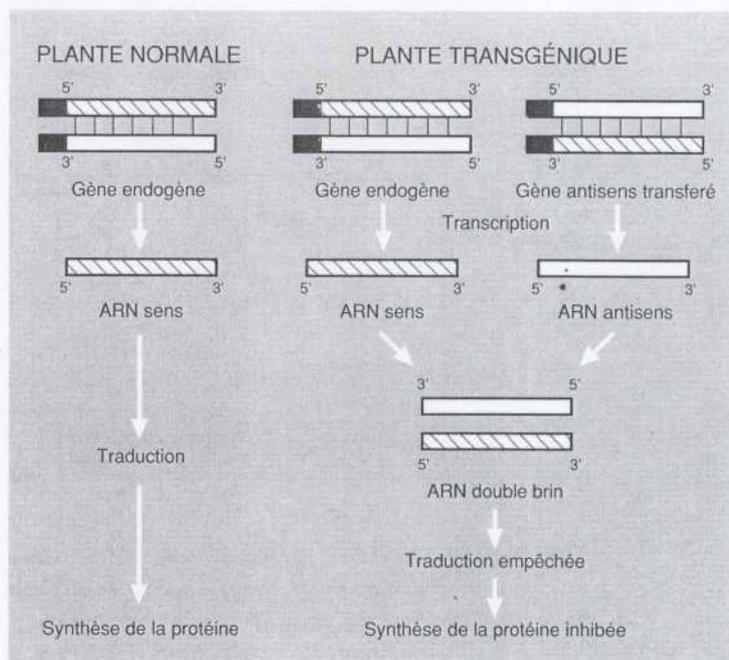


Figure 3 Mécanisme hypothétique d'inhibition de l'expression d'un gène par la stratégie des ARN antisens (= promoteur).

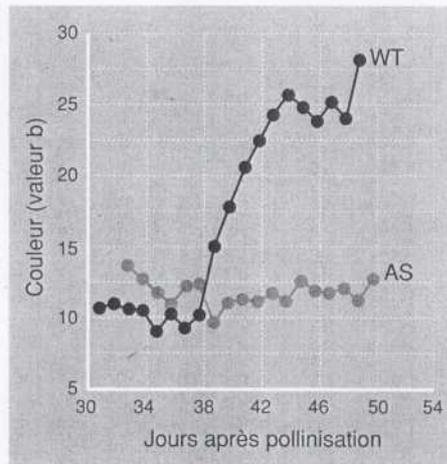
inhibiteurs de l'ACC synthétase (tableau III)

Comme déjà précisé, l'ACC synthétase est une enzyme à pyridoxal phosphate. Deux types d'inhibiteurs d'enzymes à pyridoxal phosphate se sont avérés très efficaces sur l'activité ACC synthétase. Le premier type correspond à des analogues de la

Tableau III Formule chimique et origine d'inhibiteurs d'ACC synthétase.

Rhizobitoxine	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-O-C=C-CH-COOH} \\ \quad \quad \quad \\ \text{OH} \quad \text{NH}_2 \quad \text{H} \quad \text{NH}_2 \end{array}$ Acide L-2-amino-4-(2'-amino-3'-hydroxy-propoxy)-trans-3-buténoïque	Cultures de <i>Rhizobium Japonicum</i> (OWENS L, 1969)
AVG Aminoéthyl-Vinyl-Glycolle	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-C=C-CH-COOH} \\ \quad \quad \\ \text{NH}_2 \quad \text{H} \quad \text{NH}_2 \end{array}$ Acide L-2-amino-4-(2'-amino éthoxy)-trans-3-buténoïque	Cultures de <i>Streptomyces</i> (PRUESS et al, 1974)
AOA	NH ₂ -O-CH ₂ -COOH Acide amino oxy acétique	Substance de synthèse (Yu et al, 1979)

Figure 4
Évolution de la couleur de l'écorce de melons non transformés (WT) et transformés avec un gène antisens codant pour l'ACC oxydase (AS). La valeur b, évaluée à l'aide du chromamètre Minolta, correspond à la teinte jaune.



L-vinylglycine, inhibiteur compétitif de l'enzyme (SATO et YANG, 1989a) ; il s'agit de la rhizobitoxine et de l'aminooxyvinylglycine (AVG). Le second type est constitué par des analogues de l'hydroxylamine qui forment des oximes stables avec le pyridoxal phosphate comme l'acide aminooxyacétique (AOA). Des applications d'AVG par infiltration dans des poires (NESS et ROMANI, 1980) ou par pulvérisation sur des pommes (BANGERTH, 1978) entraînent une réduction de la synthèse d'éthylène ainsi qu'un retard de maturation. L'AVG et l'AOA sont également efficaces pour prolonger la durée de survie des fleurs coupées (WANG et BAKER, 1980 ; BROUN et MAYAK, 1981).

inhibiteurs de l'ACC oxydase

L'ACC oxydase est fortement inhibée par les ions Co^{2+} et Ni^{2+} . On sait maintenant que ces deux ions agissent probablement en se substituant au fer qui est un co-facteur essentiel de l'enzyme (BOUZAYEN *et al.*, 1991). Les ions Co^{2+} ont des effets physiologiques opposés à ceux de l'éthylène, par exemple ils retardent la sénescence des fleurs (CHANDRA *et al.*, 1981) et stimulent la croissance des tiges ou des feuilles (MILLER, 1951 ; THIMANN, 1956). Les capteurs de radicaux libres tels que le *n*-propyl gallate, l'acide acétyl salicylique ou le benzoate de sodium (APELBAUM *et al.*, 1981 ; BAKER *et al.*, 1978 ; LESLIE et ROMANI, 1986) inhibent également la conversion de l'ACC en éthylène. Ils pourraient agir en piégeant des formes radicalaires de l'ACC, mais également en piégeant le fer. Enfin, les agents découplants tels

que le DNP (dinitrophénol) et le CCCP (carbonylcyanide *m*-chloro-phénylhydrazone) inhibent l'ACC oxydase (YU *et al.*, 1980 ; APELBAUM *et al.*, 1981a). On a longtemps pensé que cette inhibition était liée à l'association de l'ACC oxydase aux membranes. Ce mode d'action est maintenant à reconsidérer puisque l'on sait aujourd'hui que l'enzyme peut fonctionner à l'état soluble en présence des co-facteurs convenables (VERVERIDIS et JOHN, 1991 ; MCGARVEY et CHRISTOFFERSEN, 1992). Enfin, l'acide alpha-aminoisobutyrique, qui présente une analogie structurale avec l'ACC, inhibe la synthèse d'éthylène en se comportant comme un inhibiteur compétitif de l'ACC oxydase (SATO et ESASHI, 1982).

● mode d'action de l'éthylène : perception et transduction du signal

Les premières études sur le mode d'action de l'éthylène sont dues à BURG et BURG (1967), qui, en étudiant les relations structure/fonction d'une série d'hydrocarbures insaturés au moyen du bioessai de croissance de l'hypocotyle de pois, ont observé que les exigences pour l'activité biologique étaient comparables à la stabilité des complexes oléfines-argent. Ils en ont conclu que l'éthylène pourrait agir en se fixant de façon réversible sur un complexe contenant un métal qui pourrait être le cuivre. Cette hypothèse n'a jamais été vérifiée, mais la fixation de l'éthylène sur un éventuel site récepteur a pu être déterminée *in vivo* et *in vitro* (SISLER, 1979 ; BENGOCHEA *et al.*, 1980). Des expériences de compétition avec des analogues structuraux de l'éthylène apportent une confirmation supplémentaire de l'existence de récepteur (s) (SISLER et YANG, 1984). Cependant, l'isolement d'une entité capable de fixer l'éthylène par des méthodes biochimiques pures n'a jusque là pas abouti définitivement (HALL *et al.*, 1993). Les plantes montrent une grande diversité de réponse à l'éthylène selon le stade de développement et le tissu concerné (tableau I). Dans chacune de ces situations physiologiques, l'éthylène contrôle l'expression d'un grand nombre de gènes. Ainsi, plusieurs gènes dont l'expression est régulée par l'éthylène ont été isolés par criblage d'une banque d'ADNc (LINCOLN *et al.*,

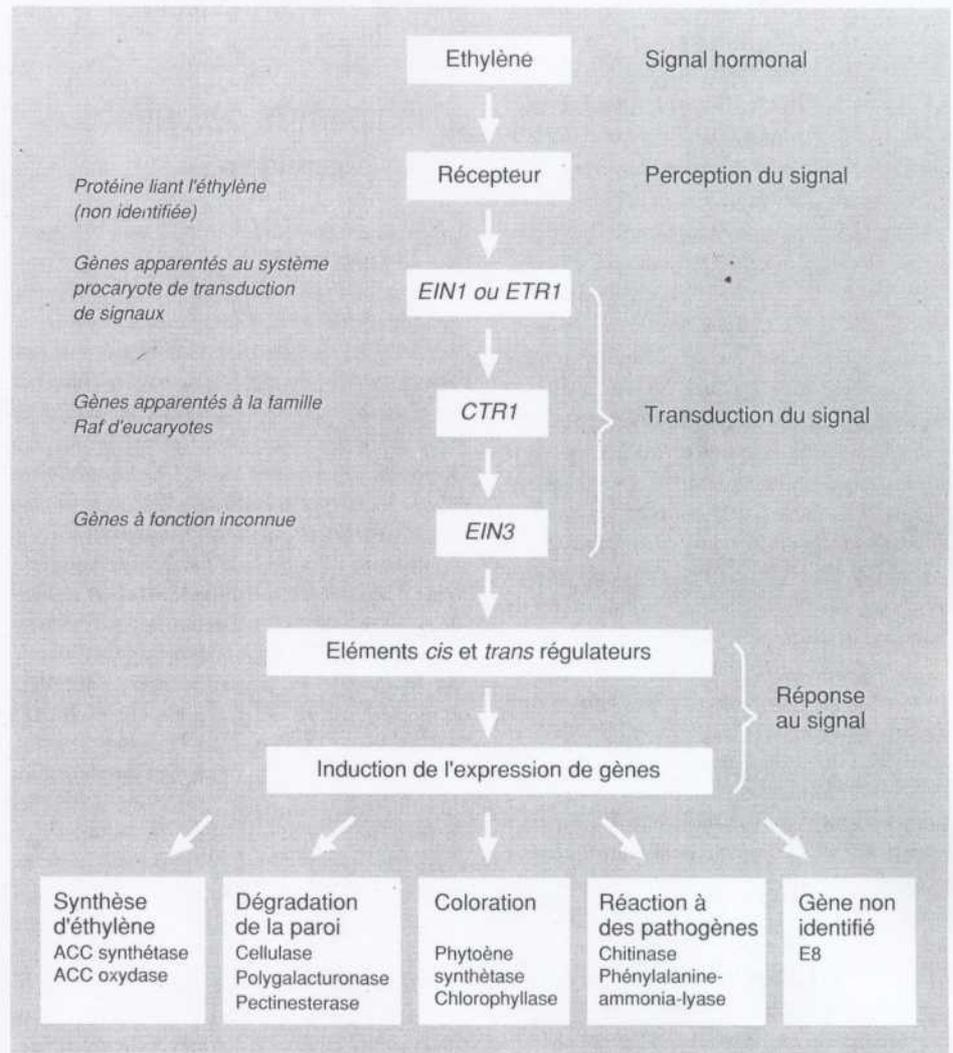
1987). Parmi ceux-ci, on a pu identifier les gènes codant pour un inhibiteur de protéases (MARGOSSIAN *et al.*, 1988) et pour la chitinase (BOLLER *et al.*, 1983 ; BROGLIE *et al.*, 1986). D'autres clones induits par l'éthylène ont été caractérisés, mais leurs fonctions demeurent à ce jour inconnues. Des séquences *cis*, régulatrices de ces gènes spécifiques de la réponse à l'éthylène, ont pu être identifiées (DEIKMAN et FISHER, 1988 ; BROGLIE *et al.*, 1989). Cependant, les événements moléculaires impliqués dans la chaîne de transduction du signal éthylène restent non élucidés. Des travaux récents utilisant diverses mutants d'*Arabidopsis thaliana* ont permis de décrire une série d'éléments géniques impliqués dans la chaîne de transduction du signal éthylène. Les études menées avec les doubles mutants issus de croisements entre ces mutants primaires de la perception de l'éthylène ont permis de les positionner séquentiellement sur la chaîne de transduction de l'hormone. Ainsi, l'éthylène est d'abord perçu par le produit du gène *EINI* (GUZMAN et ECKER, 1990), puis par celui du gène *CTR1* (KIEBER *et al.*, 1993) avant de passer par la protéine codée par le gène *EIN3* (ECKER, 1995). Les mutations *EINI* et *EIN3* confèrent l'insensibilité à l'éthylène, alors que les mutants *CTR1* expriment constitutivement la réponse à l'éthylène même en l'absence de traitement hormonal. Le gène correspondant à *CTR1* a été cloné (KIEBER *et al.*, 1993). Il code pour une protéine de 99 kDa ayant des analogies de séquence avec la famille de gènes *Raf* codant pour des protéines kinases dans les cellules eucaryotes. Par ailleurs, l'étude des mutants insensibles à l'éthylène a débouché sur l'isolement et le clonage du gène *ETRI* (CHANG *et al.*, 1993). Comme *EINI*, la mutation *ETRI* présente un caractère dominant et il est donc probable que ces deux mutations affectent le même gène. La protéine codée par ce clone présente dans sa partie carboxy-terminale une forte homologie avec la famille de protéines impliquées dans la transduction des signaux chez les procaryotes, connue sous le nom de système à deux composés. Le clonage du gène *ETRI* dans la levure a permis de générer des sites de fixation de l'éthylène, indiquant que la protéine *ETRI* agit comme un récepteur d'éthylène (SCHALLER et BLEECKER, 1995). Ces résultats, schématisés sur la figure 5, constituent une étape

importante sur la voie de l'élucidation du mode d'action de l'éthylène.

● inhibiteurs des effets de l'éthylène

Il s'agit de substances interférant avec la perception de l'éthylène. Bien que le(s) site(s) récepteur(s) de l'éthylène soient totalement inconnus, on sait évaluer l'effet d'antagonistes d'action de l'éthylène à l'aide de tests biologiques tels que l'élongation de l'hypocotyle de pois, ou bien par leur capacité à déplacer de l'éthylène marqué au ^{14}C fixé sur des tissus. Dans ces conditions, il a été possible de montrer que le CO_2 empêche ou retarde les effets de l'éthylène (BURG et BURG, 1967). Cependant, on sait depuis peu que le CO_2 est aussi un cofacteur de l'ACC oxydase. Son mode d'action est donc difficile à évaluer *in vivo*. Quoi qu'il en soit, son utilisation commerciale est très répandue pour la prolongation de la durée de conservation des fruits en atmosphères contrôlées ou modifiées. L'un des plus puissants inhibiteurs de l'action de l'éthylène est l'ion Ag^+ (BEYER, 1976). Appliqué sous forme de complexe avec l'ion thiosulfate, il pénètre rapidement dans les végétaux et ralentit ou inhibe les processus de sénescence (REID, 1980 ; VEEN, 1983). Il est surtout utilisé commercialement dans certains pays pour la prolongation de la durée de survie des fleurs coupées. Les effets de Ag^+ correspondraient à une interaction avec les ligands impliqués dans la perception de l'éthylène, les rendant ainsi inactifs. Certaines oléfines cycliques, analogues structurales de l'éthylène, comme le norbornadiène (fig 6), inhibent les effets de l'éthylène de façon compétitive (SISLER et YANG, 1984). Une autre molécule, la diazocyclopentadiène (DACP, fig 6), s'est avérée beaucoup plus efficace que la norbornadiène pour inhiber les effets de l'éthylène. Il s'agit d'une molécule capable de photolyse avec un temps de 1/2 transformation de 28 minutes à 25 °C sous lumière fluorescente de 375 $\mu\text{mol m}^2/\text{s}$ (5000 lux). La molécule est capable d'entrer en compétition avec l'éthylène pour la fixation sur des sites récepteurs. Cette capacité est plus élevée après photolyse ($K_d = 0,12 \mu\text{l/l}$) qu'avant ($K_d = 195 \mu\text{l/l}$; SISLER et BLANKENSHIP, 1993). L'application de DACP permet de retarder la maturation des tomates et

Figure 5
Représentation schématique des événements moléculaires mis en jeu dans la perception et la transduction du signal éthylène chez les plantes. Chez *Arabidopsis thaliana*, les mutations des gènes *ETR1*, *EIN1* et *EIN3* donnent des plantes insensibles à l'éthylène, alors que la mutation *CTR1* aboutit à des plantes qui expriment constitutivement la réponse à l'éthylène même en l'absence de l'hormone. L'analyse des relations épistatiques existant entre ces différents mutants a permis d'isoler les produits de ces gènes et de les situer dans la chaîne de transduction selon un ordre séquentiel (KIEBER et al, 1993).



des pommes (SISLER et BLANKENSHIP, 1993 ; BLANKENSHIP et SISLER, 1993). Enfin, un antagoniste extrêmement efficace de l'action de l'éthylène, semblant se lier de façon irréversible sur les sites récepteurs, le 1-méthyl-cyclopropane (1-MCP, fig 6) a été découvert très récemment (SEREK et al, 1996 ; SISLER et al, 1995). Il est actif à des doses très faibles, de l'ordre de quelques ppb, pour empêcher la sénescence des fleurs et la maturation des fruits. Son applica-

tion commerciale en vue de prolonger la durée de vie des fleurs coupées ou en pots semble envisageable.

● molécules chimiques génératrices d'éthylène

Un grand nombre de molécules génératrices d'éthylène a été proposé. La plupart d'entre elles

Tableau IV
Quelques utilisations actuelles ou potentielles de l'éthéphon en agriculture.

Organes concernés	Effets recherchés	Espèces ou familles de plantes
Semences	Levée de dormance	Graminées sauvages, tournesol
Tiges	Réduction de la taille (antiverse) Nanification Ramification Stimulation de la production de latex	Céréales, maïs, tournesol, Iliciées porte-graines Hortensias Rosiers Hévéa
Feuilles	Défoliation	Coton, hévéa
Fleurs	Stimulation de l'induction florale Réduction de l'induction florale Différentiation florale Eclaircissage, égrapillonnage	Ananas et broméliacées ornementales Pêcher "Féminisation" du concombre Vigne
Fruits	Regroupement de la maturité Stimulation de l'abscission pour récolte mécanique Déverdisage	Pommes, tomates Noix, noisettes, café, coton, cerises, cassis Agrumes, ananas

mettent en œuvre un groupement chloroéthyl lié à un phosphate, un silicium ou un soufre (BEAUDRY et KAYS, 1988). La plus connue de ces molécules est l'acide chloroéthyl phosphonique ou éthéphon (fig 7) qui est d'ailleurs le régulateur de croissance le plus utilisé en agriculture. Ses effets sont ceux de l'éthylène et les principales utilisations sont présentées dans le tableau IV (YANG, 1969).

● conclusions

La synthèse présentée met en évidence l'importance des progrès qui ont été obtenus à l'issue des divers travaux évoqués, dans la connaissance de la biosynthèse de l'éthylène, tant sous ses aspects biochimiques que cellulaires et moléculaires. Elle souligne également les applications actuelles et potentielles qui pourraient être faites de cette

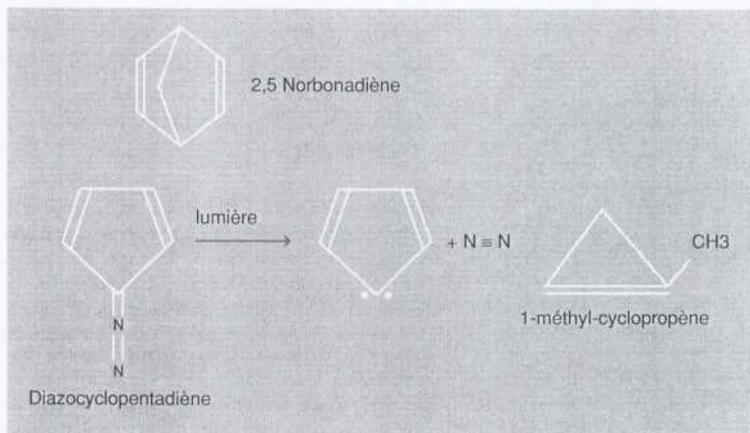


Figure 6
Représentation du 2,5 norbornadiène (NBD), du diazocyclopentadiène (DACP) et du 1-méthyle-cyclopropène (1-MCP), inhibiteurs compétitifs de l'action de l'éthylène. Le DACP est instable à la lumière.

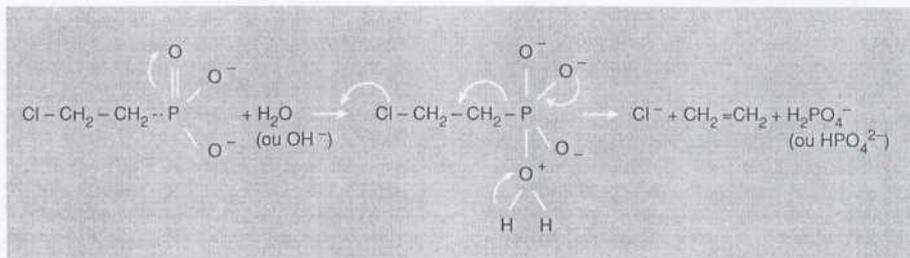


Figure 7
Mécanismes de dégradation de l'éthéphon en éthylène (YANG, 1969).

hormone dans le domaine de l'agronomie, ainsi que la diversité de son spectre d'utilisation. Il reste cependant beaucoup de progrès à accomplir pour préciser le mode d'action et de perception de l'éthylène. L'étude des diverses réponses à cette hormone données par des types mutants se présente aujourd'hui comme l'approche privilégiée qui permettra de connaître les événements moléculaires constituant la chaîne de transduction du signal éthylène.

remerciements

La rédaction de cet article a été suscitée par l'interface chimie-biologie du CNRS (projet n° 113-68 en collaboration avec le Dr Stella, URA 1412, Marseille). R Ayub et C Rombaldi ont bénéficié d'une bourse CAPES/COFECUB du gouvernement Brésilien pour la préparation d'une thèse de doctorat. Les auteurs remercient très vivement Catherine Sigro pour la dactylographie du texte et la réalisation des figures. Les travaux personnels des auteurs cités dans cette revue ont été financés par le ministère de l'Éducation nationale (JE 179), l'AIP INRA « Matural » et le programme CEE CAMAR.

● références

- Abeles FB, Morgan PW, Saltveit ME Jr (1992) *Ethylene in plant biology*. San Diego, CA, USA, Academic Press, 2nd ed, 414 p
- Adams DO, Yang SF (1977) Methionine metabolism in apple tissue: implication of S-adenosylmethionine as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Plant Physiol* 60, 892-896
- Adams DO, Yang SF (1979) Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc Natl Acad Sci* 76, 170-174
- Amrhein N, Scheebeck D, Skorupka H, Tophof S (1981) Identification of a major metabolite of the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in higher plants. *Naturwissenschaften* 68, 619-620
- Anderson JD, Lieberman M, Stewart R (1979) Ethylene production by apple protoplasts. *Plant Physiol* 63, 931-935
- Apelbaum A, Wang SY, Burgoon AC, Baker JE, Lieberman M (1981) 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
- Ayub RA, Bouzayen M, Latché A, Magné C, Zhong WJ, Farran I, Ben Amor M, Balagué C, Roustan JP, Pech JC (1995) Expression of ACC oxidase antisense gene in melon. *Plant Physiol* 108 (2), 150
- Baker JE, Lieberman M, Anderson JD (1978) Inhibition of ethylene production in fruit slices by a rhizobitoxine analog and free scavengers. *Plant Physiol* 61, 886-888
- Balagué C, Watson CF, Turner AJ, Rougé P, Pictou S, Pech JC, Grierson D (1993) Isolation of a ripening and wound-induced cDNA from *Cucumis melo* L. with homology to the ethylene-forming enzyme. *Eur J Biochem* 212, 27-34
- Bangerth F (1978) The effect of substituted amino acid on ethylene biosynthesis, respiration, ripening and preharvest drop of apple fruits. *J Am Soc Hortic Sci* 130, 401-404
- Beaudry RM, Kays SJ (1988) Application of ethylene-releasing compounds in agriculture. In: *Plant growth and leaf-applied chemicals*, Boca Raton, Florida, USA, CRC Press, 127-156
- Bengochea T, Acaster MA, Dodds JH, Evans DE, Jerie PH, Hall MA (1980) Studies on ethylene binding by cell free preparation from cotyledons of *Phaseolus vulgaris* L. Effects of structural analogues of ethylene and of inhibitors. *Planta* 148, 407-411
- Benichou M, Martinez-Reina G, Romojaro F, Pech JC, Latché A (1995) Partial purification and properties of a 36 kDa 1-aminocyclopropane-1-carboxylate N-malonyl transferase from mungbean. *Physiol Plant* 94, 629-634
- Beyer EM Jr (1976) A potent inhibitor of ethylene action in plants. *Plant Physiol* 58, 268-271
- Blankenship SM, Sisler EC (1993) Response of apples to diazocyclopentadiene inhibition of ethylene binding. *Postharv Biol and Tech* 3, 95-102
- Bleecker AB, Robinson G, Kende H (1988) Studies on the regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato using monoclonal antibodies. *Planta* 173, 385-390
- Boller T, Gehri A, Mauch F, Voegli U (1983) Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties and possible function. *Planta* 157, 22-31
- Boller T, Hermer RC, Kende H (1979) Assay for and enzymatic formation of an ethylene precursor, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Planta* 145, 293-303
- Bouzayen M, Cooper W, Barry C, Zegzouti H, Hamilton AJ, Grierson D (1993) EFE multi-gene family in tomato plants: expression and characterization. In: *Cellular and molecular aspects of the plant hormone ethylene*. Dordrecht, the Netherlands, (JC Pech, A Latché, C Balagué, eds), Kluwer Academic Publishers, 76-81
- Bouzayen M, Felix G, Latché A, Pech JC, Boller T (1991) Iron: an essential cofactor for the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene. *Planta* 184, 244-247

- Bouzayen M, Latché A, Alibert G, Pech JC (1988) Intracellular sites of synthesis and storage of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid in *Acer pseudoplatanus* cells. *Plant Physiol* 88, 613-617
- Bouzayen M, Latché A, Pech JC (1990) Subcellular localisation of the sites of conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid into ethylene in plant cells. *Planta* 180, 175-180
- Bouzayen M, Latché A, Pech JC, Marigo G (1989) Carrier mediated uptake of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid in vacuoles isolated from *Catharanthus roseus* cells. *Plant Physiol* 91, 1317-1322
- Boyer N (1967) Modification de la croissance de la tige de Bryone (*Bryonia dioica*) à la suite d'irritations tactiles. *CR Acad Sci Paris* 264, 2114-2117
- Bradford KJ, Yang SF (1980) Xylem transport of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, an ethylene precursor in waterlogged plants. *Plant Physiol* 65, 322-26
- Brogliè KE, Biddle P, Cressman R, Brogliè RM (1989) Functional analysis of DNA sequences responsible for ethylene regulation of a bean chitinase gene in transgenic tobacco. *Plant Cell* 1, 599-607
- Brogliè KE, Gaynor JJ, Brogliè RM (1986) Ethylene-regulated gene expression: molecular cloning of the genes encoding an endochitinase from *Phaseolus vulgaris*. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 6820-6824
- Broun R, Mayak S (1981) Aminoxyacetic acid as an inhibitor of ethylene synthesis and senescence in carnation flowers. *Sci Horti* 15, 277-282
- Burg SP, Burg EA (1967) Molecular requirements for the biological activity of ethylene. *Plant Physiol* 42, 144-152
- Chandra G, Reddy KS, Mohan Ram HY (1980) Extension of vase-life cut marigold and chrysanthemum flowers by the use of cobalt chloride. *Indian J Exp Biol* 19, 150-154
- Chang C, Kwok SF, Bleecker AB, Meyerowitz EH (1993) *Arabidopsis* ethylene response gene ETR1. Similarity of product to two component regulators. *Science* 262, 539-544
- Chappell J, Hahlbrock K, Boller T (1984) Rapid induction of ethylene biosynthesis in cultured parsley cells by fungal elicitor and its relationship to the induction of phenylalanine ammonia-lyase. *Planta* 161, 475-480
- Davies KM, Grierson D (1989) Identification of cDNA clones for tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) mRNAs that accumulate during fruit ripening and leaf senescence in response to ethylene. *Planta* 79, 73-80
- Deikman J, Fisher RL (1988) Interaction of a DNA binding factor with the 5'-flanking region of an ethylene-responsive fruit ripening gene from tomato. *EMBO J* 7, 3315-3320
- Denny FE (1924) Hastening the coloration of melons. *J Agr Res* 27, 757-769
- Diolèz P, Davy de Virville J, Latché A, Moreau F, Pech JC, Reid M (1986) Role of the mitochondria in the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in plant tissues. *Plant Science* 43, 13-17
- Dong JG, Fernandez-Maculet JC, Yang SF (1992a) Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from apple fruit. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 9789-9793
- Dong JG, Kim WT, Yip WK, Thompson GA, Li L (1991) Cloning of a cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and expression of its mRNA in ripening apple fruit. *Planta* 185, 38-45
- Dong JG, Olson D, Silverstone A, Yang SF (1992b) Sequence of a cDNA coding for a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog from apple fruit. *Plant Physiol* 98, 1530-1531
- Dupille E, Latché A, Roques C, Pech JC (1992) Stabilisation *in vitro* et purification de l'enzyme formant l'éthylène chez les pommes. *CR Acad Sci* 315, 77-84
- Dupille E, Rombaldi C, Lelièvre JM, Cleyet-Marel JC, Pech JC, Latché A (1993) Purification, properties and partial amino-acid sequence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase from apple fruits. *Planta* 190, 65-70
- Ecker JR (1995) The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* 268, 667-675
- Felix G, Grosskopf DJ, Regenass M, Basse CW, Boller T (1991) Elicitor-induced ethylene biosynthesis in tomato cells. Characterisation and use as a bioassay for elicitor action *Plant Physiol* 97, 19-25
- Gane R (1934) Production of ethylene by some ripening fruits. *Nature* 134, 1008
- Good X, Kellogg JA, Wagoner W, Langhoff D, Matsumura W, Bestwick RK (1994) Reduced ethylene synthesis by transgenic tomatoes expressing S-adenosylmethionine hydrolase. *Plant Mol Biol* 26, 781-790
- Gray J, Pictou S, Shabber J, Schuch W, Grierson D (1992) Molecular biology of fruit ripening and its manipulation with antisense genes. *Plant Mol Biol* 19, 69-87
- Grierson D, Tucker GA, Keen J, Ray J, Bird CR, Schuch W (1986) Sequencing and identification of a cDNA clone for tomato polygalacturonase. *Nucl Acid Res* 14, 8595-8603
- Guo L, Arteca RN, Phillips AT, Liu Y (1992) Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate N-malonyltransferase from etiolated mung bean hypocotyls. *Plant Physiol* 100, 2041-2045
- Guy M, Kende H (1984) Conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by isolated vacuoles of *Pisum sativum* L. *Planta* 160, 526-30
- Guzman P, Ecker JR (1990) Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell* 2, 513-523

- Hall MA, Aho HM, Berry AW, Cowan DS, Harpham CJC, Holland MG, Moshkov IYe, Novikova G, Smith AR (1993) Ethylene receptors. In: *Cellular and molecular aspects of the plant hormone ethylene*. Dordrecht, the Netherlands (JC Pech, A Latché, C Balagué, eds), Kluwer Academic Publishers, 182-187
- Hamilton AJ, Bouzayen M, Grierson D (1991) Identification of a tomato gene for the ethylene-forming enzyme by expression in yeast. *Proc Nat Acad Sci USA* 88, 7434-7437
- Hamilton AJ, Lycett GW, Grierson D (1990) Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature* 346, 284-287
- Hoffman NE, Yang SF, Ichihara A, Sakamura S (1982b) Stereospecific conversion of 1-aminocyclopropane carboxylic acid to ethylene by plant tissues. Conversion of stereoisomers of 1-amino-2-ethylcyclopropane-1-carboxylic acid to 1-butene. *Plant Physiol* 70, 195-199
- Hoffman NE, Yang SF, McKeon T (1982a) Identification of 1-(malonylamino)-cyclopropane-1-carboxylic acid as a major conjugate of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, an ethylene precursor in higher plants. *Biochem Biophys Res Commun* 104, 765-770
- Holdsworth MJ, Schuch W, Grierson D (1987) Nucleotide sequence of an ethylene-related gene from tomato. *Nucleic Acids Res* 15, 10600
- Holdsworth MJ, Schuch W, Grierson D (1988) Organisation and expression of a wound/ripening-related small multigene family from tomato. *Plant Mol Biol* 11, 81-88
- Imaseki H, Watanabe A (1978) Inhibition of ethylene production by osmotic shock. Further evidence for membrane control of ethylene production. *Plant Cell Physiol* 9, 345-348
- Jackson M, Campbell DJ (1976) Waterlogging and petiole epinasty in tomato: the role of ethylene and low oxygen. *New Phytol* 76, 21-29
- Jiao XZ, Yip WK, Yang SF (1987) The effect of light and phytochrome on 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid metabolism in etiolated wheat seedling leaves. *Plant Physiol* 85, 643-647
- Kende H (1993) Ethylene biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol, Plant Mol Biol* 44, 283-307
- Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldman KA, Ecker JR (1993) CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinase. *Cell* 72, 427-441
- Klee HJ (1993) Ripening physiology of fruit from transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants with reduced ethylene synthesis. *Plant Physiol* 102, 911-916
- Klee HJ, Hayford MB, Kretzmer KA, Barry GF, Kishore GM (1991) Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. *Plant Cell* 3, 1187-1193
- Leslie CA, Romani RJ (1986) Salicylic acid: a new inhibitor of ethylene biosynthesis. *Plant Cell Reports* 5, 144-146
- Lieberman M, Mapson LW (1964) Genesis and biogenesis of ethylene. *Nature* 204, 343-345
- Lincoln JE, Cordes S, Read E, Fischer RL (1987) Regulation of gene expression by ethylene during *Lycopersicon esculentum* (tomato) fruit development. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 2793-2797
- Liu Y, Hoffman NE, Yang SF (1985) Ethylene-promoted malonylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid participates in autoinhibition of ethylene synthesis in grape fruit flavedo discs. *Planta* 164, 565-568
- Lürssen K, Naumann K, Schroder R (1979) 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, an intermediate of the ethylene biosynthesis in higher plants. *Z Pflanzen Physiol* 92, 285-294
- Mansour R, Latché A, Vaillant V, Pech JC, Reid MS (1986) Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in ripening apple fruit. *Physiol Plant* 66, 495-502
- Margossian LJ, Federman AD, Giovannoni JJ, Fischer RL (1988) Ethylene-regulated expression of a tomato fruit ripening gene encoding a proteinase inhibitor I with a glutamic residue at the reactive site. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 8012-8016
- Mattoo AK, Chalutz E, Lieberman M (1979) Effects of lipophilic and water-soluble membrane probes on ethylene synthesis in apple and *Penicillium digitatum* *Plant Cell Physiol* 20, 1097-1106
- Mattoo AK, Suttle JC (1991) *The plant hormone ethylene*. Boca Raton, FL, USA, CRC press Pub, 337 p
- Mauders MJ, Holdsworth MJ, Slater A, Knapp JE, Bird CR, Schuch W, Grierson D (1987) Ethylene stimulates the accumulation of ripening-related mRNAs in tomatoes. *Plant Cell Envir* 10, 177-184
- McGarvey J, Christoffersen RE (1992) Characterization and kinetic parameters of ethylene-forming enzyme from avocado fruit. *J Biol Chem* 267, 5964-5967
- McGarvey J, Yu H, Christoffersen RE (1990) Nucleotide sequence of a ripening-related cDNA from avocado fruit. *Plant Mol Biol* 15, 165-167
- Miller CO (1951) Promoting effect of cobaltous and nickelous ions on expansion of etiolated bean leaf discs. *Arch Biochem Biophys* 32, 216-18
- Mitchell T, Porter AJR, John P (1988) Authentic activity of the ethylene-forming enzyme observed in membranes obtained from kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*). *New Phytol* 109, 13-19
- Miyazaki JH, Yang SF (1987) The methionine salvage pathway in relation to ethylene and polyamine biosynthesis. *Physiol Plant* 69, 366-370
- Morgan PW, Hall MC (1964) Accelerated release of ethylene by cotton following application of indolyl-3-acetic acid. *Nature* 201, 99
- Nakagawa J, Mori H, Yamazaki K, Imaseki H (1990) Cloning of a complementary DNA auxin-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and differential expression of the gene by auxin and wounding. *Plant Cell Physiol* 32, 1153-63

- Nakagawa J, Nakajima N, Imaseki H (1988) Immunochemical difference of wound-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthetase of mesocarp of *Cucurbita maxima* Duch fruits. *Plant Cell Physiol* 27, 1021-1029
- Nakajima N, Imaseki H (1986) Purification and properties of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase of mesocarp of *Cucurbita maxima* Duch fruits. *Plant Cell Physiol* 27, 969-80
- Nakajima N, Mori H, Yamazaki K, Imaseki H (1990) Molecular cloning and sequence of a complementary DNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylic synthase induced by tissue wounding. *Plant Cell Physiol* 31, 1021-1029
- Neljubow D (1901) Über die horizontale nutation der Stengel von *Pisum sativum* und einiger anderen Pflanzen. *Bot Centralbl Beih* 10, 128-139
- Ness PJ, Romani RJ (1980) Effects of aminoethoxyvinylglycine and countereffects of ethylene in ripening of Bartlett pear fruits. *Plant Physiol* 65, 372-376
- Oeller PW, Min-Wong L, Taylor LP, Pike DA, Theologis A (1991) Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science* 254, 437-439
- Olson DC, White JA, Edelman L, Harkins RH, Kende H (1991) Differential expression of two genes for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato fruits. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 5340-5344
- Owens LD (1969) Toxins in plant disease: structure and mode of action. *Science* 165, 18-25
- Pech JC, Balagué C, Latché A, Bouzayen M (1994) Postharvest physiology of climacteric fruits: recent developments in the biosynthesis and action of ethylene. *Sci Alim* 14, 3-15
- Pech JC, Lasserre E, Ayub R, Guis M, Bidonde S, Hernandez JA, Ramassamy S, Rombaldi C, Bouzayen M, Balagué C, Latché A (1995) Involvement of ethylene in fruit ripening. Expression and control of ACC oxidase gene. *Aust J Hort Res* (in press)
- Pech JC, Latché A, Balagué C (1993) Cellular and molecular aspects of the plant hormone ethylene. Dordrecht, the Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 385 p
- Pedreño MA, Bouzayen M, Pech JC, Marigo G, Latché A (1991) Vacuolar release of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid, the conjugated form of the ethylene precursor. *Plant Physiol* 97, 1483-1486
- Penarubia L, Aguillar M, Margossian L, Fischer RL (1992) An antisense gene stimulates ethylene hormone production during tomato fruit ripening. *Plant Cell* 4, 681-687
- Picton S, Barton S, Bouzayen M, Hamilton A, Grierson D (1993) Altered fruit ripening and leaf senescence in tomatoes expressing an antisense ethylene-forming enzyme transgene. *Plant J* 3, 461-481
- Pirrung MC, Kaiser LM, Chen J (1993) Purification and properties of the apple fruit ethylene-forming enzyme. *Biochemistry* 32, 7445-7450
- Pruess DL, Scannell JP, Kellett M, Ax HA, Jancek J, Williams TH, Stempel A (1974) Antimetabolites produced by microorganisms X L-2-amino-4-(2-aminoethoxy) trans-3-butenoic acid. *The Journal of Antibiotics* 24, 122-127
- Ramalingam K, Lee KM, Woodard RW, Bleecker AB, Kende H (1985) Stereochemical course of the reaction catalyzed by the pyridoxal phosphate-dependent enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 7820-7824
- Reid MS (1980) Ethylene and abscission. *HortScience* 20, 45-48
- Rekoslavskaya NI, Markova TA, Gamburg KZ (1988) Appearance of N-malonyl-D-tryptophan in excised leaves during wilting. 1- The content of tryptophan and N-malonyl-D-tryptophan as affected by water deficit. *J Plant Physiol* 132, 86-89
- Rombaldi C, Lelievre JM, Latché A, Petitprez M, Bouzayen M, Pech JC (1994) Immunocytochemical localization of ACC oxidase in tomato and apple fruit. *Planta* 192, 453-460
- Ross GS, Knighton ML, Lee ML (1992) An ethylene-related cDNA from ripening apples. *Plant Mol Biol* 19, 2131-2138
- Sato T, Oeller PW, Theologis A (1991) The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase of *Cucurbita*. *J Biol Chem* 266, 3752-3759
- Sato T, Theologis A (1989) Cloning the mRNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, the key enzyme for ethylene biosynthesis in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 6621-6625
- Sato S, Esashi Y (1982) Effects of α -aminoisobutyric acid and D- and L-amino acids on ethylene production and content of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in cotyledonary segments of cocklebur seeds. *Physiol Plant* 54, 147-52
- Sato S, Yang SF (1989a) 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, 1036-39
- Sato S, Yang SF (1989b) Specificity of S-adenosyl-L-methionine in the inactivation and the labeling of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase isolated from tomato fruits. *Arc Biochem Biophys* 271, 107-112
- Schaller GE, Bleecker AB (1995) Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the *Arabidopsis ETR1* gene. *Science* 270, 1809-1811
- Serek M, Tamari G, Sisler EC, Borochoy A (1995) Inhibition of ethylene-induced cellular senescence symptoms by 1-MCP, a new inhibitor of ethylene action. *Physiol Plant* 94, 205-210
- Sfakiotakis EM, Dilley D (1973) Internal ethylene concentrations in apple fruits attached to or detached from the tree. *J Amer Soc Hort Sci* 98, 501-503
- Sisler EC (1979) Measurement of ethylene binding in plant tissue. *Plant Physiol* 64, 538-542

- Sisler EC, Blankenship SM (1993) Effect of diazocyclopentadiene on tomato ripening. *Plant Growth Reg* 12, 155-160
- Sisler EC, Dupille E, Serek M (1996) Effect of 1-methylcyclopropane and methylene-cyclopropane on ethylene binding and ethylene action on cut carnations. *Plant Growth Reg* 18, 79-96
- Sisler EC, Yang SF (1984) Anti-ethylene effect of cis-2-butene and cyclic olefins. *Phytochemistry* 23, 2765-2768
- Slater A, Maunders MJ, Edwards K, Schuch W, Grierson D (1985) Isolation and characterisation of cDNA clones for tomato polygalacturonase and other ripening-related proteins. *Plant Mol Biol* 5, 137-147
- Smith CJS, Slater A, Grierson D (1986) Rapid appearance of an mRNA correlated with ethylene synthesis encoding a protein of molecular weight 35 000. *Planta* 168, 94-100
- Smith JJ, John P (1993) Activation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase by bicarbonate/carbon dioxide. *Phytochemistry* 32, 1381-1386
- Spanu P, Reinhart D, Boller T (1991) Analysis and cloning of the ethylene-forming enzyme from tomato by functional expression of its mRNA in *Xenopus laevis* oocytes. *EMBO J* 10, 2007-2013
- Suttle JC (1981) Effects of polyamines on ethylene production. *Phytochemistry* 20, 1477-1480
- Tang X, Wang H, Brandt AS, Woodson WR (1993) Organization and structure of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family from *Petunia hybrida*. *Plant Mol Biol* 23, 1151-1164
- Theologis A (1993) What a gas! *Current Biology* 3, 369-3371
- Thimann KV (1956) Studies on the growth and inhibition of isolated plant parts. V- The effects of cobalt and other metals. *Am J Bot* 43, 241-250
- Van der Straeten D, Van Wiemeersch L, Goodman HM, Van Montagu M (1990) Cloning and sequence of two different cDNAs encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 4859-4863
- Vangronsveld J, Clijsters H, Van Poucke M (1988) Phytochrome-controlled ethylene biosynthesis or intact etiolated bean seedlings. *Planta* 174, 19-24
- Veen H (1983) Silver thiosulfate: an experimental tool in plant science. *Sci Hort* 20, 211-224
- Venis MA (1984) Cell-free ethylene-forming systems lack stereochemical fidelity. *Planta* 162, 85-88
- Ververidis P, John P (1991) Complete recovery *in vitro* of ethylene forming enzyme activity. *Phytochem* 30, 725-727
- Wang CY, Baker JE (1980) Extending vase life of carnation with aminoxyacetic acid, polyamines, EDU, and CCCP. *Hort Sci* 15, 805-806
- Wang H, Woodson WR (1991) A flower senescence-related mRNA from carnation shares sequence similarity with fruit ripening-related mRNAs involved in ethylene biosynthesis. *Plant Physiol* 96, 1000-1001
- Wiesendanger R, Martinoni B, Boller T, Arigoni D (1986a) Biosynthesis for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid: steric course of the reaction at the α -position. *J Chem Soc Chem Commun*, 238-239
- Wiesendanger R, Martinoni B, Boller T, Arigoni D (1986b) Biosynthesis for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid: steric course of the reaction at the C-4 position. *Experientia* 42, 207-209
- Yang SF (1969) Ethylene evolution from 2-chloroethylphosphonic acid. *Plant Physiol* 44, 1203-1204
- Yang SF, Hoffman NE (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* 35, 155-189
- Yip WK, Dong JG, Kenny JW, Thompson GA, Yang SF (1990) Characterization and sequencing of the active site of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 7930-7934
- Yip WK, Moore T, Yang SF (1992) Differential accumulation of transcripts for four tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase homologs under various conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 2475-2479
- Yu YB, Adams DO, Yang SF (1979) 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, a key enzyme in ethylene biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* 198, 280-286
- Yu YB, Adams DO, Yang SF (1980) Inhibition of ethylene production by 2,4-dinitrophenol and high temperature. *Plant Physiol* 66, 286-290
- Zarembinski TI, Theologis A (1994) Ethylene biosynthesis and action: a case of conservation. *Plant Mol Biol* 26, 1579-1597