

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS



PRODUCCION DE ETILENO EN LYCOPERSICON
ESCULENTUM MILL C.V. PLATENSE. EFECTO
DEL DIOXIDO DE CARBONO

DONACION.....

A.....

Fecha... 28-6-99

Inv. N. Inv. 56.196

TESIS

RICARDO ABEL ZAMPONI

1988

Tesis 835

El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), bajo la dirección de la Dra. María Cristina Añón.

A mi esposa

A Pablo y Cecilia

A mis padres

A mi abuela

AGRADECIMIENTOS

- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el apoyo financiero aportado para la realización del presente trabajo y al Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) por brindarme sus instalaciones e instrumental necesario para la concreción del mismo.
- A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata por la formación científica que me brindó.
- A las Dras. María Cristina Añón y Alicia Raquel Chaves por el constante apoyo y dedicación en la dirección de este trabajo de tesis.
- A todos mis compañeros del CIDCA, amigos y familiares quienes de alguna manera me alentaron e impulsaron a la concreción del presente trabajo.
- A la Ing. Agr. Alicia Mugridge por su aporte crítico y colaboración en la realización del presente trabajo.
- Al Dr. Jorge R. Wagner por su dedicación y empeño en la realización de los gráficos.
- A los Ing. Agr. Pedro Ballati, Jorge Willemoës y Juan José Guiamet por su aporte crítico y apoyo al presente trabajo.
- Y a la Sra. Silvia A. Moya por su excelente desempeño y dedicación en el mecanografiado de este trabajo.

ABREVIATURAS

ACC	ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
Ade	adenina
Ado	adenosina
ADA	ácido aminooxiacético
ATP	adenosiltrifosfato
AVG	aminovinilglicina
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilendiaminotetra acético
fru	fructosa
glu	glucosa
Hepes	ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etansulfónico
IAA	ácido indolacético
LSD	menor diferencia significativa
MACC	N-malonil ACC
MET	metionina
MTA	metil adenina
MTR	metil tiorribosa
P.F.	peso fresco
ppm	partes por millón
PVP	polivinil pirrolidona
Sac	sacarosa
SAM	S-adenosilmetionina

INDICE

	Página
Abreviaturas	iv
INTRODUCCION	
1.1. IMPORTANCIA DEL TOMATE	1
1.2. ESTRUCTURA Y COMPOSICION DEL FRUTO	1
1.3. MADURACION DE LOS FRUTOS	4
1.4. BIOSINTESIS DE ETILENO	6
1.5. PERDIDAS POSTCOSECHA	11
1.6. REDUCCION DE PERDIDAS POSTCOSECHA	13
1.6.1. Almacenamiento a baja temperatura	14
1.6.2. Almacenamiento en atmósfera modificada o controlada	14
1.6.3. Otros sistemas de almacenamiento	15
1.7. HIPOTESIS DE TRABAJO	16
1.8. OBJETIVOS	16
MATERIALES Y METODOS	
2.1. EXPERIENCIAS CON DISCOS DE PERICARPIO	18
2.1.1. Material vegetal	18
2.1.2. Incubación	18
2.2. EXPERIMENTOS CON TOMATES ENTEROS	19
2.2.1. Material vegetal	19
2.2.2. Almacenamiento	19
2.3. PREPARACION DE LAS MEZCLAS GASEOSAS	21
2.3.1. Método dinámico	21
2.3.2. Método estático	21
2.4. REGULACION DE LA CONCENTRACION DE DIOXIDO DE CARBONO	23
2.5. ANALISIS DE LAS ATMOSFERAS	23
2.6. DETERMINACION DE METABOLITOS	24
2.6.1. Determinación del contenido de ACC	24
2.6.1.1. Extracción de ACC	24
2.6.1.2. Determinación de ACC	25
2.6.2. Determinación del contenido de MACC	25
2.6.2.1. Extracción de MACC	25
2.6.2.2. Determinación de MACC	26
2.6.3. Determinación del contenido de azúcares solubles	26
2.6.3.1. Extracción de azúcares solubles	26
2.6.3.2. Separación de azúcares por TLC	26

	Página
2.6.4. Determinación de etileno	28
2.7. DETERMINACION DE ENZIMAS	29
2.7.1. ACC sintetasa	29
2.7.1.1. <i>Obtención de extracto crudo de ACC sintetasa</i>	29
2.7.1.2. <i>Determinación de la actividad de la ACC sintetasa</i>	30
2.7.2. Invertasa	30
2.7.2.1. <i>Extracción de invertasa</i>	30
2.7.2.2. <i>Determinación de la actividad de la invertasa</i>	31
2.8. DETERMINACION DE PROTEINAS SOLUBLES	31
2.9. DETERMINACION DEL COLOR SUPERFICIAL	32

RESULTADOS Y DISCUSION

EFFECTO DE LA ATMOSFERA SOBRE LA SINTESIS DE ETILENO, SISTEMAS "IN VITRO"

3.1. CONVERSION DE ACC EN ETILENO	33
3.1.1. Elección de las condiciones de ensayo	34
3.1.1.1. <i>Producción de etileno en función del tiempo</i>	34
3.1.1.2. <i>Efecto del ACC sobre el sistema formador de etileno</i>	35
3.1.1.3. <i>Efecto de la luz sobre la producción de etileno</i>	39
3.1.2. Estudio del efecto de la composición de la atmósfera sobre la vía de síntesis de etileno	43
3.1.2.1. <i>Efecto del oxígeno sobre la conversión de ACC a etileno</i>	43
3.1.2.2. <i>Efecto del dióxido de carbono en la transformación de ACC a etileno</i>	45
3.2. CONVERSION DE SAM EN ACC	49
3.2.1. Efecto de la composición de la atmósfera sobre la conversión de SAM a ACC	51
3.2.1.1. <i>Efecto del oxígeno sobre la conversión de SAM a ACC</i>	51
3.2.1.2. <i>Efecto del dióxido de carbono sobre la conversión de SAM a ACC</i>	52
3.3. CONCLUSIONES	54

INFLUENCIA DEL DIOXIDO DE CARBONO Y LA TEMPERATURA SOBRE EL PROCESO DE MADURACION DE TOMATES

4.1. EFECTO DE LA ATMOSFERA MODIFICADA SOBRE LA PRODUCCION DE ETILENO	58
4.2. EFECTO DE LA ATMOSFERA MODIFICADA SOBRE EL DESARROLLO DE COLOR	62
4.3. VARIACION DEL CONTENIDO DE ACC DURANTE EL ALMACENAMIENTO	66
4.4. VARIACION DEL CONTENIDO DE MACC DURANTE EL ALMACENAMIENTO	75

	Página
4.5. VARIACION DEL CONTENIDO DE AZUCARES SOLUBLES DURANTE EL ALMACENAMIENTO	80
4.5.1. Cambios del contenido de glucosa y fructosa durante el almacenamiento	82
4.5.2. Cambios en el contenido de sacarosa durante el almacenamiento	84
4.6. VARIACION DEL CONTENIDO DE INVERTASA DURANTE EL ALMACENAMIENTO	87
4.7. CONCLUSIONES	91
 CONCLUSIONES	
MODO DE ACCION DEL DIOXIDO DE CARBONO SOBRE LA VIA DE SINTESIS DE ETILENO	93
BIBLIOGRAFIA	97

INTRODUCCION

1.1. IMPORTANCIA DEL TOMATE

El tomate es un fruto de clima cálido, perteneciente a la familia de las Solanaceae la que también incluye a papas, berenjenas, pimientos; todos ellos de gran importancia económica.

Su género es *Lycopersicon*, el cual comprende dos especies *L. pimpinellifolium* y *L. esculentum* (Bailey, 1949). Esta última especie es la que tiene mayor importancia comercial.

La producción mundial de tomate se incrementó en la década del setenta de 34,76 a 50,15 millones de toneladas (FAO, 1981). Este incremento se debió parcialmente al aumento de área sembrada, la que pasó de 1,935 a 2,389 millones de hectáreas. Los mayores productores de tomates en el año 1980 fueron Estados Unidos, Rusia, China, Italia, Turquía, Egipto y España. Nuestro país mostró las mismas variaciones observadas a nivel mundial, en el término de 4 años (82/86) la producción aumentó de 572 a 824 miles de toneladas y el área sembrada de 29,3 a 38,7 miles de hectáreas. Las zonas de mayor producción se encuentran en las provincias de Mendoza, Buenos Aires y Santiago del Estero con 23,3; 20,0 y 17,7% del total, respectivamente (INDEC, enero-marzo, 1987).

1.2. ESTRUCTURA Y COMPOSICION DEL FRUTO

El cuerpo de este fruto conocido como pericarpio se desarrolla a partir de la pared del ovario. Su interior presenta cavidades locales que contienen las semillas en un tejido

parenquimatoso de consistencia viscosa originado en la placenta. La Figura 1 muestra un corte transversal de un fruto maduro en el que se han indicado las partes que lo constituyen.

El fruto está compuesto fundamentalmente por agua siendo su contenido del 91% en estado inmaduro y de 93% en el maduro. Los azúcares solubles también se hallan en un nivel importante ya que constituyen el 1,5 - 4,5% del peso fresco del fruto. Entre ellos glucosa y fructosa son los que predominan, encontrándose también sacarosa pero en una proporción menor (0,4%). Además, se ha detectado la presencia de una cetoheptulosa y de rafinosa en cantidades muy pequeñas (Williams y Bevenue, 1954; Airan y Barnabas, 1953). Algunas especies del género *Lycopersicon*, ampliamente utilizadas como material genético, contienen gran cantidad de sacarosa y niveles relativamente pequeños de glucosa y fructosa (Davies, 1966).

El tomate también contiene almidón. Sando (1920) halló que el contenido de este polisacárido decrece desde el 1% en fruto inmaduro hasta el 0,1 - 0,15% en fruto maduro. Otros autores han informado contenidos inferiores en el fruto maduro, del orden de 0,012 - 0,052% (Rosa, 1925, 1926; Saywell y Cruess, 1932).

Este fruto tiene gran importancia como fuente de vitamina C (ácido ascórbico) ya que contiene en promedio 25 mg/100 g de peso fresco (Olliver, 1967). No existen datos concluyentes respecto de las variaciones que puede sufrir el contenido de este compuesto durante el proceso de maduración. Varios autores han informado que el contenido de vitamina C permanece constante

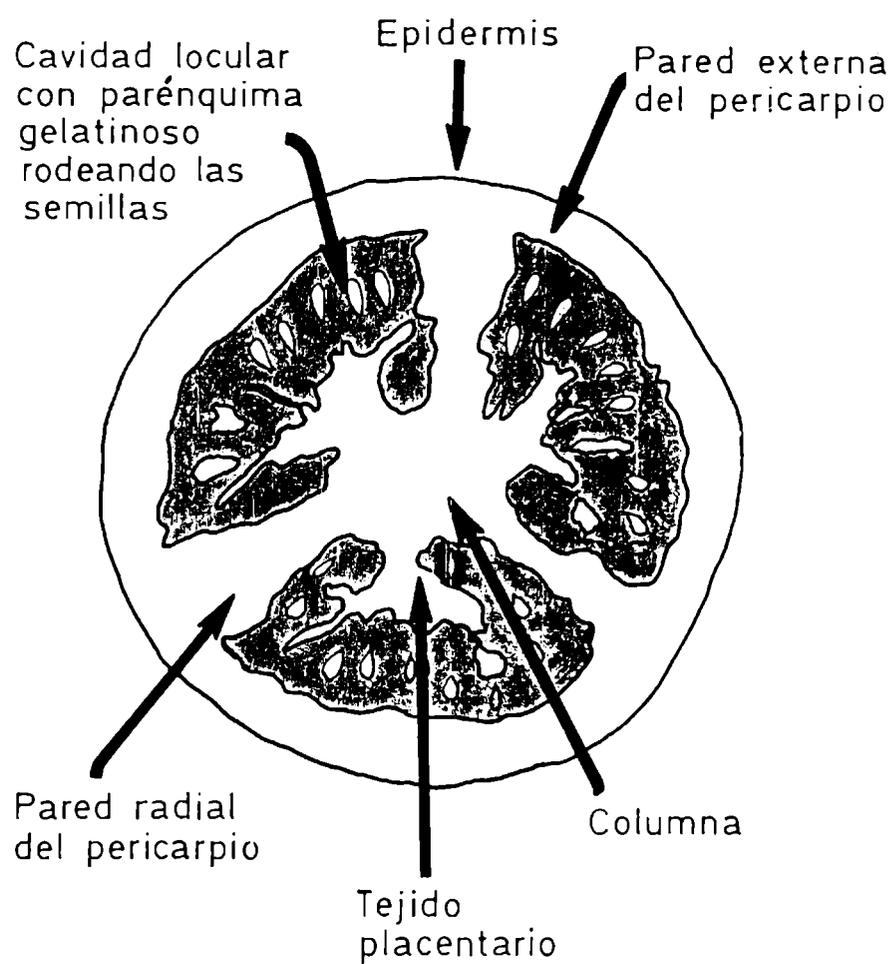


Figura 1: Corte transversal de un tomate maduro.

durante dicho proceso (Maclinn y Fellers, 1938; Wokes y Orgon, 1943; Kaski y col., 1944). Sin embargo, otros autores han encontrado un aumento en vitamina C a medida que el fruto madura (Georgiev y Balzer, 1962; Fryer y col., 1954; Dalal y col., 1965, 1966). También se ha detectado un mayor contenido en ácido ascórbico en variedades de tomate que maduran más rápido (Clutter y Miller, 1961).

El color superficial de los tomates es de gran importancia, ya que constituye uno de los principales criterios de calidad para estos frutos. El color verde del estado inmaduro se debe a la presencia de clorofilas, el contenido de las mismas disminuye a medida que avanza el estado de madurez de los frutos. Asimismo, durante el proceso de maduración hay síntesis de pigmentos, tales como β -caroteno, xantofilas y licopeno, siendo este último el responsable de la coloración roja característica de este fruto.

1.3. MADURACION DE LOS FRUTOS

Se conoce como maduración a una serie de eventos metabólicos que provocan cambios en la coloración, desarrollo de aroma, ablandamiento del fruto, etc.

Los frutos pueden clasificarse en climatéricos y no climatéricos según la variación de la actividad respiratoria durante el proceso de maduración. En los frutos climatéricos hay una elevación de la respiración acompañando la maduración, este pico en la actividad respiratoria está sincronizado con

todos los cambios que ocurren en la maduración. Algunos frutos pertenecientes a este grupo son tomate, pera, manzana, banana, etc.

En los frutos no climatéricos la actividad respiratoria no manifiesta un incremento en su valor durante la maduración. Los frutos más característicos pertenecientes a este grupo son limones, naranjas, pepinos, etc.

La variación en la producción de etileno durante la madurez constituye una manera adicional de distinguir los frutos climatéricos de los no climatéricos. El aumento de la actividad respiratoria es acompañado por un incremento similar en la producción de etileno (Burg, 1962; Burg y Burg, 1965a, 1965b). Aunque el aumento en la síntesis de esta hormona puede preceder (banana), coincidir (pera, palta) o suceder (manzana) al aumento de la actividad respiratoria. La concentración interna de etileno en frutos climatéricos es muy amplia y puede oscilar entre unas pocas ppm (2-3) a más de 2000 ppm. En los frutos no climatéricos el nivel de esta hormona durante la maduración permanece en valores muy bajos del orden de 0,1 - 1,0 ppm sin sufrir ningún incremento.

Estas dos clases de frutos también pueden diferenciarse en su respuesta a la aplicación de etileno. En los frutos climatéricos tratamientos con 1 ppm de esta hormona provoca un adelanto en el incremento de la actividad respiratoria, siendo la magnitud del climaterio relativamente independiente de la concentración de etileno aplicada. Al tratar con etileno los frutos no climatéricos se observa un aumento de la actividad

respiratoria cuya magnitud depende de la concentración de etileno aplicada. Un segundo tratamiento a estos frutos con dicha hormona, a diferencia de lo que ocurre con los frutos climatéricos provoca un nuevo aumento en la actividad respiratoria.

La importancia de un hidrocarburo en la maduración de los frutos ya se conocía a principio de siglo, cuando se empleaban quemadores de kerosene para provocar el desverdizado de limones y promover la maduración de bananas. Asimismo, tempranamente se estableció que ciertos frutos y otros tejidos vegetales producían pequeñas cantidades de etileno. Actualmente se considera que el etileno es la hormona que controla el proceso de maduración, iniciándolo en los frutos climatéricos. En ello radica la importancia del estudio de su biosíntesis y modo de acción.

1.4. BIOSINTESIS DE ETILENO

Con el fin de estudiar cuáles son los precursores de esta hormona, en una primera instancia se trabajó con sistemas modelo. Es así como Lieberman y Mapson (1964) descubrieron que por peroxidación el ácido linolénico es degradado a etano, etileno y otros hidrocarburos en presencia de Cu^{+2} y ácido ascórbico. Para verificar si el sistema de peroxidación de ácido linolénico es mediado por radicales libres, los mismos autores adicionaron al sistema metionina, un atrapador de radicales libres. Este agregado produjo contrariamente a lo esperado un gran incremento en la producción de etileno. La metionina puede actuar

como precursor de etileno en el sistema Cu^{+2} -ácido ascórbico en ausencia de linolato peroxidasa. El etileno es derivado de los carbonos 3-4 de la metionina (Lieberman y col., 1965).

Poco después del descubrimiento de Lieberman y col., se comprobó que la metionina servía como precursor de etileno en otros sistemas modelo. La evidencia directa para este mecanismo en el organismo vivo fue dada por Lieberman y col. (1966) quienes hallaron que la metionina marcada en discos de pericarpio de manzana era eficientemente convertida en etileno y como en los sistemas modelo derivaba de los carbonos 3-4.

El hecho que los carbonos 3-4 de la metionina producen etileno tanto en los sistemas químicos como en los sistemas vivos, sugiere que los mecanismos intervinientes en ambos son similares. Sin embargo, la metionina deriva en etileno en los sistemas químicos vía metional el cual no actúa como precursor de esta hormona en los sistemas biológicos.

Burg (1973) y Murr y Yang (1975) sugirieron que S-adenosilmetionina (SAM) era un intermediario de la biosíntesis de etileno basados en el hecho que la conversión de etileno requiere oxígeno y es inhibida por dinitrofenol. Las evidencias experimentales para esta aseveración fueron obtenidas por Adams y Yang (1977) quienes consideraron que si el etileno es derivado del SAM, la metiladenina (MTA) debería ser un producto de la degradación de dicho metabolito. Ellos administraron metionina marcada a tejido de manzana y encontraron que paralelamente a la producción de etileno había un aumento de MTA y metiltiorribosa (MTR), un producto de hidrólisis del MTA. Cuando la

producción de etileno fue inhibida por aminovinilglicina (AVG), no se detectaron en el tejido ni MTR ni MTA.

Desde hace mucho tiempo se conoce que las atmósferas de nitrógeno inhiben la producción de etileno (Hansen, 1942; Burg y Thimann, 1959). Esta situación se revierte al reponer el tejido al aire. Adams y Yang (1979) compararon el metabolismo de metionina en aire y en atmósfera de nitrógeno y observaron que, mientras en aire la metionina era eficientemente convertida en etileno, en la atmósfera de nitrógeno se formaba MTR y un compuesto posteriormente identificado como ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). Al transferir el tejido mantenido en anaerobiosis al aire el ACC se transformaba rápidamente en etileno, indicando que este metabolito es uno de los intermediarios en la vía de síntesis de dicha hormona. En base a todo lo expuesto la secuencia de síntesis de etileno sería:



El AVG, conocido inhibidor de reacciones de enzimas mediadas por fosfato de piridoxal (Rando, 1974) inhibe intensamente la conversión de metionina a etileno, no así la transformación de MET a SAM, ni la conversión de ACC a etileno. Estos resultados indican que este inhibidor actúa en el paso de conversión de SAM a ACC y en consecuencia que el mismo está mediado por una enzima dependiente del fosfato de piridoxal (Adams y Yang, 1979).

Boller y col., (1979) mostraron que un extracto libre de

células preparado a partir de tomate era capaz de convertir SAM en ACC, la enzima interviniente en dicha conversión era soluble e intensamente inhibida por AVG y utilizaba SAM específicamente como sustrato siendo su K_m del orden de $13 \mu M$. Yu y col. (1979) empleando SAM marcado en una preparación enzimática de tomate confirmaron que el mismo fue convertido en ACC y MTR. Estos mismos autores mostraron que bajas concentraciones de fosfato de piridoxal activan a la ACC sintetasa (enzima responsable de la transformación de SAM a ACC) y que dicha enzima era inhibida por el ácido aminooxiacético (AOA) (otro conocido inhibidor de enzimas dependientes del fosfato de piridoxal) (Yu y col., 1979). Su peso molecular es del orden de 55.000 daltons (Acaster y Kende, 1982) y su pH óptimo es de 8,0-8,5 (Boller y col., 1979; Yu y col., 1979).

La purificación de la ACC sintetasa en tomate ha sido difícil dado que su concentración es muy baja y es altamente inestable. Acaster y Kende (1982) informaron haber purificado esta enzima unas setenta veces después de una precipitación fraccionada con $SO_4(NH_4)_2$, filtración en gel, cromatografía de afinidad y cromatografía de interacción hidrofóbica.

Actividad de ACC sintetasa fue encontrada en melones (Hofman y Yang, 1982a), hipocotiledones de garbanzo (Yoshii e Imaseki, 1981), tejido de piel de pepino (Wang y Adams, 1982), cáscara de naranja (Riov y Yang, 1982), etc.

Cuando ACC fue administrado a varios órganos de plantas de distintas especies se observó un incremento en la síntesis de etileno (Cameron y col., 1979; Lurssen y col., 1979). Esto

sugiere que el sistema formador de etileno es constitutivo y que la formación de ACC es la etapa limitante en estos tejidos.

Varios compuestos lipofílicos tales como fosfatidilcolina, tween 20, tritón X-100, así como tratamientos de shock osmótico, los cuales pueden modificar la estructura de las membranas, reducen grandemente en tejido de plantas la velocidad de síntesis de etileno (Imaseki y Watanabe, 1978; Odawara y col., 1977). Estos tejidos al ser homogeneizados pierden la capacidad de formación de hormona. Estas observaciones han sugerido que el sistema formador de etileno es altamente estructurado y que requiere la integridad de membrana (Lieberman, 1979).

Investigaciones llevadas a cabo por Hoffman y col. (1982c) mostraron que a pesar que el ACC es una molécula con simetría, el sistema formador de etileno posee estereodiscriminación para grupos metilos equivalentes.

Recientemente Guy y Kende (1984) observaron que vacuolas aisladas de protoplastos retienen el 80% de la producción de etileno de los protoplastos. Este sistema posee estereodiscriminación, concordando con los resultados antes mencionados. Además es sensible a Co^{+2} y a disruptores de membrana; por lo que los autores concluyen que la vacuola es uno de los sitios en donde se produce etileno, pero no el único.

Si a frutos climatéricos inmaduros se le administra etileno se desencadenan los procesos que conducen a la maduración de los frutos y además se produce un aumento de la síntesis de etileno. Este aumento es debido a la estimulación autocatalítica del etileno, efecto debido a la inducción producida por

esta hormona de las enzimas intervinientes en su síntesis (Buefler, 1984, 1986; Liu y col., 1985).

El etileno no es el único metabolito en que puede derivar el ACC. Hoffman y col. (1982b) hallaron que el mismo puede ser transformado además en N-malonil-ACC (MACC). Varios tejidos tienen capacidad de transformar el ACC a MACC (Amrhein y col., 1981). Este metabolito no se convierte en etileno y su transformación a ACC es casi irreversible (Hoffman y col., 1983a, 1983b).

En la Figura 2 se resume el estado actual de conocimiento en la vía de síntesis de etileno.

1.5. PERDIDAS POSTCOSECHA

Es conocido que entre la cosecha y el consumo de productos hortifrutícolas, existen grandes pérdidas, debidas a diferentes factores. Estas son las denominadas pérdidas postcosecha.

Varios autores han informado que en el caso del tomate este tipo de pérdidas son muy altas, algunos hablan del 20 - 50% (Coursey, 1971; Steppe, 1976). En Nigeria un 21% de las pérdidas se producen por enfermedades de campo y entre el 5 y 20% se deben a descarte en el mercado (Onesirosan y Fatunla, 1976). En la República Dominicana el 42% de las pérdidas postcosecha se producen antes de entrar al mercado por estar los tomates sobremaduros (Mendoza, 1977).

En la Argentina no existen estadísticas sobre el porcentaje

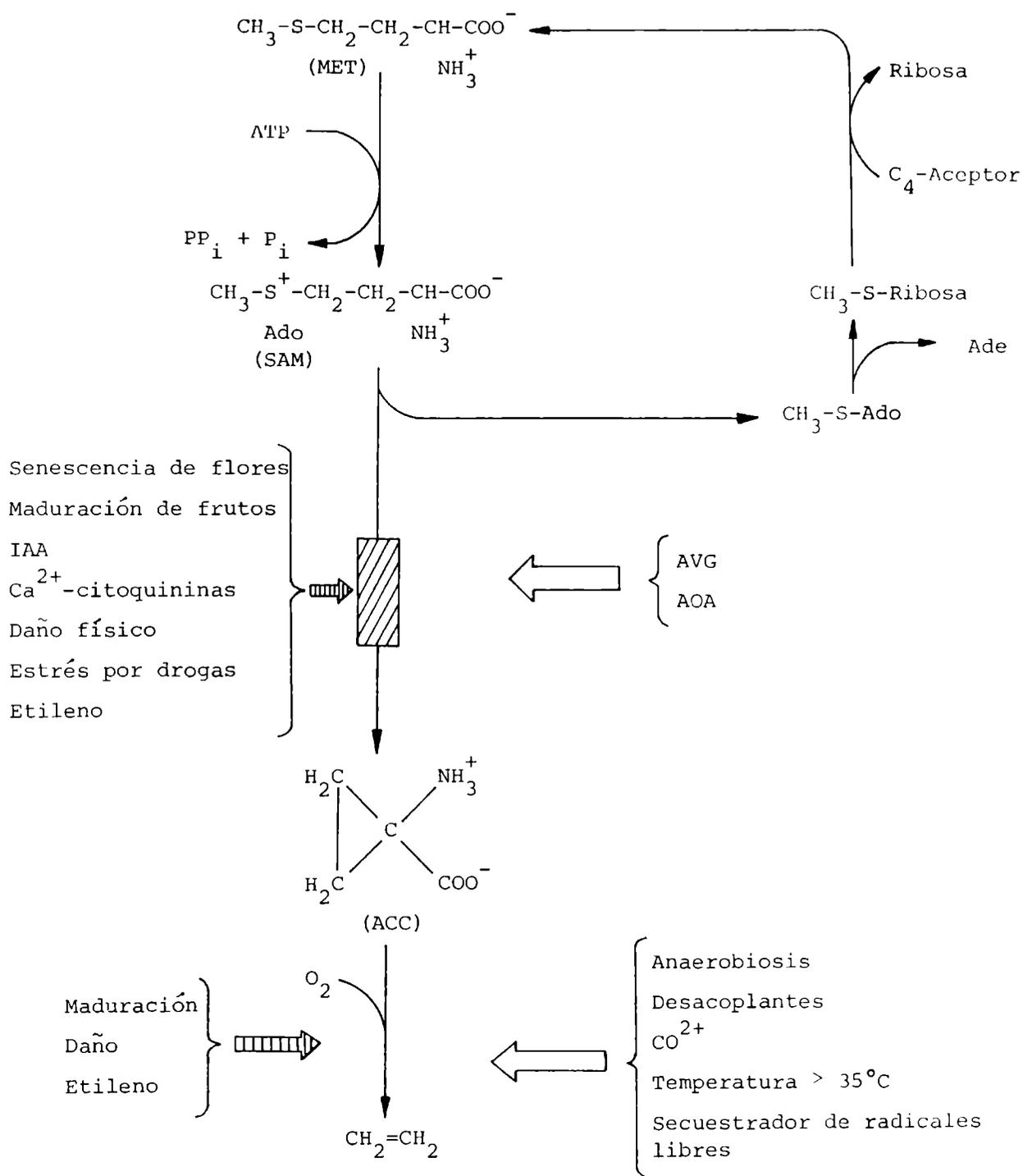


Figura 2: Regulación de la biosíntesis de etileno.  esta reacción es normalmente suprimida y es la etapa limitante de la velocidad de la vía; : inducción de la síntesis de la enzima; : inhibición de la reacción. MET, Ado y Ade son los símbolos usados para metionina, adenosina y adenina, respectivamente.

de pérdidas postcosecha. No obstante, se sabe que las principales causas que las provocan son el daño mecánico y sobremaduración de los frutos.

Las causas principales que ocasionan las pérdidas postcosecha en tomate son de distinta naturaleza:

Biológicas: consumo y daño por insectos, pájaros, grandes animales, bacterias, hongos, etc.

Químicas y bioquímicas: reacciones no deseables de los compuestos presentes, contaminación de los tomates con pesticidas, etc.

Mecánicas: debidas a golpes durante el manejo de los frutos.

Físicas : excesivo calor o frío, deficiente frío, atmósfera no apropiada durante el almacenamiento.

Fisiológicas: senescencia de los frutos, maduración anormal, tumores y demás enfermedades.

1.6. REDUCCION DE PERDIDAS POSTCOSECHA

Dada la gran importancia económica que tienen estas pérdidas resulta indispensable su reducción.

El problema puede ser abordado desde diferentes ángulos, siendo uno de ellos el de prolongar la vida comercial de los frutos sin desmedro de su calidad. Esto se puede lograr mediante un adecuado almacenamiento.

1.6.1. Almacenamiento a baja temperatura

El uso de las bajas temperaturas, pero superiores al punto de congelamiento del tejido vegetal, constituye el método de conservación más tradicional para los productos hortifrutícolas frescos, ya que reduce los deterioros debido a la maduración, senescencia y enfermedades. No existe una única temperatura ideal para el almacenamiento refrigerado de estos productos, debido a la amplitud de sus respuestas a las bajas temperaturas.

Así, existen frutos que sufren daños fisiológicos cuando se los expone un cierto tiempo a temperaturas cercanas al punto de congelación. En algunos productos el grado de sensibilidad al frío depende del estado de madurez. Este es el caso del tomate, el cual es muy propenso a sufrir daños por frío cuando se lo almacena en su estadio verde-maduro, por lo cual la temperatura de la cámara debe estar entre 10 - 12°C. Por el contrario cuando ya ha madurado no sufren daños por frío y la temperatura de conservación debe ser necesariamente inferior.

1.6.2. Almacenamiento en atmósfera modificada o controlada

El almacenamiento de frutos a baja temperatura puede llevarse a cabo en aire (refrigeración normal) o en una atmósfera de composición distinta al aire (refrigeración en atmósfera modificada o controlada). Las atmósferas más utilizadas para retrasar la maduración son las empobrecidas en oxígeno con o sin altos contenidos de dióxido de carbono en la atmósfera.

En el caso de tomate se han utilizado con éxito atmósferas conteniendo 3% O₂, 97% N₂ (Parson y col., 1970); 4% CO₂, 92% N₂ (Goodenough y col., 1982); 1, 3, 10% O₂, resto N₂ (Salunkhe y Wu, 1973), 4 - 8% O₂, 1 - 2% CO₂ y resto N₂ (Dennis y col., 1979).

1.6.3. Otros sistemas de almacenamiento

Buescher (1979) estudió la influencia del dióxido de carbono sobre la maduración y deterioro postcosecha de tomates. Dicho autor encontró que la producción de etileno y el desarrollo de color era menor en los frutos expuestos al dióxido de carbono en una concentración del orden del 20%, tenores mayores de dicho gas producen un deterioro marcado de los frutos. También se han estudiado tratamientos intermitentes con altas concentraciones de dióxido de carbono, con el fin de reducir el deterioro que produce dicho gas (Buescher, 1979; Marcellin y Chaves, 1982).

Otro sistema que se ha empleado en el almacenamiento de tomates es la atmósfera hipobárica. Esta técnica se fundamenta en el hecho que al disminuir la presión de la atmósfera se elimina el etileno y los gases de la respiración producidos por los frutos. Al extraer de la atmósfera el etileno, y al hallarse el oxígeno en una baja concentración (lo que inhibe la síntesis de etileno además de disminuir la velocidad de respiración) se aumenta el tiempo de vida útil de los frutos. Wu y col. (1972) usando esta técnica lograron aumentar la vida

comercial de tomates por 65, 52 y 30 días usando una presión de 102, 278 y 471 mm Hg respectivamente.

1.7. HIPOTESIS DE TRABAJO

Es conocido desde hace tiempo, que el etileno desencadena el proceso de maduración de los frutos climatéricos. Asimismo, se ha encontrado en frutos tratados con esta hormona un aumento de las enzimas intervinientes en su síntesis; efecto que es inhibido por altas concentraciones de dióxido de carbono. Estos hechos nos llevaron a pensar que el dióxido de carbono podría ejercer su acción a través de la reducción de la cantidad y/o actividad de alguna o algunas de las enzimas intervinientes en la formación de etileno lo que provocaría una disminución de su nivel y por ende una demora en la maduración de los frutos.

1.8. OBJETIVOS

Mediante el presente estudio se intentará determinar el modo de acción de las atmósferas modificadas (enriquecidas en dióxido de carbono y/o empobrecidas en oxígeno) sobre la vida de síntesis de etileno. En una primera etapa se trabajará en sistemas "in vitro" (discos de pericarpio de tomate y extractos enzimáticos de ACC sintetasa) como aproximación al fruto entero. Posteriormente se realizarán experimentos de

almacenamiento con fruto entero, a fin de corroborar los resultados obtenidos en las experiencias "in vitro" y estudiar otros cambios metabólicos que se producen durante el almacenamiento y maduración de tomates.

MATERIALES Y METODOS

2.1. EXPERIENCIAS CON DISCOS DE PERICARPIO

2.1.1. Material vegetal

Se trabajó con tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill c.v. Platense) en el estado verde maduro. A partir de estos tomates se obtuvieron, por medio de un sacabocado, discos de 0,8 cm de diámetro y 3 mm de espesor, a los que se les quitó la piel quedando los discos formados sólo por pericarpio. Dichos discos permanecieron a 28°C durante una noche en oscuridad sobre papel de filtro mojado con agua destilada, a efectos de eliminar el etileno producido por el corte del tejido.

2.1.2. Incubación

Cuatro discos de pericarpio de tomate (aproximadamente un gramo) fueron incubados a 25°C en frascos del tipo penicilina con 3 ml de medio pH = 6,9 conteniendo sorbitol 600 mM, PO_4HNa_2 100 mM y cloranfenicol 50×10^{-6} gr/ml. La fase gaseosa de los frascos se barrió varias veces con la mezcla de composición deseada (2.3.). Los frascos fueron herméticamente sellados mediante un tapón de latex y un prescinto de aluminio. A distintos tiempos se midió la composición de la atmósfera y el etileno producido. En aquellos experimentos donde se incubaron los discos en atmósferas enriquecidas en dióxido de carbono se utilizó además del buffer fosfato un buffer de $\text{CO}_3\text{H}^- - \text{CO}_3^{-2}$ (véase regulación de la concentración de dióxido de carbono).

En los ensayos donde se deseó aumentar el contenido de

ACC de los discos se incubó el tejido en el medio mencionado anteriormente al que se le adicionó ACC en la concentración adecuada.

2.2. EXPERIMENTOS CON TOMATES ENTEROS

2.2.1. Material vegetal

Se trabajó con tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill c.v. Platense). Los tomates fueron cosechados en el estado verde maduro el día anterior a ser utilizados.

2.2.2. Almacenamiento

Para almacenar los tomates enteros se utilizaron celdas cúbicas de 27 cm de lado con una tapa superior que garantizaba una adecuada hermeticidad. En la parte superior existían dos perforaciones, por una de ellas ingresaba la mezcla de gases y la otra estaba conectada a una "T" de vidrio que poseía un extremo obturado con un septum y otro que pescaba en el agua destilada contenida en un tubo de ensayo. Este dispositivo se utilizó para tomar las muestras gaseosas (Figura 3).

Lotes de 25-30 tomates fueron ubicados en las celdas a las cuales se les hizo pasar durante todo el almacenamiento la mezcla gaseosa de composición deseada o aire humidificado.

En los ensayos realizados a la temperatura de almacenamiento de $10 \pm 2^\circ\text{C}$ las celdas se ubicaron en una cámara frigorífica; en tanto que cuando se trabajó a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ las mismas

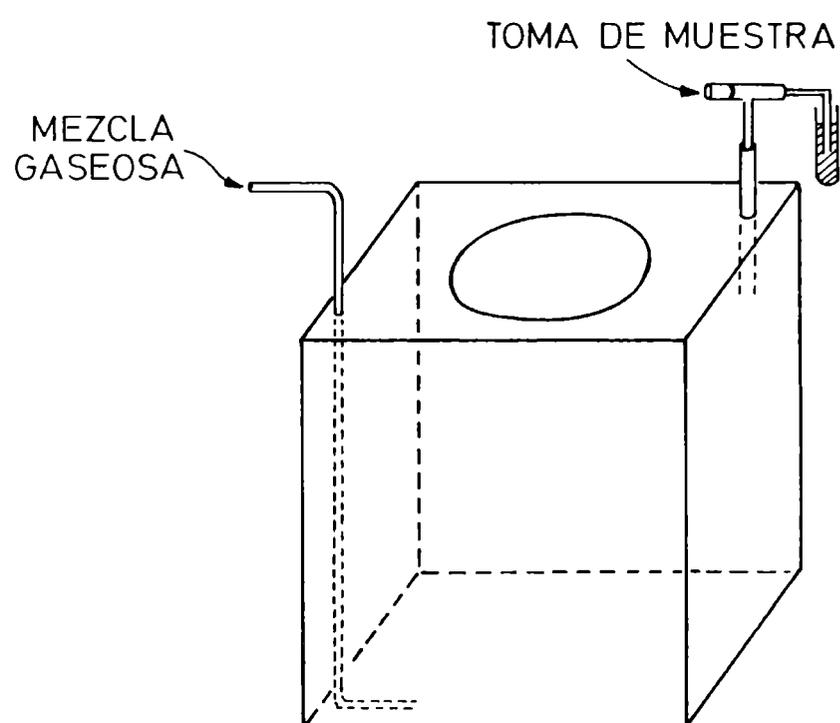


Figura 3: Esquema de la celda utilizada en el almacenamiento de frutos enteros.

permanecieron en un cuarto de temperatura controlada.

2.3. PREPARACION DE LAS MEZCLAS GASEOSAS

2.3.1. Método dinámico

Esta técnica se utilizó en la preparación de atmósferas empobrecidas en oxígeno y enriquecidas en dióxido de carbono y en aquéllas solamente empobrecidas en oxígeno. Este método consiste en mezclar aire con un volumen adecuado de nitrógeno (en el caso de atmósferas con oxígeno disminuído) y dióxido de carbono (en las empobrecidas en oxígeno y enriquecidas en dióxido de carbono). En la figura 4 se muestra un diagrama del equipo usado. Independientemente de los gases a mezclar siempre existe una primera etapa de humidificación de los mismos. En una segunda etapa se regula el caudal de cada uno de los gases mediante un capilar calibrado. Se empleó una fuga con el fin de mantener el caudal constante.

2.3.2. Método estático

Esta técnica se utilizó para preparar mezclas gaseosas enriquecidas en dióxido de carbono donde el nivel de oxígeno permaneció en 21%. La misma consiste en la adición de oxígeno, dióxido de carbono y nitrógeno en cantidades adecuadas a una garrafa para gases. La garrafa permaneció en reposo un día, se sacó una muestra y se determinó la composición de la mezcla resultante como se describirá más adelante (sección 2.5.).

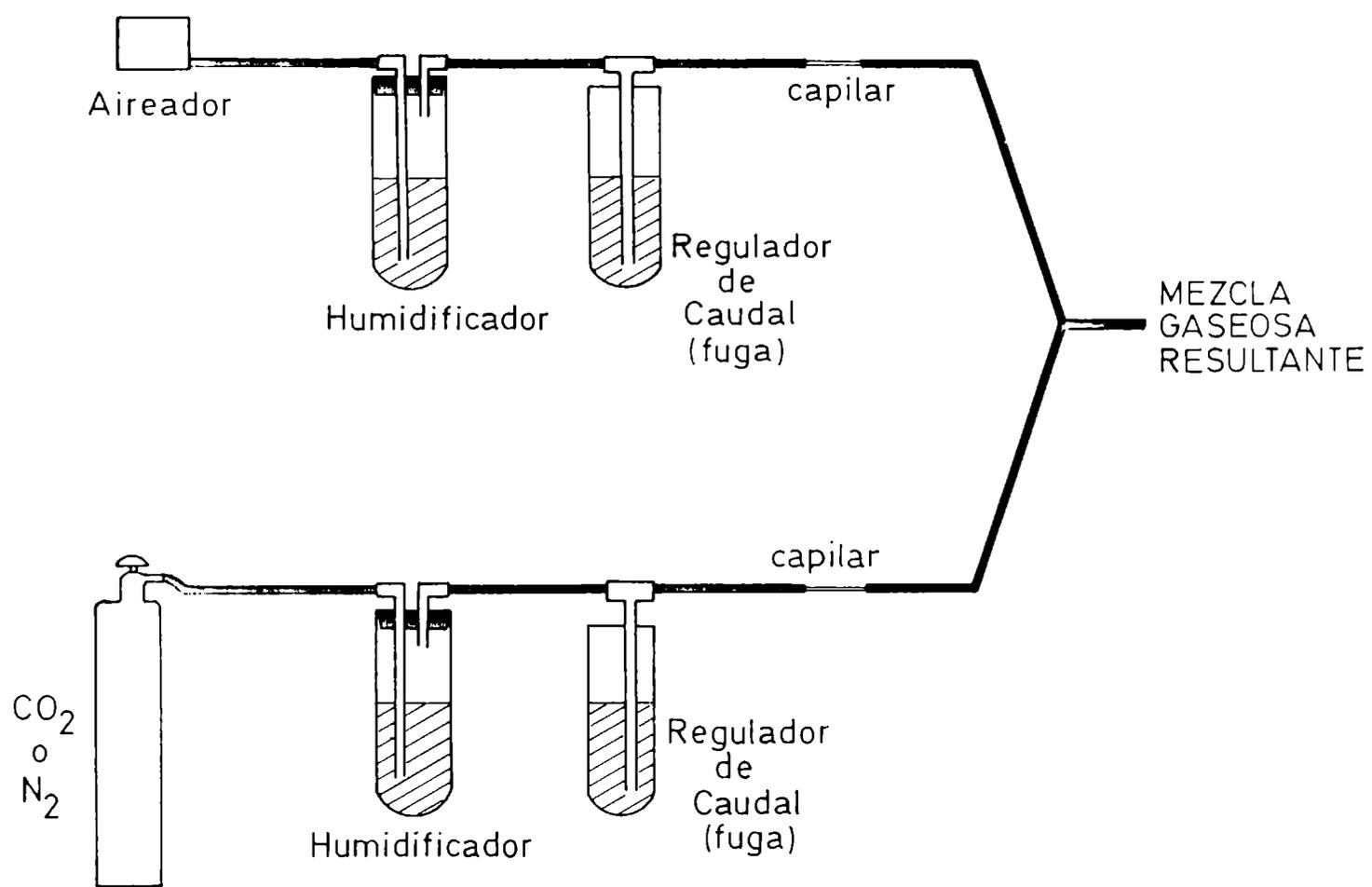


Figura 4: Esquema del dispositivo utilizado para la preparación de las mezclas gaseosas por el método dinámico.

2.4. REGULACION DE LA CONCENTRACION DE DIOXIDO DE CARBONO

Las concentraciones de dióxido de carbono atmosféricas en los frascos de incubación se simularon utilizando mezclas de bicarbonato-dióxido de carbono (Ranson y col., 1960; Bendall y col., 1960). Las concentraciones molares de las soluciones de CO_3H^- correspondientes a los distintos porcentajes de CO_2 y diferentes temperaturas se calcularon mediante la ecuación de Henderson-Hasselbach (1), (Umbreit y col., 1949).

$$\text{pH} = \text{pK} + \log (\text{CO}_3\text{H}^-) - \log \frac{\alpha P \cdot \% \text{CO}_2}{760 \times 2240} \quad (1)$$

donde:

pH es el pH deseado.

pK = - log K; (donde K es la constante de equilibrio para la primera disociación del CO_3H_2).

P = presión atmosférica en mm de Hg.

α = solubilidad del CO_2 .

% CO_2 = porcentaje de CO_2 del gas en equilibrio a la presión atmosférica.

Para el cálculo se tomó P = 760 mm Hg y pH = 6,9.

De esta manera se preparó una solución de CO_3H^- de molaridad que correspondía a una concentración en equilibrio de CO_2 igual al 20%, la que se estabilizó mediante el pasaje de una mezcla gaseosa conteniendo 20% CO_2 , 16% O_2 y 64% N_2 .

2.5. ANALISIS DE LAS ATMOSFERAS

Para determinar la composición de los gases de la atmósfera

de los frascos, de las mezclas gaseosas preparadas o de las atmósferas de las celdas de almacenamiento se extrajo una muestra de la fase gaseosa de 0,025 ml. El análisis de dicha muestra se realizó en un cromatógrafo gaseoso Shimadzu GC-6A usando un detector de conductividad térmica y dos columnas conectadas en serie, una de sílica gel a 117°C y la otra de tamiz molecular 5A a 0°C. La corrida se llevó a cabo a 117°C. Como carrier se usó hidrógeno a un caudal de 0,90 ml/hr.

2.6. DETERMINACION DE METABOLITOS

2.6.1. Determinación del contenido de ACC

2.6.1.1. *Extracción de ACC*

En los experimentos que se llevaron a cabo con discos, éstos se sacaron del medio de incubación al cabo de 3 horas, se lavaron varias veces con agua destilada y se guardaron a -60°C hasta su procesamiento.

En los ensayos realizados con tomates enteros se determinó el contenido de ACC en el pericarpio y en el tomate entero. Se cortó el tomate en octavos, a dos trozos opuestos se les quitó todo el tejido que no fuera pericarpio y otros dos octavos también opuestos se tomaron enteros. Ambos tejidos fueron al igual que los discos almacenados a -60°C.

Todos los tejidos congelados se procesaron de igual forma. Los mismos se trataron con etanol 80% (neutro) en una relación de 3 ml de alcohol por gramo de muestra. Posteriormente

se llevó a ebullición durante 5 minutos, luego se filtró a través de gasa y se centrifugó a 10.000 g durante 15 minutos. Seguidamente se evaporó el alcohol en un evaporador rotatorio Buchi HB140 conectado a una bomba de vacío. La temperatura del baño fue de 40°C. Finalmente el extracto obtenido fue liofilizado y el residuo se resuspendió en agua destilada. Una alícuota del mismo fue utilizada para determinar ACC.

2.6.1.2. *Determinación de ACC*

La determinación de ACC se llevó a cabo por el método de Lizada y Yang (1979). El mismo consiste en oxidar químicamente el ACC a etileno utilizando como oxidante ClO^- en medio alcalino y Hg^{+2} como catalizador. La reacción se realizó a 0°C en un recipiente herméticamente sellado. De la fase gaseosa se tomó una muestra de 0,5 ml y se dosó el etileno formado de la manera descrita en la sección 2.6.4. Con el fin de determinar el porcentaje de conversión de ACC a etileno se realizaron curvas de calibración con ACC adicionado a los frascos conteniendo cantidades conocidas de extracto.

2.6.2. Determinación del contenido de MACC

2.6.2.1. *Extracción de MACC*

La variación de MACC se analizó en los tomates enteros almacenados. La extracción se llevó a cabo de igual manera que para ACC (sección 2.6.1.1.).

2.6.2.2. *Determinación de MACC*

Para la determinación de MACC se utilizó la muestra en donde se determinó ACC, empleando la técnica descrita por Hoffman (1982b). La misma consiste en la hidrólisis del MACC en una solución de HCl 6 N durante 1 hora a 100°C en un frasco de penicilina herméticamente sellado. Una vez transcurrido el tiempo el frasco se abrió y se le adicionó NaOH hasta neutralizar la acidez. El ACC formado se dosó por el método de Lizada y Yang descrito en la sección 2.6.1.2.. El contenido de MACC se calculó por diferencia entre la cantidad de ACC determinada antes y después de la hidrólisis con HCl.

2.6.3. Determinación del contenido de azúcares solubles

2.6.3.1. *Extracción de azúcares solubles*

En los experimentos realizados con tomates enteros se decidió estudiar la variación del contenido de azúcares solubles a lo largo del almacenamiento. Los azúcares se extrajeron con etanol neutro 80% agregándose a un gramo de tejido 3 ml de alcohol. El tejido se procesó como en la extracción de ACC (sección 2.6.1.1.) y MACC (sección 2.6.2.1.).

2.6.3.2. *Separación de azúcares por TLC*

Los azúcares extraídos por la técnica descrita en 2.6.3.1. fueron analizados por cromatografía en capa fina. El soporte usado fue silicagel Kieselgel 60F₂₅₄ marca Merck.

2.6.3.2.1. El solvente de corrida utilizado fue n-propanol/acetato de etilo/agua (70:20:10).

Antes de cada corrida las placas fueron activadas a 110°C durante 1 hora y la cuba saturada con el solvente de corrida.

2.6.3.2.2. Siembra y corrida de la muestra: Las muestras se sembraron en forma puntual a 2 cm del borde inferior de la placa. Los volúmenes sembrados en cada caso fueron:

	Volumen de siembra
Muestras	6×10^{-3} ml
Patrones individuales de azúcares	6×10^{-3} ml
Patrones mezcla de azúcares	6×10^{-3} ml

La corrida duró aproximadamente 4 horas. Se trabajó aproximadamente a $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

2.6.3.2.3. Revelado de las placas: Una vez concluida la corrida, la placa se secó con aire caliente y seguidamente se sumergió en un recipiente conteniendo el líquido revelador. La revelación fue instantánea, luego de lo cual la placa se secó y llevó a estufa a 100-110°C, hasta desarrollo de color.

2.6.3.2.4. Revelador: El revelador empleado contenía 5 ml de anisaldehído, 180 ml de metanol, 5 ml de ácido sulfúrico y 2 ml de ácido acético.

2.6.3.2.5. Densitometría: El color de las manchas se cuantificó por reflexión mediante el empleo de un espectrodensitómetro

Shimadzu de doble haz Scanner CS-910. La longitud de onda empleada fue de 570 nm para la muestra y 395 nm para la referencia. La salida del espectrodensitómetro se conectó a un registrador integrador C-R1A Chromatopac.

2.6.3.2.6. Para el análisis de azúcares se utilizaron patrones individuales de concentraciones conocidas (1 mg/ml) y mezclas de los mismos se preparó de manera tal que la concentración final de cada uno en la mezcla fuera de 1 mg/ml. Así se pudieron obtener los Rf de cada uno de los azúcares e identificar por comparación aquéllos obtenidos en las muestras. El Rf se calculó de acuerdo a la siguiente relación:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por la mancha}}{\text{distancia recorrida por el frente}}$$

en las condiciones de corrida, los Rf de los patrones de azúcares fueron:

rafinosa : 0,21

sacarosa : 0,59

glucosa : 0,65

fructosa : 0,66

2.6.4. Determinación de etileno

Con el fin de dosar el etileno formado ya sea por oxidación química del ACC (método de Lizada) o el producido por discos o tomate entero se tomaron muestras gaseosas de 0,5 ml. El etileno contenido en las mismas se determinó por cromatografía

gaseosa usando un cromatógrafo Shimadzu GC-6A. El detector empleado fue el de ionización de llama, los gases formadores de la misma aire e hidrógeno a una presión de 0,5 y 0,5 Kg/cm² respectivamente. La columna usada fue Porapak Q. La corrida se llevó a cabo isotérmicamente a 117°C, el carrier fue nitrógeno con un caudal 0,60 ml/hr. La salida de este equipo se conectó a un registrador integrador Shimadzu C-R1A Chromatopac

2.7. DETERMINACION DE ENZIMAS

2.7.1. ACC sintetasa

2.7.1.1. *Obtención de extracto crudo de ACC sintetasa*

Se obtuvieron discos de pericarpio de tomates al estado verde maduro tal como se describió en la sección 2.1.. Dichos discos fueron dañados por corte y se los dejó a 28°C en oscuridad por espacio de 3 horas. Al cabo de este tiempo se extrajo la enzima con buffer pH = 8,0 conteniendo Hepes 100 mM, fosfato de piridoxal 8×10^{-6} M, DTT 4 mM, PVP 5% p/v en una relación de 1 ml de buffer por gramo de tejido. Previamente el tejido fue congelado con el fin de favorecer la extracción de la enzima. La homogenización se realizó en un mortero, el que fue mantenido en un baño agua hielo a fin de trabajar a baja temperatura. El buffer fue enfriado en el mismo baño antes de ser usado. Seguidamente el extracto obtenido se filtró a través de gasa y se centrifugó a 10.000 g durante 15 minutos.

2.7.1.2. *Determinación de la actividad de la ACC sintetasa*

Para la determinación de la actividad de la ACC sintetasa se llevó a cabo de la manera descrita por Yu y col. (1979). Se adicionó 0,200 ml del extracto enzimático crudo de ACC sintetasa a 0,400 ml de la mezcla de incubación. El pH de la mezcla resultante fue 8,0 y las concentraciones finales de los componentes presentes en la mezcla de incubación fue Hepes 100 mM, DTT 0,4 mM, fosfato de piridoxal 10^{-5} M y SAM 10^{-5} M. Al cabo de 3 o 4 horas (según la actividad del extracto) se detuvo la reacción por el agregado de 0,100 ml de Cl_2Hg 10 mM. El volumen de la mezcla de reacción se llevó a 0,900 ml y se dosó el ACC formado por el método de Lizada y Yang.

En los experimentos en que se estudió el efecto del dióxido de carbono sobre la actividad de esta enzima, fue necesario agregar a la mezcla de incubación bicarbonato de sodio con el fin de regular el porcentaje de dióxido de carbono en la atmósfera. Con el objeto de estudiar si el aumento de la fuerza iónica producido por el agregado de CO_3H^- al medio de reacción afectaba la actividad de la ACC sintetasa se usaron las mismas mezclas de incubación pero con el agregado de cloruro de sodio en concentración tal que igualara el aumento de fuerza iónica antes mencionado.

2.7.2. Invertasa

2.7.2.1. *Extracción de invertasa*

En los experimentos de almacenamiento de tomate se

siguió la variación del contenido de invertasa en el pericarpio. Para ello se extrajo la invertasa usando un buffer pH = 7,5 con_uteniendo tris 0,1 M, EDTA 0,05 mM y PVP 1% p/v, en una relación de un gramo de tejido por mililitro de buffer. El extracto se filtró a través de gasa y se centrifugó a 10.000 g en una centrífuga Sorvall durante 30 minutos. El sobrenadante obtenido se utilizó para determinar la actividad de invertasa.

2.7.2.2. *Determinación de la actividad de la invertasa*

Para determinar la actividad de esta enzima se adicionó 0,50 ml del sobrenadante obtenido tal como se mencionó en la sección 2.7.2.1. a 1,5 ml de la mezcla de incubación. El pH de la mezcla resultante fue de 5,5 siendo la concentración final de los participantes sacarosa 0,25 M, buffer acético-acetato 0,50 M. La reacción se detuvo a los 15 minutos con 2 ml del reactivo de cobre con baja alcalinidad descrito por Cronin y col. (1979). Se llevó a ebullición 10 minutos y luego se lo enfrió bajo canilla. Se le adicionó 1 ml del reactivo arsenomolibdico descrito por el autor antes citado y se diluyó el contenido en 50 ml de agua destilada. Se midió la absorbancia contra el blan_uco a 520 nm.

2.8. DETERMINACION DE PROTEINAS SOLUBLES

Para la determinación de proteínas solubles se empleó el método de Bradford (1976), usando albúmina bovina como standard para la curva de calibración.

2.9. DETERMINACION DEL COLOR SUPERFICIAL

En los ensayos llevados a cabo con tomates enteros se midió la luminocidad (L), el grado de rojo (a) y el grado de amarillo (b) empleando un colorímetro HunterLab Color Difference Meter D 25 el que fue calibrado con un plato blanco standard (L: 92,87; a: -0,9; b: 0,6). El desarrollo de color de los frutos se siguió por la variación en la relación a/b.

RESULTADOS Y DISCUSION

EFECTO DE LA ATMOSFERA SOBRE LA SINTESIS
DE ETILENO. SISTEMAS "IN VITRO"

Se considera que el etileno es la hormona desencadenante de todos los procesos que conducen a la maduración de muchos frutos (Burg y Burg, 1966; Lieberman y col., 1974; Wang y Melenthin, 1977) entre los que se encuentra el tomate. Es sabido que para su síntesis se requiere la transformación de metionina (Met) en S-adenosilmetionina (SAM) la que deriva en la formación de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) y por último en etileno (Burg, 1973; Murr y Yang, 1975; Adams y Yang, 1977; Adams y Yang, 1979; Boller y col., 1979).

El interrogante que nos planteamos fue el siguiente: ¿Qué influencia tienen el dióxido de carbono y el oxígeno en la síntesis de esta hormona? especialmente sobre las dos últimas etapas de conversión, dado que la primera de ellas es común con la síntesis de poliaminas o reacciones de transmetilación (Even-Chen y col., 1982; Roberts y col., 1983).

Se decidió entonces utilizar discos de pericarpio de tomate para estudiar el sistema interviniente en la oxidación de ACC a etileno, puesto que el mismo aún no ha podido ser aislado en forma activa como sistema libre de células y un extracto enzimático de ACC sintetasa para analizar la conversión de SAM a ACC.

3.1. CONVERSION DE ACC EN ETILENO

Adams y Yang (1979) trabajando con discos de manzana

usando metionina marcada con ^{14}C observaron que en anaerobiosis no se producía etileno y que se acumulaba un metabolito radiactivo, el que desaparecía al reponer aire al sistema. Dicho metabolito fue identificado como el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). Estos resultados mostraron claramente la necesidad de oxígeno en la síntesis de etileno, pero aún no se ha podido dilucidar el mecanismo interviniente en la oxidación de ACC que permite la producción de la hormona.

Para llevar a cabo nuestros estudios empleamos tomates en el estado verde maduro considerado óptimo para la conservación. Inicialmente se caracterizó el sistema en estudio y luego se determinó el efecto del oxígeno y dióxido de carbono sobre el sistema formador de etileno.

3.1.1. Elección de las condiciones de ensayo

3.1.1.1. *Producción de etileno en función del tiempo*

Con el objeto de caracterizar el sistema en estudio se determinó la oxidación fisiológica del ACC a etileno en función del tiempo de incubación. Previamente a la realización de las experiencias, los discos de pericarpio de tomate permanecieron durante 16 a 20 horas en oscuridad a 28°C para eliminar la producción de etileno debida al corte (Kende y Boller, 1981). Se decidió no trabajar con el etileno producido por corte por ser éste muy dependiente del estado fisiológico del tomate, del espesor de los discos y del tipo de corte, lo que puede conducir a variaciones importantes en los resultados. De acuerdo a los

estudios realizados por Kende y Boller (1981) la síntesis de hormona en los discos de pericarpio de tomate mantenidos en las condiciones mencionadas es comparable a la correspondiente a tomates enteros en el mismo estado de madurez.

A partir de discos de pericarpio incubados de la manera descrita en Materiales y Métodos (Sección 2.1.2.), se extrajeron a distintos tiempos muestras de la fase gaseosa y se analizó el contenido de etileno (Sección 2.6.4.). Cada muestra fue extraída de diferentes frascos de incubación para evitar posibles errores debidos a la infiltración de aire en los mismos durante la extracción. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5 donde se presenta el etileno producido (pmoles/g) en función del tiempo. En ella se puede observar que la producción de hormona aumenta durante las tres primeras horas de incubación, tendiendo luego a un valor constante. En base a estos resultados decidimos emplear un período de 3 horas de incubación en los próximos experimentos. Cabe señalar que en estas experiencias el contenido de ACC en los discos de pericarpio era de aproximadamente 16 nmoles/g.

3.1.1.2. *Efecto del ACC sobre el sistema formador de etileno*

Dado que el contenido de ACC de los discos de pericarpio de tomate varía entre los distintos cultivares o las diferentes zonas de producción se analizó la dependencia del sistema formador de etileno con respecto a dicho metabolito. Los discos, al igual que en el ensayo anterior, permanecieron 16 a 20

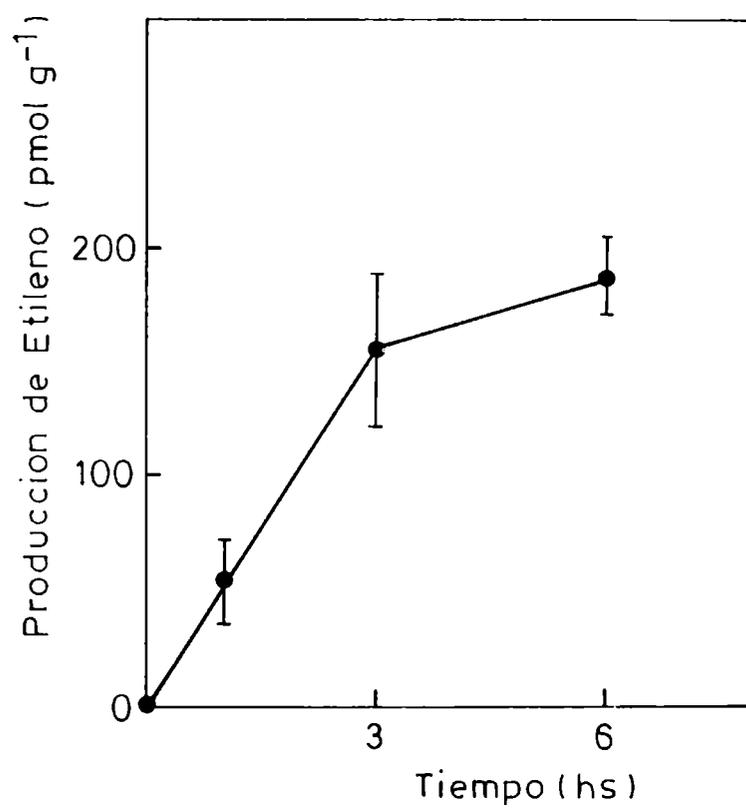


Figura 5: Producción de etileno de discos de pericarpio de tomate en función del tiempo. Los discos fueron incubados a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ en una atmósfera de aire en presencia de luz.

horas en la oscuridad a 28°C. Se observó en este caso que el contenido de ACC fue de 16 nmoles/g tal como se indicó anteriormente, mientras que los discos congelados en aire líquido inmediatamente después del corte poseían aproximadamente 1 nmol/g, es decir que durante el tratamiento antes citado se produce una acumulación de ACC. Estos resultados indican que, si bien la producción de etileno de los discos de pericarpio mantenidos en oscuridad 16 a 20 horas a 28°C es comparable a la de tomate entero, no ocurre lo mismo con el contenido de ACC.

Por otra parte, para elevar el contenido de ACC de los discos el medio de incubación fue suplementado con dicho metabolito. Al cabo de 3 horas de incubación de los discos de pericarpio de tomate se extrajeron muestras de la fase gaseosa determinándose el contenido de etileno (Sección 2.6.4.). La cantidad de ACC presente en el tejido se analizó de la manera descrita en la Sección 2.6.1. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6. En ella se puede observar que no existen diferencias significativas en el etileno formado por discos de pericarpio que contenían entre 16 y 44 nmoles de ACC/g. Sin embargo, la síntesis de esta hormona experimenta un aumento significativo cuando el nivel de ACC se incrementa, al menos hasta 89 nmoles/g. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por Apelblat y col. (1981), quienes trabajando con discos de pericarpio de manzana observaron que la producción de etileno no variaba de manera significativa si los discos contenían entre 20 y 30 nmoles de ACC/g de peso fresco.

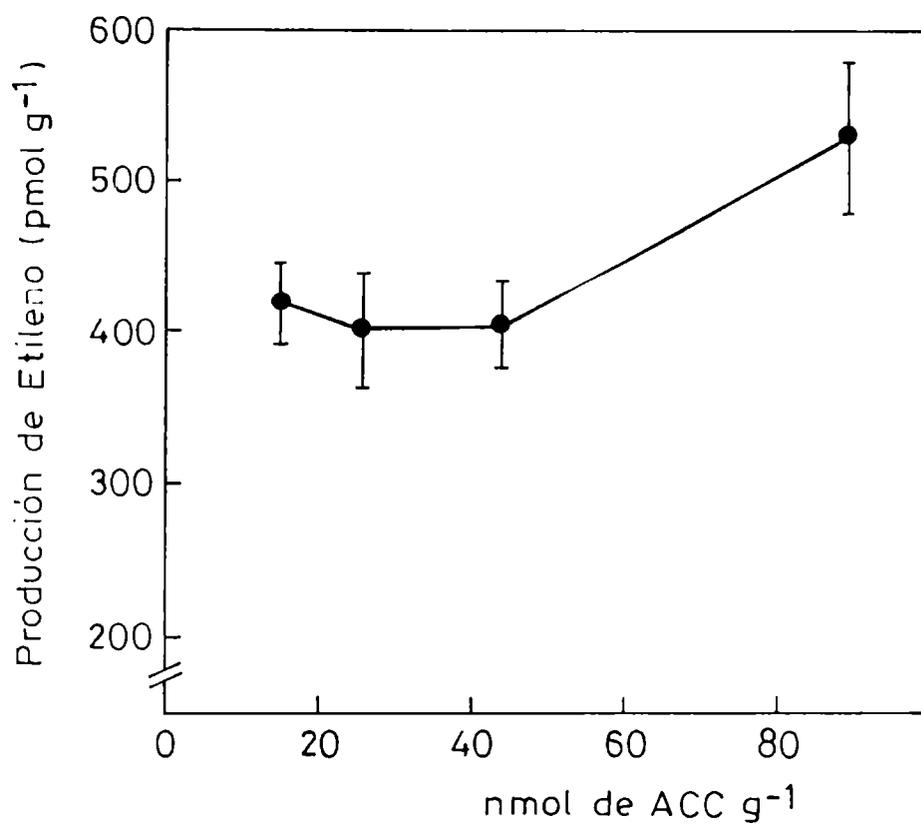


Figura 6: Producción de etileno de discos de pericarpio de tomate conteniendo diferentes niveles de ACC. Los discos fueron incubados en una atmósfera de aire a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ en presencia de luz.

3.1.1.3. Efecto de la luz sobre la producción de etileno

Estudios llevados a cabo por Gepstein y Thimann (1980) demostraron que la síntesis de etileno en discos de hojas de tabaco era inhibida por la luz y por la presencia de iones Co^{+2} que presumiblemente se unen a grupos sulfhidrilo. Asimismo observaron que la producción de esta hormona no se alteraba si los discos se incubaban en presencia de mercaptoetanol y luz. En base a estos ensayos dichos autores concluyeron que la luz participa en la oxidación de grupos sulfhidrilos esenciales para la síntesis de etileno. Posteriormente de Laat y van Loon (1982) observaron en el mismo sistema de hojas de tabaco, pero previamente infectadas con virus del mosaico del tabaco (lo que provoca un incremento en la producción de etileno) que el pasaje de los discos de luz a oscuridad no aumentaba la síntesis de la hormona en tejidos previamente tratados con cicloheximida. Asimismo mostraron que el efecto inhibitorio de la luz tampoco se detectaba en tejidos tratados con diclorofenildimetilurea (DMCU) que es un inhibidor de la actividad fotosintética. Estos resultados muestran que la inhibición por la luz requiere el sistema fotosintético activo y que para su reversión, en la oscuridad, se necesita la síntesis de proteína. Kao y Yang (1982) demostraron que la producción de etileno por segmentos de hojas de arroz no era inhibida por la luz si en la atmósfera de incubación se adicionaba dióxido de carbono hasta alcanzar un porcentaje de 3%. Asimismo observaron que el tratamiento luz-oscuridad que permitía la recuperación de la síntesis de esta hormona

en aire no modificaba significativamente el nivel endógeno de ACC. Estos hallazgos les permitieron concluir que la luz afecta la oxidación de ACC a etileno, y que dicho efecto es mediado por una reducción de la concentración de dióxido de carbono en la fase gaseosa.

Basándonos en estos hallazgos decidimos analizar la influencia de la luz sobre la producción de etileno en los discos de pericarpio de tomate. Para ello discos de pericarpio mantenidos en la oscuridad a 28°C durante 16 a 20 horas fueron incubados 3 horas en luz u oscuridad empleando una atmósfera de aire o enriquecida en dióxido de carbono.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Efecto de la luz sobre la producción de etileno de discos de pericarpio de tomate en presencia de distintas atmósferas.

Condiciones de incubación	Producción de etileno (pmol C ₂ H ₄ /g)			
	Aire	% CO ₂		
		9	17	20
Luz	73	82	70	58
Oscuridad	75	53	63	44
		LSD _{0,05} 14 (Luz-Osc.)		

Los discos de pericarpio de tomate fueron incubados en aire o en una atmósfera conteniendo 15% de oxígeno y cantidades variables de dióxido de carbono. Se incubó a 22 ± 2 C.

En la Tabla 1 se puede observar que en atmósfera de aire la síntesis de etileno no es inhibida por la luz, y que la presencia de un 9% de dióxido de carbono incrementa significativamente su producción ($LSD_{0,05}$). No se obtuvieron diferencias significativas respecto al control para contenidos mayores de dióxido de carbono (17 y 20%).

Como el efecto de la luz sobre la producción de etileno es mediado a través de la reducción del dióxido de carbono de la atmósfera se realizaron ensayos con el fin de ver si en los discos predominaba la actividad fotosintética o la respiratoria. Para ello se hicieron experiencias donde se midió el contenido de dióxido de carbono en la fase gaseosa de la manera descrita en la Sección 2.5. Los resultados obtenidos (Figura 7a) muestran un aumento del contenido de CO_2 en la atmósfera con el tiempo de incubación, lo que indica un claro predominio de la actividad respiratoria sobre la actividad fotosintética. Este hecho explicaría por qué en nuestro sistema la luz no afecta la síntesis de etileno; acorde a Preger y Gepstein (1984) la luz no ejerce ningún efecto sobre la producción hormonal en tejidos blanqueados o tratados con DCMU, o sea, privados de la actividad fotosintética. Además, estos mismos autores observaron que se produce más etileno en presencia de luz cuando se absorbe el CO_2 de la atmósfera con OHK.

Observamos además que discos de pericarpio de tomate incubados en una atmósfera excenta de dióxido de carbono y con 13% de oxígeno respiran igual que los controles (discos mantenidos en aire); en tanto que aquellos mantenidos en una atmósfera

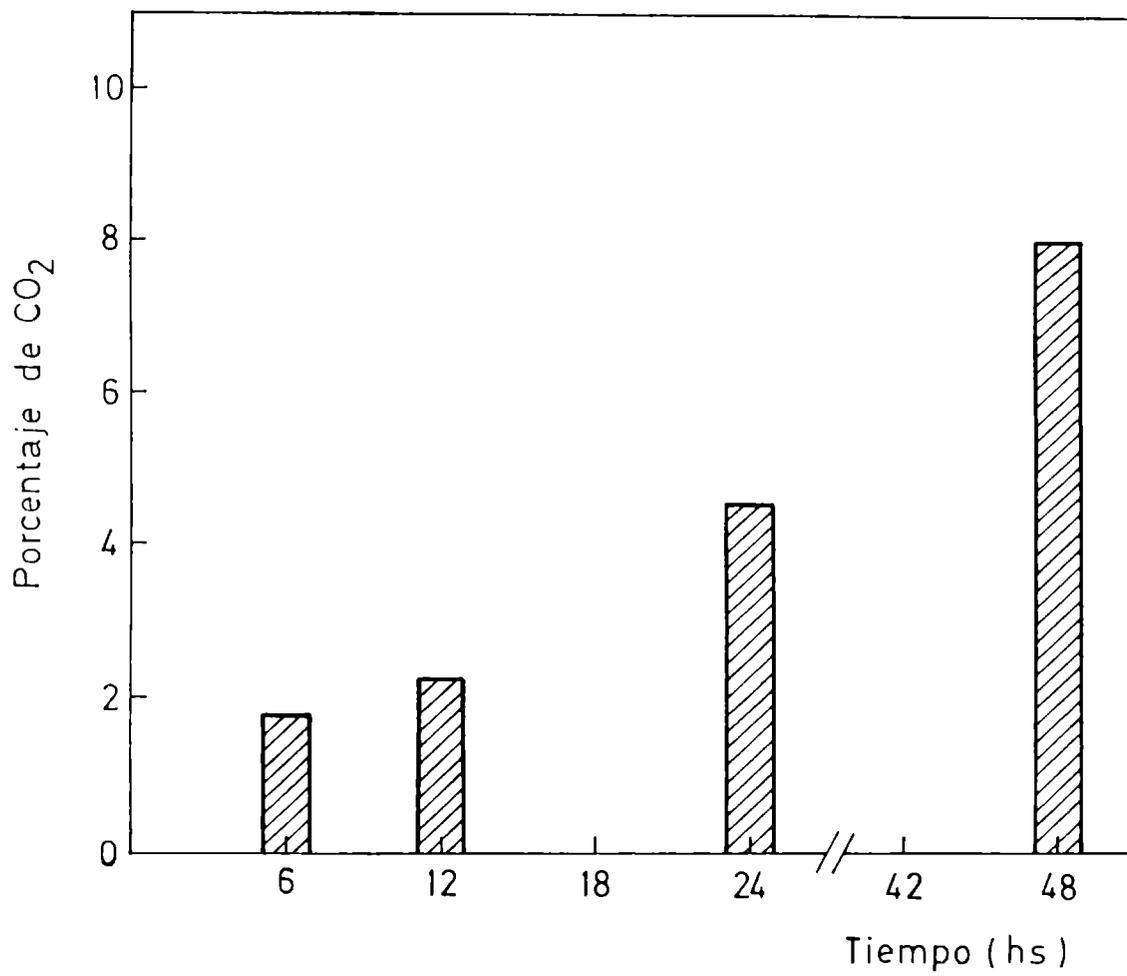


Figura 7a: Variación en la concentración de dióxido de carbono en la atmósfera de discos incubados inicialmente en aire a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ en presencia de luz.

enriquecida en dióxido de carbono poseen una actividad respiratoria menor (Figura 7b). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Shipway y Branmlage (1973) en mitocondrias de manzana.

3.1.2. Estudio del efecto de la composición de la atmósfera sobre la vía de síntesis de etileno

3.1.2.1. *Efecto del oxígeno sobre la conversión de ACC a etileno*

Desde hace tiempo varios autores han informado que la producción de etileno disminuye cuando el tejido es incubado en atmósferas empobrecidas en oxígeno (5 al 10%) (Hansen, 1942; Burg y Thimann, 1959; Craft, 1960; Lieberman y Hardenburg, 1954) hecho que quisimos comprobar si ocurría en nuestro sistema de trabajo. Al preparar las atmósferas enriquecidas en dióxido de carbono, tal como se describió en la Sección 2.3.1., se obtuvieron atmósferas con niveles de oxígeno entre 13 y 21%. A efectos de contar con controles válidos que permitan analizar los resultados se prepararon también atmósferas con igual contenido en oxígeno que las anteriores pero carentes de dióxido de carbono.

Al comparar la producción de etileno de discos de pericarpio incubados en atmósferas empobrecidas en oxígeno respecto a la obtenida para discos mantenidos en aire no se pudo detectar una tendencia definida, algunas veces los niveles encontrados eran iguales y otras veces menores. Para determinar la causa de este comportamiento se llevaron a cabo ensayos con discos de pericarpio que contenían concentraciones de ACC entre 6 a 290 nmoles/g.

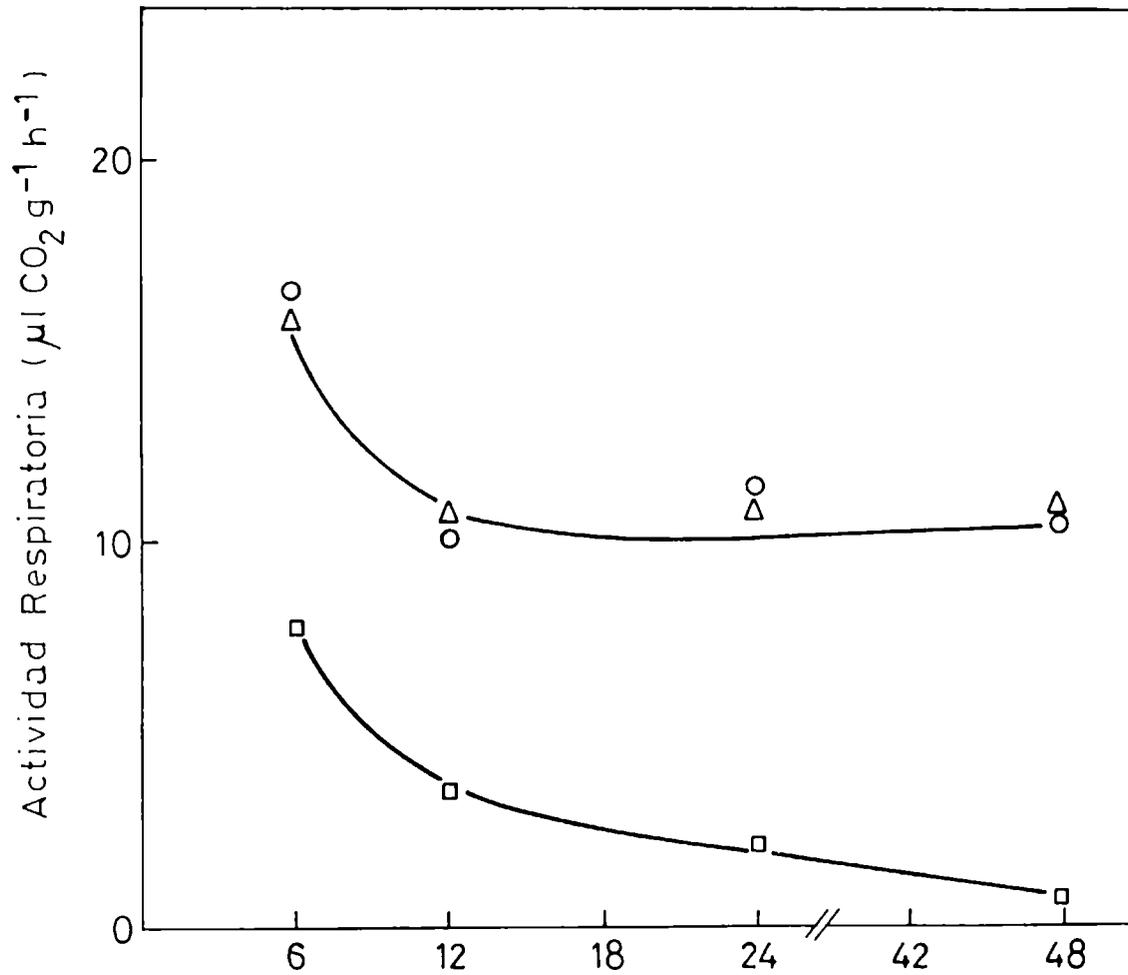


Figura 7b: Variación de la actividad respiratoria en función del tiempo de incubación. Los discos se incubaron en atmósferas que contenían inicialmente aire (o), 13% O₂ y resto N₂ (Δ), 20% CO₂, 16% O₂ y resto N₂ (\square) a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ en presencia de luz.

La Figura 8 muestra los resultados obtenidos. Se puede observar que si bien la producción de esta hormona disminuye al descender el contenido de oxígeno en la atmósfera, independientemente del nivel de ACC del tejido, el grado de inhibición alcanzado es función del contenido de este metabolito. A medida que la cantidad de ACC presente en el tejido es mayor más sensible es el tejido al descenso de oxígeno en la atmósfera.

Estos resultados explicarían el por qué para reducir la producción de etileno de tomates enteros, que contienen generalmente niveles de ACC del orden de 1 nmol/gr, es necesario disminuir el nivel de oxígeno de la atmósfera por debajo del 6%.

La necesidad de oxígeno en la oxidación de ACC a etileno fue informada por Adams y Yang (1979), hallazgo que nosotros corroboramos, pero además encontramos que esta necesidad depende del nivel de ACC hecho que resulta lógico ya que al tener más sustrato se necesita más oxidante.

3.1.2.2. Efecto del dióxido de carbono en la transformación de ACC a etileno

El dióxido de carbono es usado desde hace mucho tiempo como inhibidor competitivo de la acción de etileno (Burg y Burg, 1965b). Varios autores han informado que en diversos frutos el dióxido de carbono inhibe la síntesis de etileno (Chaves y Tomás, 1984; Buescher, 1979; Wang, 1977; Wills y col., 1979).

A efectos de contestar el interrogante planteado inicialmente: ¿Afecta el dióxido de carbono la etapa de oxidación de ACC a etileno?, se llevaron a cabo experimentos con discos de

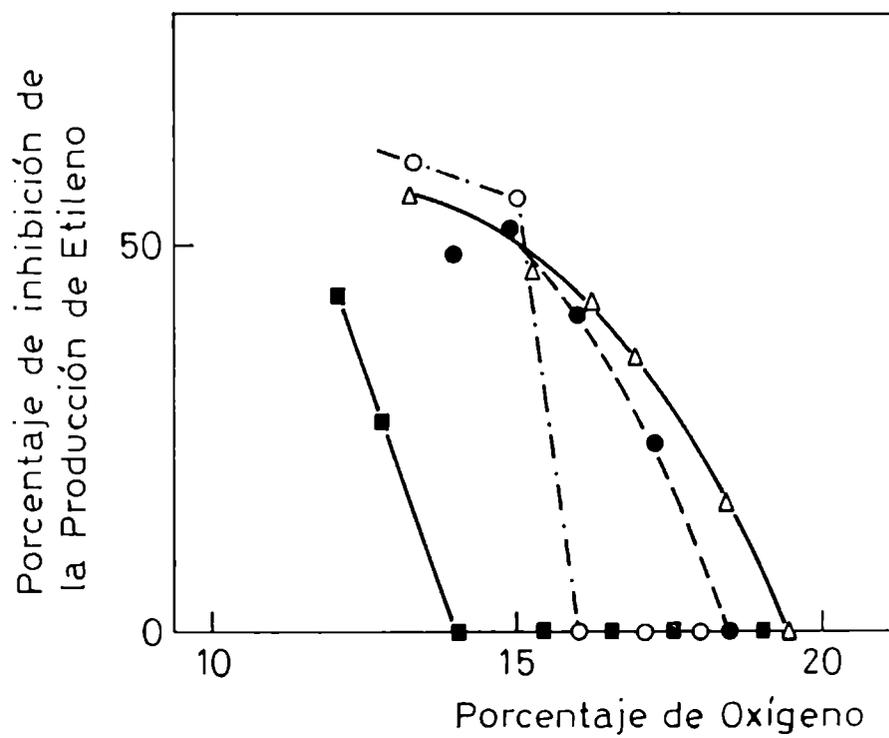


Figura 8: Inhibición de la producción de etileno debido al descenso del nivel de oxígeno en la atmósfera. Los discos tenían distintos contenidos de ACC: 6 nmol/gr (■—■), 16 nmol/gr (o-.-o), 60 nmol/gr (●---●) y 290 nmol/gr (Δ—Δ). El tejido fue incubado en presencia de luz a $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

pericarpio de tomate, mantenidos en oscuridad durante 16 a 20 horas a 28°C, los que fueron incubados durante 3 horas en atmósferas conteniendo distintos porcentajes de dióxido de carbono. El nivel de oxígeno se mantuvo constante en todos los casos para evitar el efecto producido por este gas, discutido previamente.

En la Figura 9 se muestran los resultados obtenidos. En ella se puede observar que no existen diferencias significativas en la producción de etileno cuando el contenido de dióxido de carbono se incrementa hasta un 18%.

Los resultados obtenidos trabajando con atmósferas disminuidas en oxígeno (Sección 3.1.2.1.) nos llevaron a pensar que tal vez el efecto del dióxido de carbono sobre la conversión de ACC a etileno era dependiente del nivel de ACC en el tejido. Por lo tanto se realizaron experiencias incubando discos de pericarpio de tomate, a los que se le elevó el contenido de ACC, en aire y en atmósfera de composición 20% CO₂, 21% O₂, 59% N₂. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2. Se puede observar que los discos incubados en la atmósfera enriquecida en dióxido de carbono producen igual cantidad de etileno que los incubados en aire, independientemente del nivel de ACC presente en el tejido.

Estos resultados indicarían que si bien en tomate entero la producción de etileno es inhibida por el dióxido de carbono (Buescher, 1979) no ocurre lo mismo con el etileno sintetizado a partir de ACC en los discos de pericarpio de tomate.

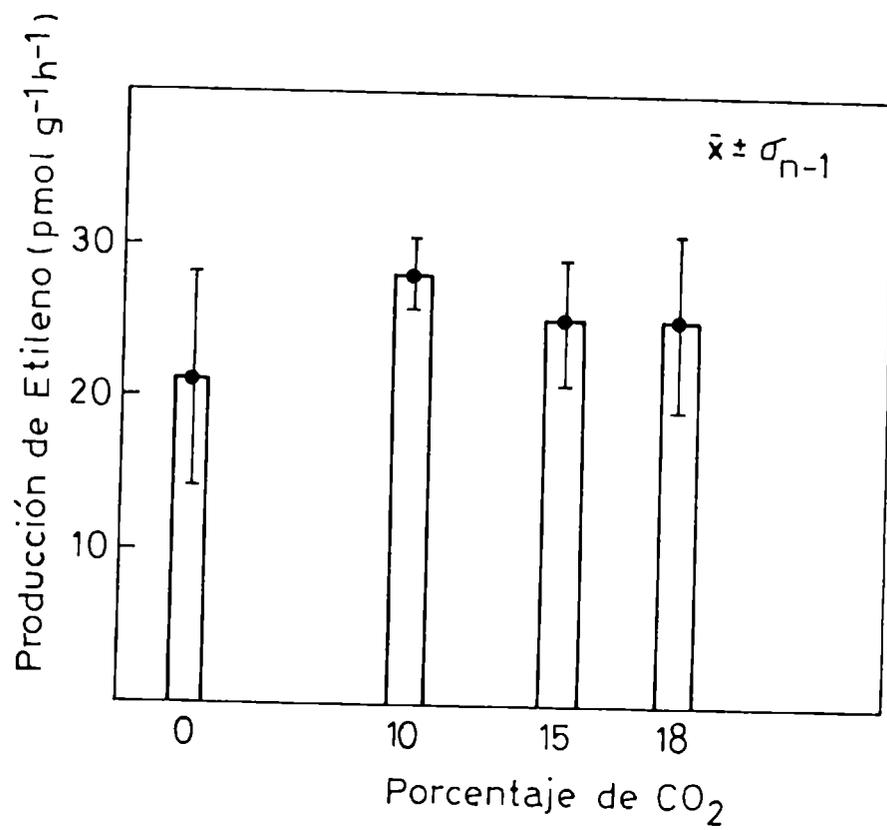


Figura 9: Producción de etileno de discos de pericarpio de tomate mantenidos en atmósferas conteniendo cantidades variables de CO₂ y oxígeno al 15%. Los discos fueron incubados a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ en presencia de luz.

TABLA 2: Efecto de la composición de la atmósfera sobre la producción de etileno de discos de pericarpio de tomate con diferentes niveles de ACC

Contenido de ACC (nmol/g)	Producción de etileno (nmol/g)	
	Aire	CO ₂
14	0,42	0,43
30	0,34	0,46
50	0,48	0,36
89	0,58	0,61
	LSD _{0,05} 0,13	

Los discos de pericarpio de tomate conteniendo diferentes niveles de ACC se incubaron a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ en aire o en una atmósfera de composición 20% CO₂, 21% O₂ y 59% N₂.

3.2. CONVERSION DE SAM EN ACC

La enzima que cataliza la reacción de SAM a ACC es la ACC sintetasa, descrita por primera vez por Boller y col. (1979) y Yu y col. (1979). Su actividad es dependiente de fosfato de piridoxal, el pH óptimo 8,0-8,5 y la temperatura óptima 30°C. La unidad enzimática más usada se define como los nmoles de ACC transformados al cabo de 3 horas de incubación a 30°C. Acaster y Kende (1982) purificaron la ACC sintetasa mediante precipitación salina con SO₄(NH₄)₂ al 60% de saturación y posterior cromatografía en Sephadex G100 o fenil sepharosa, obteniendo una mejor purificación en el último caso.

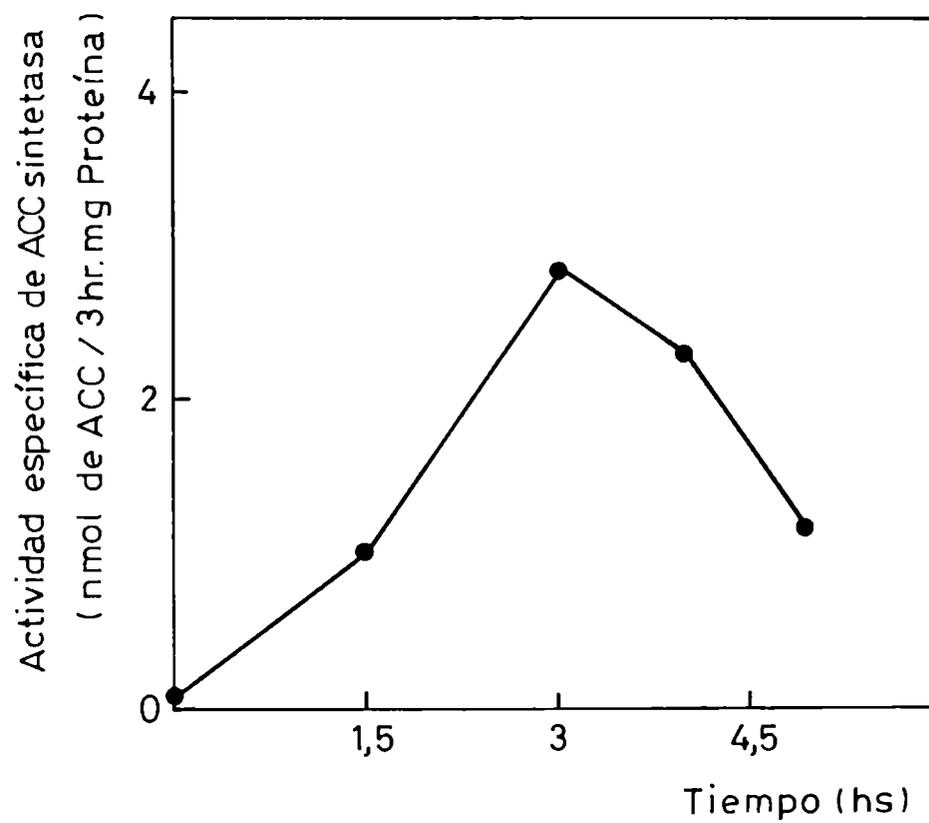


Figura 10: Actividad específica de la ACC sintetasa en función del tiempo posterior al daño de los discos de pericarpio de tomate. Los discos permanecieron luego del corte a 28°C en oscuridad hasta ser procesados.

En 1981 Konze y Kwiatkowski y posteriormente Hyodo y col. (1983, 1985) y Kende y Boller (1981) mostraron que la ACC sintetasa controla la síntesis de etileno producida por daño y que es inducida al ocasionarse el corte.

En nuestro caso deseamos analizar la influencia de la atmósfera sobre la conversión de SAM a ACC. Para ello se extrajo centina de discos de pericarpio dañados por corte ya que la actividad obtenida a partir de frutos enteros fue muy baja. Los resultados mostrados en la Figura 10 indican que la actividad específica de la ACC sintetasa se incrementa durante las tres primeras horas posteriores al corte, disminuyendo luego. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por Kende y Boller (1981).

Posteriormente se intentó purificar la enzima por precipitación salina pero no se lograron resultados satisfactorios dado que se recuperó sólo el 12% de la actividad inicial luego de la precipitación. Por este motivo se prefirió continuar trabajando con extractos enzimáticos crudos.

3.2.1. Efecto de la composición de la atmósfera sobre la conversión de SAM a ACC

3.2.1.1. *Efecto del oxígeno sobre la conversión de SAM a ACC*

Para determinar si el oxígeno afecta la producción de ACC a partir de SAM se dosó la actividad de la ACC sintetasa en distintas atmósferas tal como fuera descrito en la Sección 2.7.1.2. Los resultados obtenidos (Tabla 3) indican que la

actividad enzimática es independiente del nivel de oxígeno presente en la atmósfera de incubación ($LSD_{0,05}$).

TABLE 3: Actividad de la ACC sintetasa en función del nivel de oxígeno en la atmósfera de incubación

	Porcentaje de oxígeno		
	6	16	21
Actividad de la ACC sintetasa (nmol ACC/3 hr)	0,70	0,82	0,81
	$LSD_{0,05}$		0,15

Los extractos enzimáticos fueron incubados de la manera descrita en la Sección 2.7.1.2. de Materiales y Métodos. La atmósfera de los frascos de incubación contenía cantidades variables de oxígeno y el resto nitrógeno.

No se estudió el efecto del oxígeno sobre la inducción de la ACC sintetasa ya que si el nivel de oxígeno la afectara Adams y Yang (1979) no podrían haber hallado una acumulación de ACC al poner el tejido en anaerobiosis. Cabe recordar que esta enzima posee un tiempo de vida media muy corto por lo que necesitaría síntesis "de novo" continua.

3.2.1.2. Efecto del dióxido de carbono sobre la conversión de SAM a ACC

3.2.1.2.1. Efecto del dióxido de carbono sobre la actividad de la ACC sintetasa: En este caso se determinó la actividad enzimática en una atmósfera enriquecida en dióxido de carbono. Los

resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4. De la misma surge claramente que la actividad de la ACC sintetasa tampoco es afectada por el dióxido de carbono. Asimismo se puede observar que la elevación de la fuerza iónica del medio de incubación por el agregado de ClNa o CO_3HNa no afecta la actividad enzimática.

TABLA 4: Efecto del dióxido de carbono sobre la actividad de la ACC sintetasa

Condición	Actividad enzimática (nmol de ACC/3 hr)
Aire	1,28
ClNa	1,28
CO_2	1,28

El extracto enzimático se incubó de la manera descrita en la Sección 2.7.1.2. de Materiales y Métodos en presencia de una atmósfera enriquecida en CO_2 (20%) o en aire.

3.2.1.2.2. Efecto del dióxido de carbono sobre la inducción de la ACC sintetasa: Como ya consignamos en la Sección 3.2. el material de partida para extraer la ACC sintetasa fueron discos de pericarpio de tomate herido, ya que el nivel de dicha enzima en este tejido es mayor que en el fruto entero. Para determinar el efecto del dióxido de carbono sobre la inducción de la ACC sintetasa se realizaron ensayos en los cuales discos de pericarpio de tomate luego de haber sido herido permanecieron en una

atmósfera normal (aire) o en una atmósfera cuya composición fue 20% CO₂, 16% O₂ y 54% N₂. Este tejido se incubó por espacio de 90 y 180 minutos en oscuridad a 25°C y se extrajo la ACC sintetasa tal como se describió en la Sección 2.7.1.1. Seguidamente se midió la actividad enzimática de la manera descrita en la Sección 2.7.1.2. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 11. En ella se puede ver que la actividad específica de la ACC sintetasa proveniente de discos mantenidos en aire es tanto mayor cuanto mayor es el tiempo de incubación (por lo menos hasta 3 horas) tal como fue mostrado previamente (Sección 3.2.). Sin embargo, la actividad específica obtenida a partir de discos incubados en una atmósfera enriquecida en dióxido de carbono aumenta durante los primeros 90 minutos y luego permanece constante. Estos resultados indican que cuando hay altos tenores de dióxido de carbono en la atmósfera se inhibe la inducción de la ACC sintetasa. Resultados semejantes a los nuestros fueron encontrados por Buefler (1984) quien informó que la inducción de dicha enzima producida por etileno en manzanas es inhibida por concentraciones de dióxido de carbono del orden del 10%.

3.3. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este capítulo indican claramente que la producción de etileno en discos de pericarpio de tomate es afectada tanto por el descenso de oxígeno como por el incremento de dióxido de carbono en la atmósfera. Sin embargo,

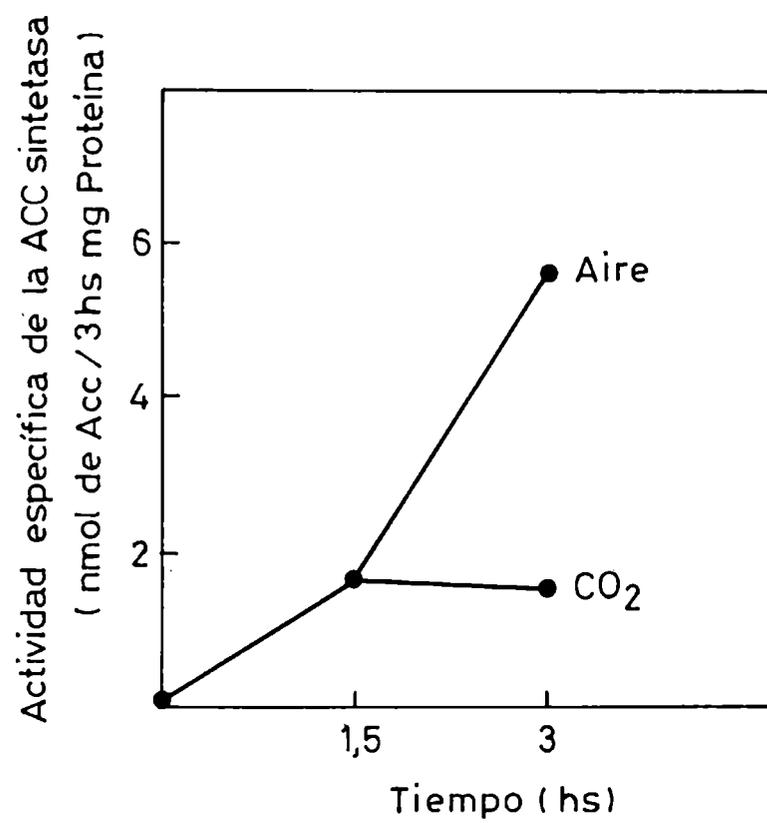


Figura 11: Actividad específica de ACC sintetasa extraída de tejido dañado por corte. Los discos de pericarpio de tomate permanecieron en aire ó en una atmósfera enriquecida en CO₂ a 22 ± 2°C en oscuridad.

estos gases actúan en distintos pasos de la biosíntesis de la hormona.

La disminución del nivel de oxígeno afecta la etapa de oxidación de ACC a etileno, sin alterar la actividad respiratoria en los niveles estudiados (21 al 13%) (Figuras 7 y 8). Dicha inhibición es función del contenido de ACC presente en el tejido, detectándose mayor sensibilidad al descenso de oxígeno cuanto más alto es el contenido de ACC en el pericarpio de tomate (Figura 8).

En cuanto al dióxido de carbono se observó que este gas no afecta la actividad de ninguna de las enzimas involucradas en la vía de síntesis de etileno (Figura 9, Tablas 2 y 4). Sin embargo, se detectó que altos niveles de dióxido de carbono en la atmósfera inhiben la inducción de la ACC sintetasa, enzima responsable de la transformación de SAM a ACC (Figura 11). Tratamientos prolongados con dióxido de carbono provocarían una disminución de la síntesis de etileno por disminución de ACC.

INFLUENCIA DEL DIOXIDO DE CARBONO Y
LA TEMPERATURA SOBRE EL PROCESO
DE MADURACION DE TOMATES

En el almacenamiento de tomates se utilizan desde hace varios años atmósferas enriquecidas en dióxido de carbono con el fin de retardar la maduración. De acuerdo a experiencias llevadas a cabo por Buescher (1979) atmósferas con un contenido de dióxido de carbono del 20% son efectivas para frenar los procesos que conducen a la maduración de estos frutos. Dado que hasta el presente se desconoce el mecanismo por el cual es te gas retarda la maduración decidimos realizar experiencias en tal sentido. Para ello se almacenaron lotes de tomates en el estado verde-maduro tal como se describió en la Sección 2.2.2. Algunos lotes permanecieron en una atmósfera enriquecida en dióxido de carbono por diferentes lapsos de tiempo (1, 3, 6, 9 días), mientras que otros, que fueron usados como control, se almacenaron en aire.

La composición de la atmósfera empleada fue 20% CO₂; 16% O₂; 64% N₂. El nivel de dióxido de carbono se eligió teniendo en cuenta los resultados obtenidos por Buescher mencionados an terriormente, en tanto que el contenido de oxígeno se seleccionó de acuerdo a resultados propios ya discutidos en la Sección 3.1.2.1, considerando que el nivel de ACC del pericarpio de los frutos enteros varía entre 1 y 5 nmoles/gr cuando pasan del estado verde-maduro al maduro. Si el contenido de ACC es de 6 nmoles/gr la producción de etileno se ve inhibida cuando el tenor de oxígeno en la atmósfera es del 13%; razón por la cual no fue necesario elevar el nivel de oxígeno al 21% como

lo hizo Buescher.

Los experimentos de almacenamiento se llevaron a cabo a 25 y 10°C. En el último caso los tomates permanecieron a baja temperatura durante 9 días y luego se los transfirió a 25°C hasta que alcanzaron su madurez. La temperatura elevada se utilizó para acelerar el proceso de maduración de los frutos, no se emplearon temperaturas mayores, superiores a los 27°C, pues producen daños fisiológicos que conducen a una maduración anormal.

En cuanto a la temperatura baja, se eligió 10°C por ser ésta la temperatura óptima de almacenamiento para tomates variedad platense (Chaves y Mudridge, 1986).

4.1. EFECTO DE LA ATMOSFERA MODIFICADA SOBRE LA PRODUCCION DE ETILENO

Se realizaron una serie de ensayos con el objeto de estudiar si la producción de etileno es afectada por la utilización de atmósferas modificadas durante el almacenamiento de tomates. A distintos tiempos se tomaron muestras de la fase gaseosa de las celdas de almacenamiento (Sección 2.2.2.) y se analizó el contenido en etileno tal como se describió en Materiales y Métodos (Sección 2.6.4.). En la Figura 12 se muestran los resultados obtenidos para tomates almacenados a 25°C en atmósfera normal o modificada. En ella se puede observar que en aire la producción de etileno aumenta a partir del primer día teniendo un máximo entre el cuarto y quinto día. Posteriormente

la síntesis de etileno desciende volviendo a incrementarse cuando el fruto entra en el período de senescencia. Los tomates que fueron tratados un día con la atmósfera enriquecida en dióxido de carbono y luego fueron transferidos al aire tienen un comportamiento semejante al descrito. El pico en la síntesis de etileno se produce al mismo tiempo que los controles.

Los frutos tratados con la atmósfera modificada oir 3 días producen, al cabo del tratamiento, menos etileno que los que permanecieron en aire. Una vez transferidos a una atmósfera normal se comportan de manera similar al control, tal como puede ser observado en la Figura 12.

Para períodos de tratamiento mayores, 6 y 9 días, la producción de etileno es inferior a la de los controles; detectándose un aumento brusco en la síntesis hormonal cuando los frutos se transfieren a una atmósfera normal. Estos resultados concuerdan con los hallados por Buescher (1979) quien informó que posteriormente al tratamiento con una atmósfera enriquecida en dióxido de carbono y ser los frutos transferidos al aire la producción de etileno se recupera.

La variación en la producción de etileno de los frutos almacenados a 10°C se muestra en la Figura 13. En la misma se puede observar que los tomates que permanecieron en aire presentan un aumento en la síntesis de hormona a partir del quinto día, alcanzando su máximo en el sexto día, es decir a tiempos mayores que los frutos almacenados a 25°C. Cuando los tomates son transferidos a alta temperatura la producción de

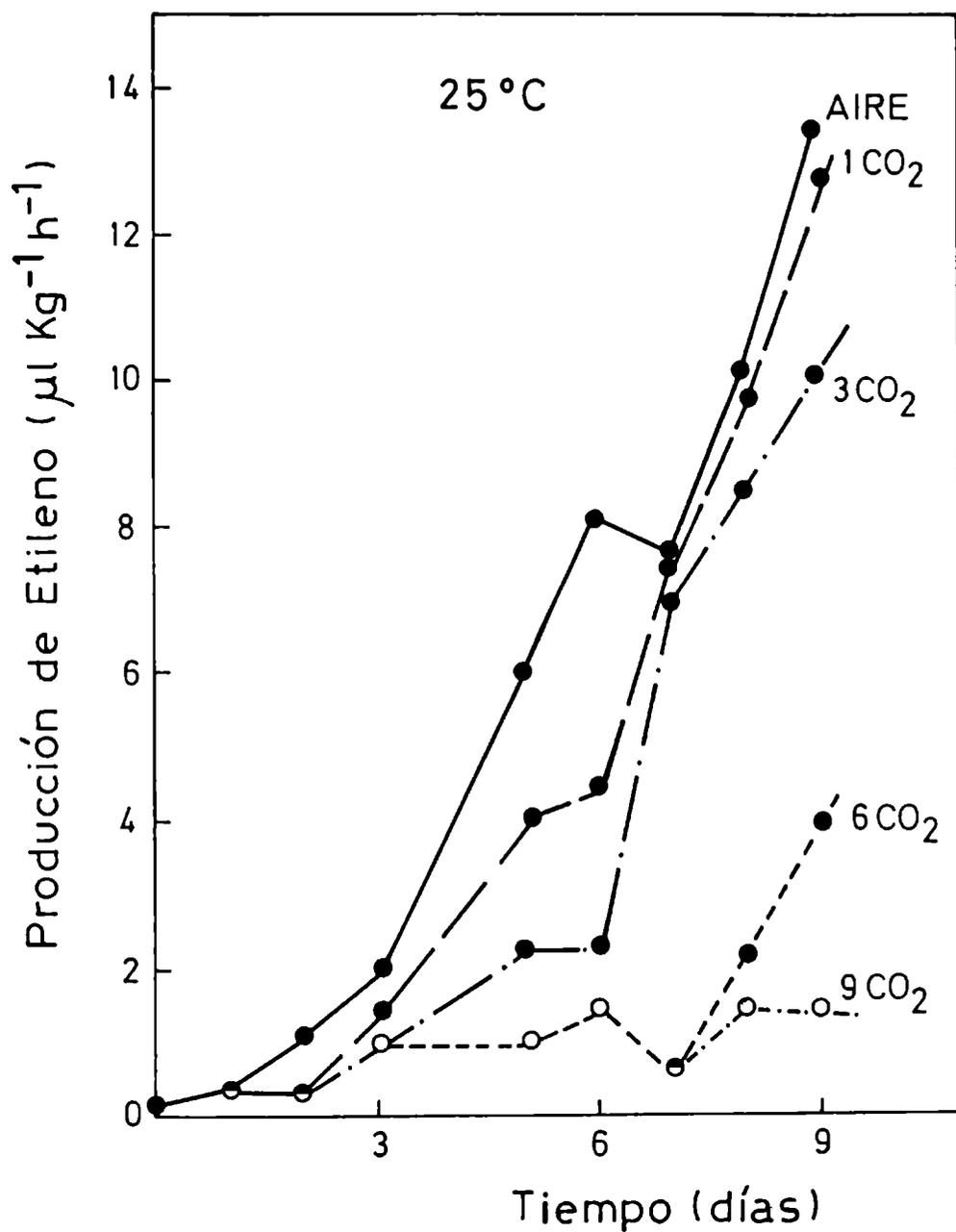


Figura 12: Producción de etileno de tomates almacenados a 25°C en aire (●—●) ó en una atmósfera enriquecida en CO₂ durante 1 (●---●), 3 (●-.-●), 6 (●----●), 9 días (o-.-.-o)

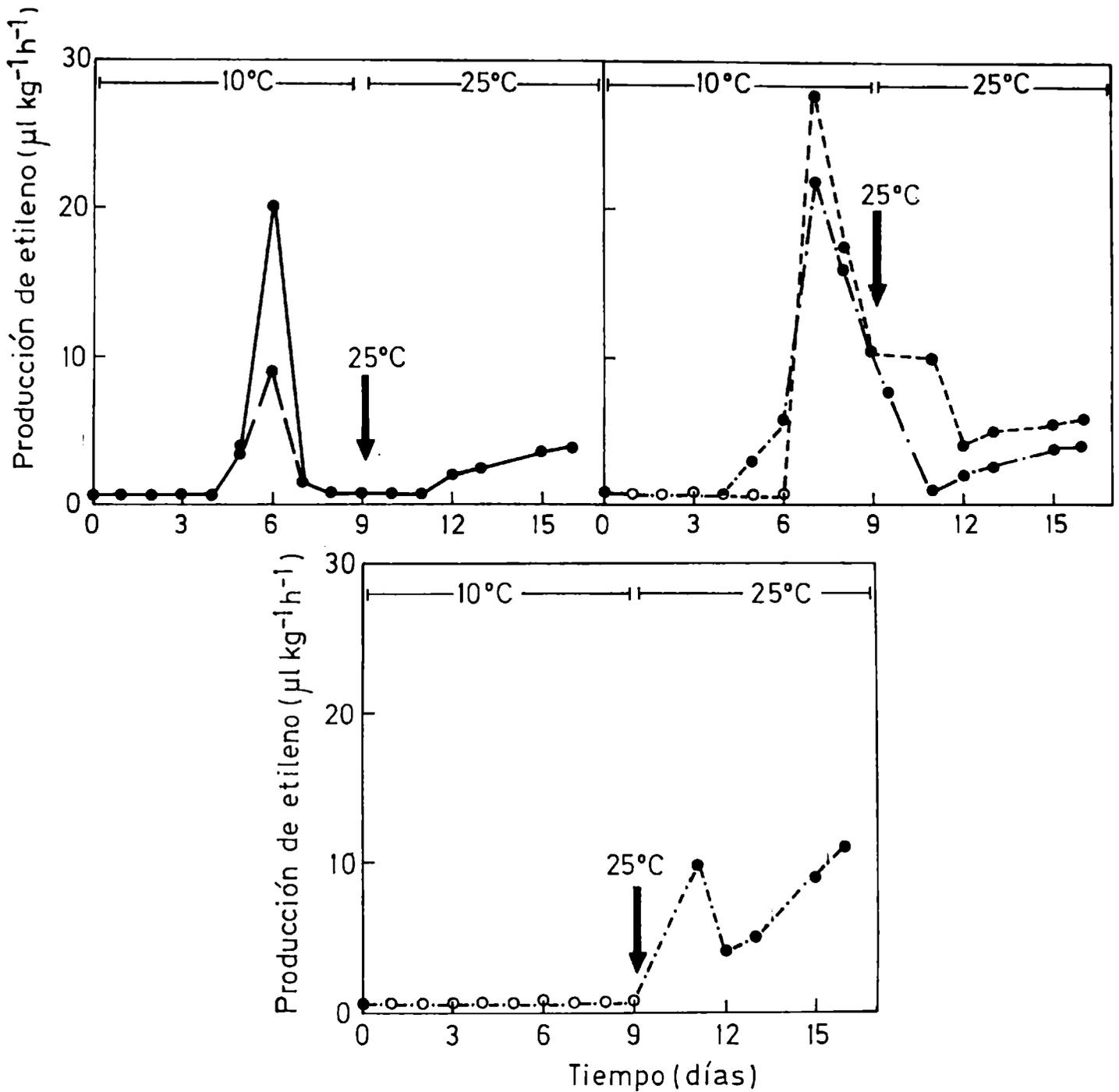


Figura 13: Producción de etileno de tomates almacenados en una atmósfera de aire ($\bullet\text{---}\bullet$) ó en una atmósfera enriquecida en CO_2 durante 1 ($\bullet\text{---}\bullet$), 3 ($\circ\text{---}\circ$), 6 ($\circ\text{---}\circ$), 9 días ($\circ\text{---}\circ$). Los frutos permanecieron durante 9 días a 10°C y luego se los transfirió a 25°C .

etileno vuelve a incrementarse. Los frutos que fueron almacenados por 1 y 3 días en la atmósfera enriquecida en dióxido de carbono se comportan de manera similar a los frutos mantenidos en aire. En algunos experimentos se observó que los tomates tratados durante 3 días con dióxido de carbono presentaban el máximo en la síntesis de etileno un día después que los frutos controles o tratados 1 día con dióxido de carbono.

Para períodos de tratamientos mayores, 6 y 9 días en atmósfera modificada, se produce menos etileno mientras dura el tratamiento. Después que los frutos son transferidos a una atmósfera normal, la síntesis de hormona se incrementa, teniendo un máximo a tiempos mayores que los controles. A 25°C la síntesis de etileno se incrementa aún más.

Los resultados obtenidos indican que la producción de hormona en tomate entero es inhibida por el tratamiento con una atmósfera enriquecida en dióxido de carbono (20% CO₂; 16% O₂; 64% N₂) y que dicha inhibición es reversible dado que dura el tiempo en que los frutos son tratados. Asimismo, se puede observar que la baja temperatura retarda la síntesis de etileno y por ende la maduración de los frutos.

4.2. EFECTO DE LA ATMOSFERA MODIFICADA SOBRE EL DESARROLLO DE COLOR

El proceso de maduración de frutos es acompañado por la degradación de clorofila y la síntesis de licopeno, que son los compuestos más importantes en la coloración de los tomates.

Tanto la degradación de clorofila como la síntesis de licopeno son procesos desencadenados por el etileno.

Dado que el tratamiento de los tomates con una atmósfera enriquecida en dióxido de carbono inhibe la producción de etileno quisimos saber si en esas condiciones se alteraba también la coloración de los frutos. Para ello se tomaron muestras de cuatro o cinco tomates mantenidos en aire o en una atmósfera con 20% de dióxido de carbono, a distintos tiempos. El color superficial se estimó a través de los parámetros L, a y b, tal como se describió en la Sección 2.9. A efectos de comparar el color alcanzado por los frutos se realizó el cociente a/b . En la Figura 14 se muestran los resultados obtenidos a 25°C. En ella se puede observar que los tomates conservados en atmósfera de aire empiezan a desarrollar color luego del tercer día de almacenamiento, alcanzando su máxima coloración al noveno día. Igual comportamiento muestran los frutos mantenidos durante 1 día en la atmósfera enriquecida en dióxido de carbono. En el caso de los tomates tratados por más de 3 días con la atmósfera modificada no se observó desarrollo de color hasta una vez concluido el tratamiento. En la misma figura se puede observar que la forma de las curvas de a/b en función del tiempo, para todos los lotes de tomates tratados o no con una atmósfera modificada, es equivalente, pero que las mismas se desplazan hacia tiempos mayores cuanto mayor es el tiempo de tratamiento con dióxido de carbono.

En la Figura 15 se puede observar que los frutos almacenados en aire a 10°C no desarrollan color durante los 9 días

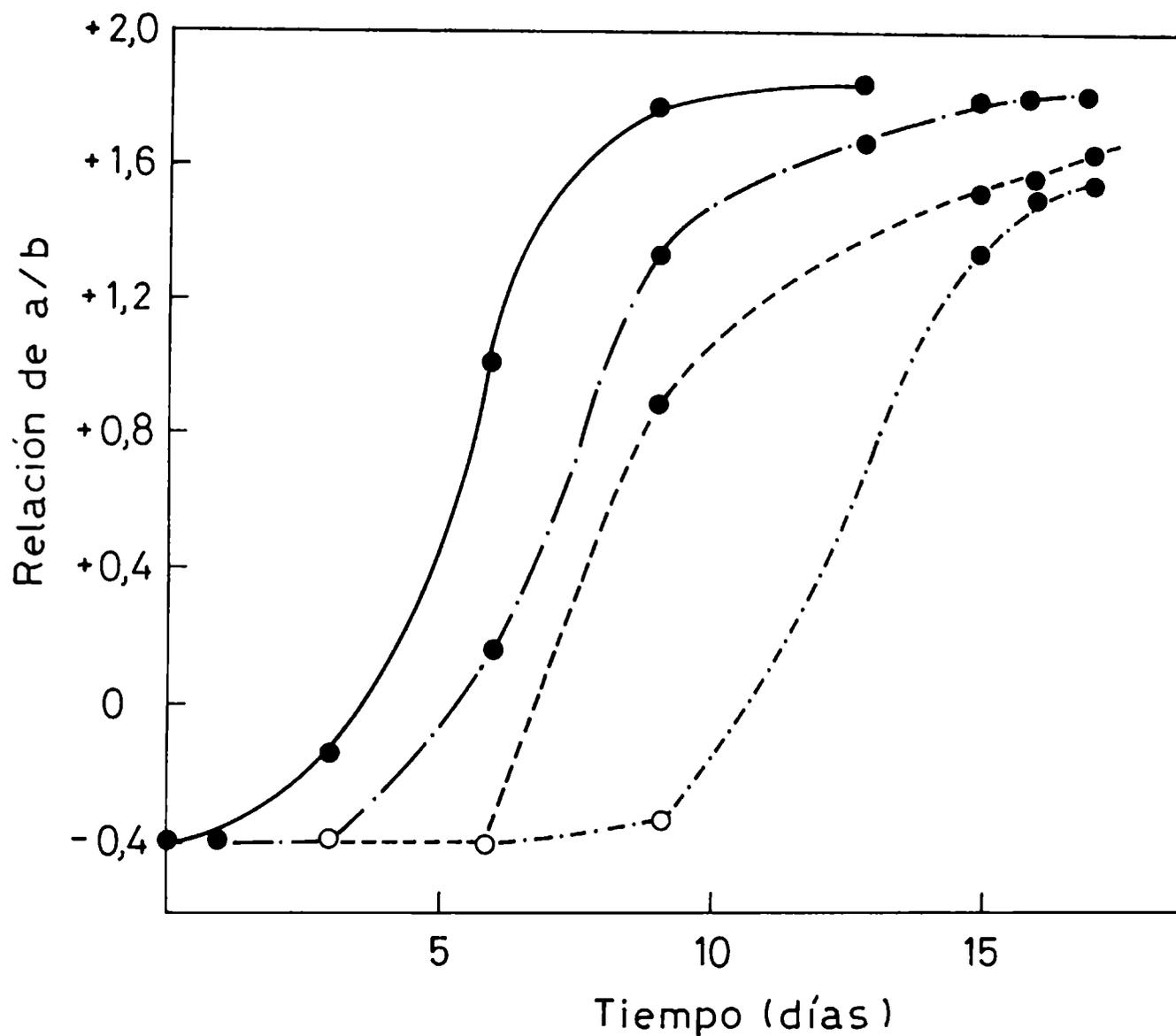


Figura 14: Desarrollo del color superficial de tomates almacenados a 25°C en aire (●—●) ó en una atmósfera enriquecida en CO₂ durante 1 (●- -●), 3 (●-.-●), 6 (●----●), 9 días (o-.-.-o).

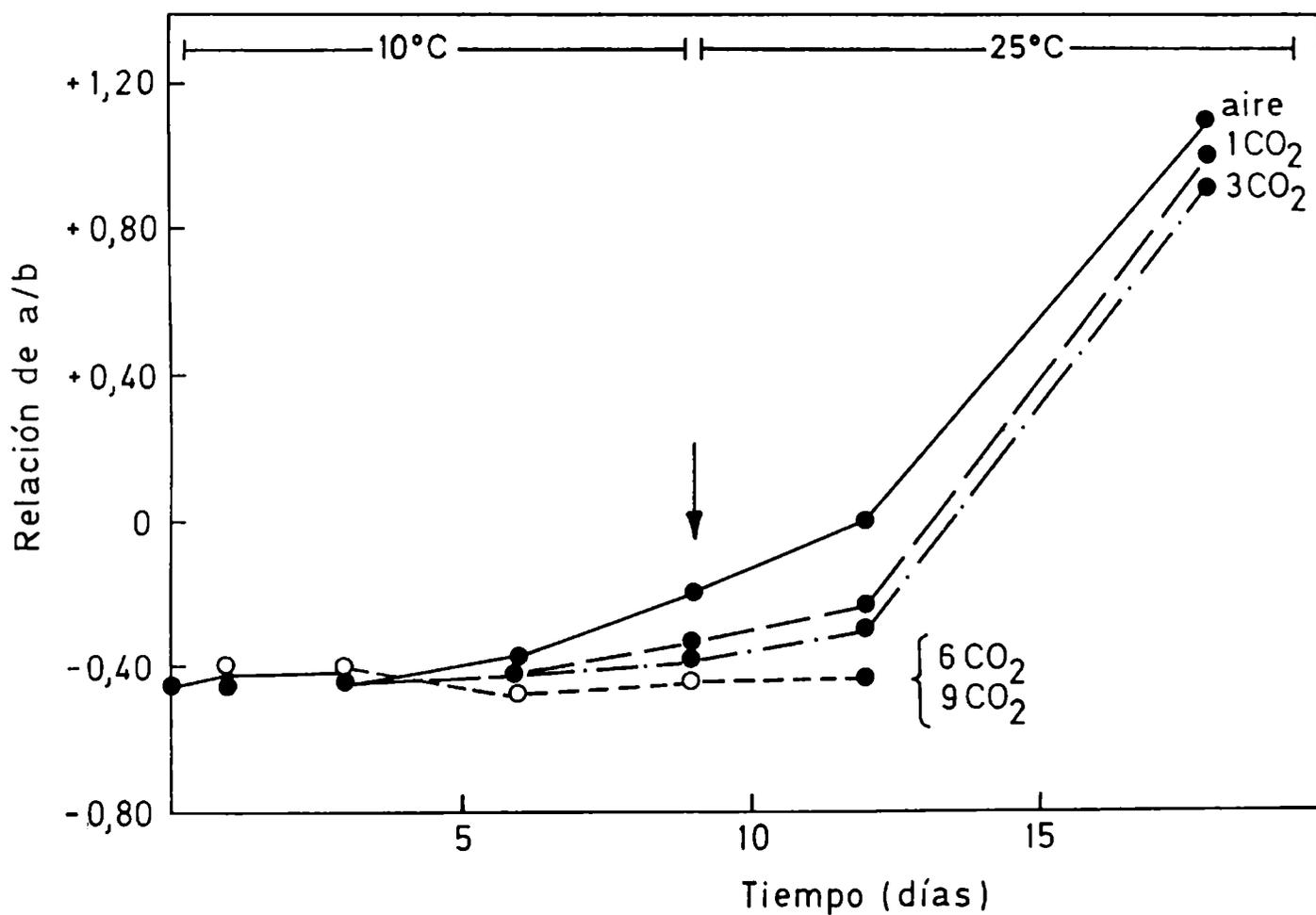


Figura 15: Desarrollo del color superficial de tomates almacenados 9 días a 10°C y luego transferidos a 25°C en aire (●—●) ó en una atmósfera enriquecida en CO₂ durante 1 (●--●), 3 (●-.-●), 6 (●....●), 9 días (o-.-o).

que permanecen a esa temperatura. Al ser transferidos a 25°C comienzan a hacerlo, pero la velocidad de evolución del mismo es menor que la correspondiente a tomates mantenidos siempre a alta temperatura. Cuando los frutos se almacenaron durante 1 y 3 días en la atmósfera enriquecida en dióxido de carbono tampoco se observó desarrollo de color mientras se los mantuvo a 10°C y sí fue detectado al ser los tomates transferidos a 25°C. No se observó ningún efecto adicional sobre el desarrollo de color de los frutos debido al tratamiento con la atmósfera modificada. Como se recordará la producción de etileno de esos frutos tampoco fue afectada por el tratamiento mencionado.

Los tomates mantenidos más de 6 días en la atmósfera enriquecida en dióxido de carbono no desarrollan color ni a baja ni a alta temperatura. Cabe recordar que los frutos que fueron tratados 6 y 9 días con la atmósfera modificada a 25°C una vez repuesto al aire desarrollaron color, alcanzando el mismo nivel que los controles. El tratamiento conjunto de baja temperatura y alta concentración de dióxido de carbono en la atmósfera daña fisiológicamente el fruto a tal punto que es fácilmente contaminado por hongos. El principal agente contaminante encontrado fue Alternaria. En las Figuras 16 a 20 se puede observar el seguimiento fotográfico realizado durante estos almacenamientos.

4.3. VARIACION DEL CONTENIDO DE ACC DURANTE EL ALMACENAMIENTO

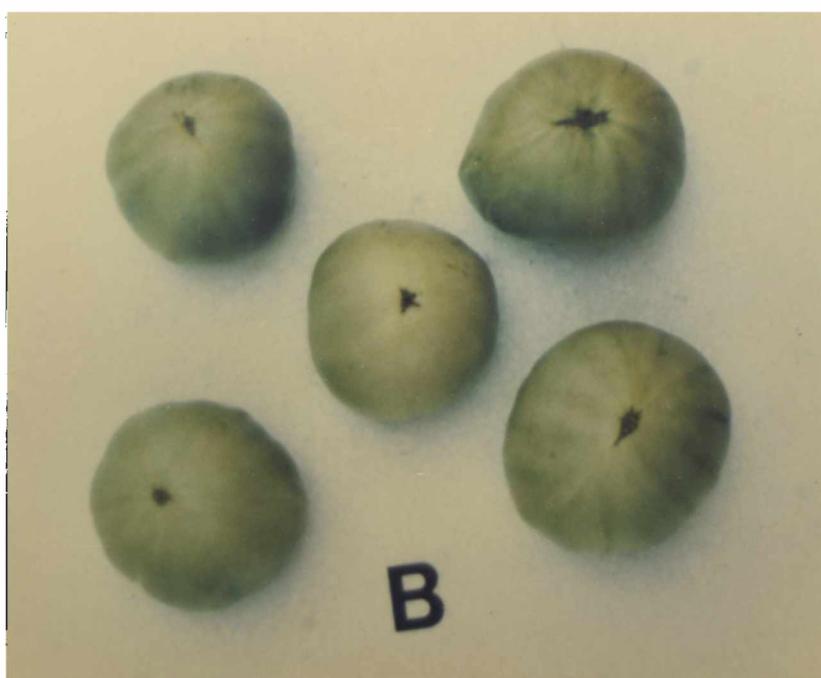
El contenido de ACC de los frutos, inmediato precursor del etileno, cambia durante el proceso de maduración. La



Figura 16:

Tomates iniciales:

Tomates almacenados
3 días a 25°C en
aire.



Tomates almacena-
dos 3 días a 25°C
en CO₂.

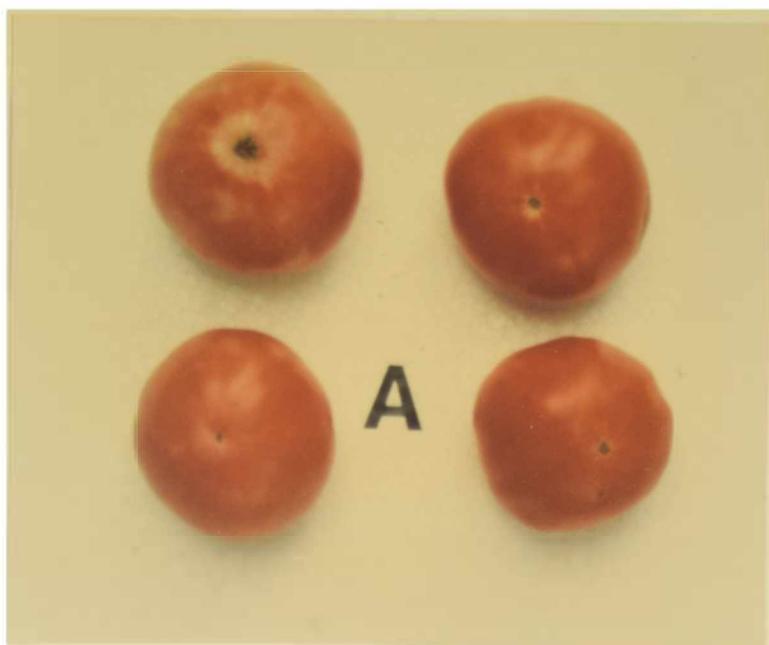
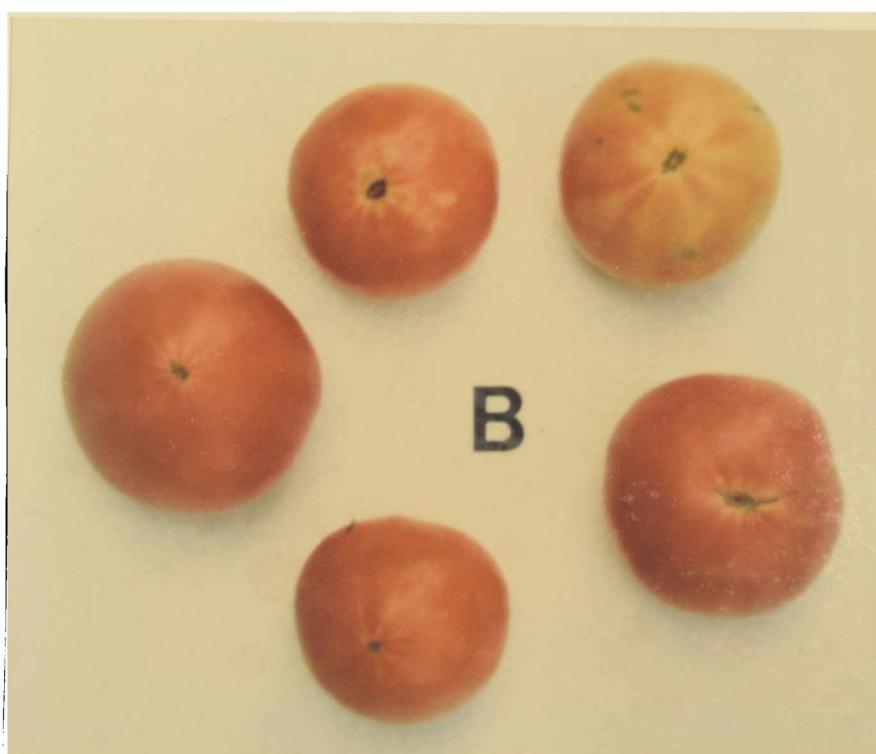


Figura 17:

Tomates almacenados
9 días a 25°C en
aire.

Tomates almacenados
3 días en CO₂ y
6 días en aire a
25°C.



Tomates almacenados
9 días a 25°C en
CO₂.



Figura 18:

Tomates iniciales

Tomates almacenados
3 días a 10°C en
aire.



Tomates almacenados
3 días a 10°C en
CO₂.

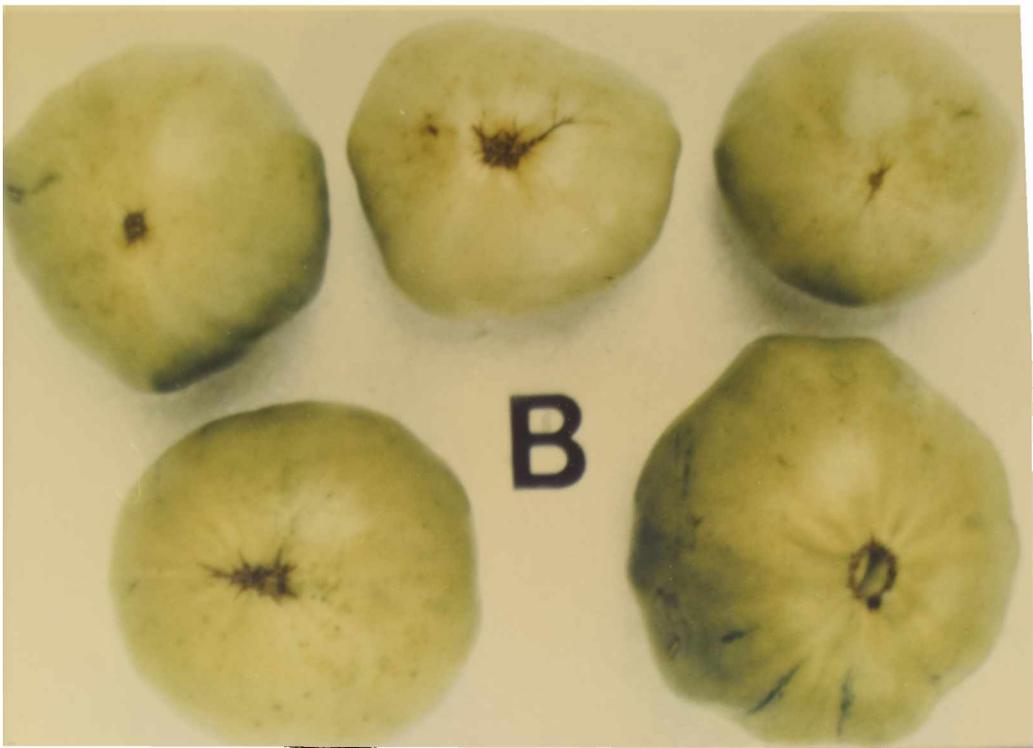
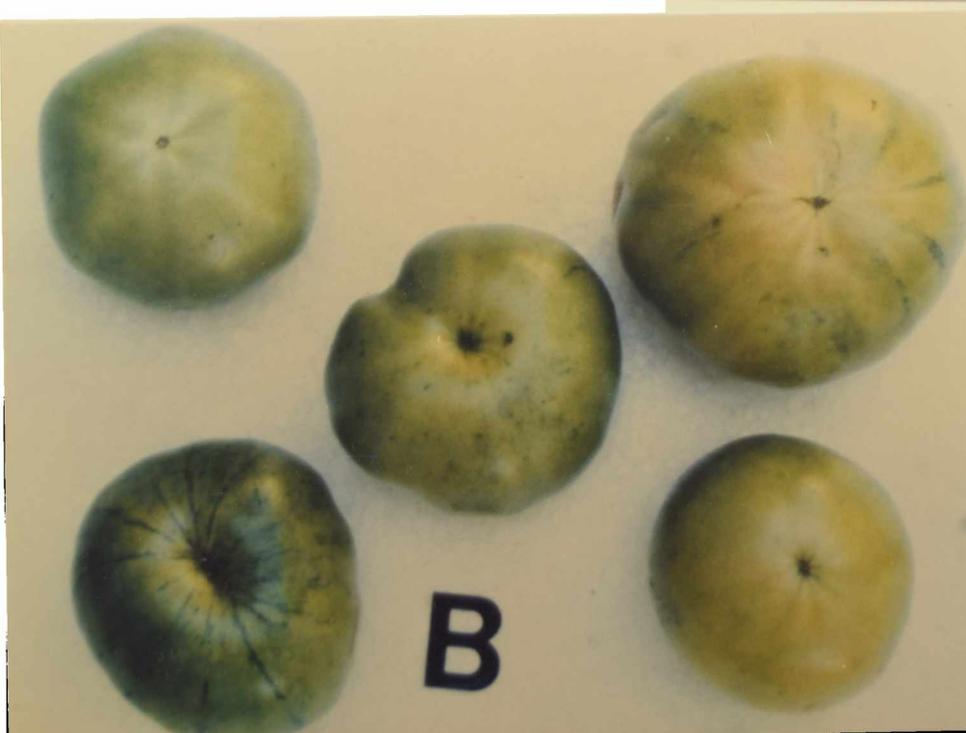
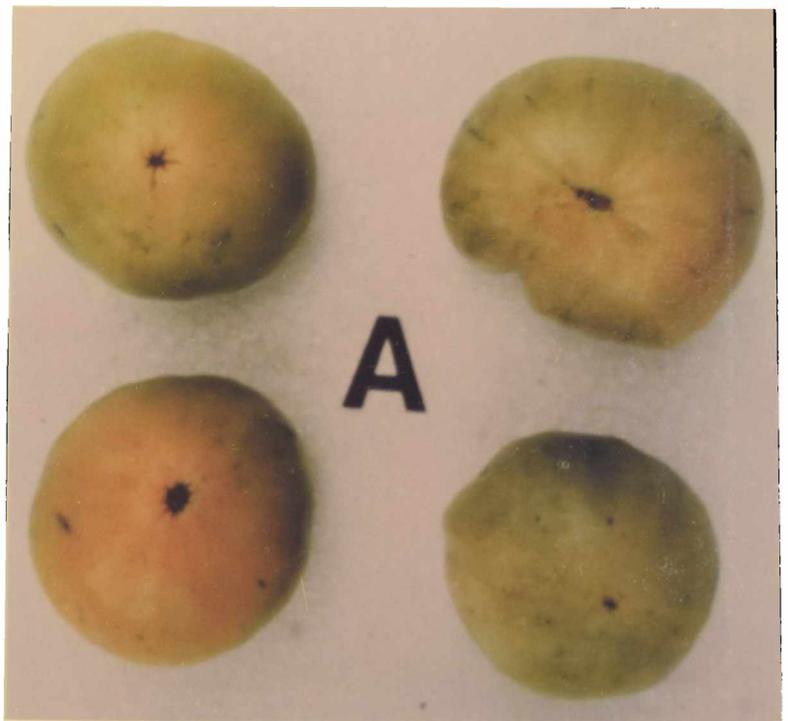


Figura 19:

Tomates almacenados
a 10°C 3 días en CO₂
y 6 días en aire.

Tomates almacenados
en aire 9 días a
10°C.

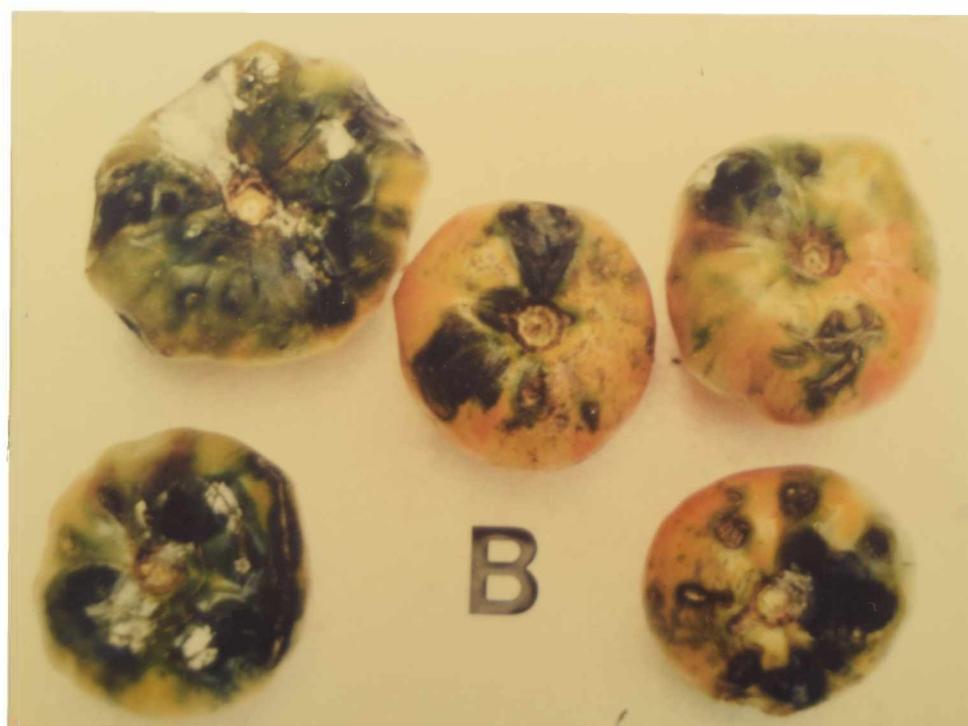
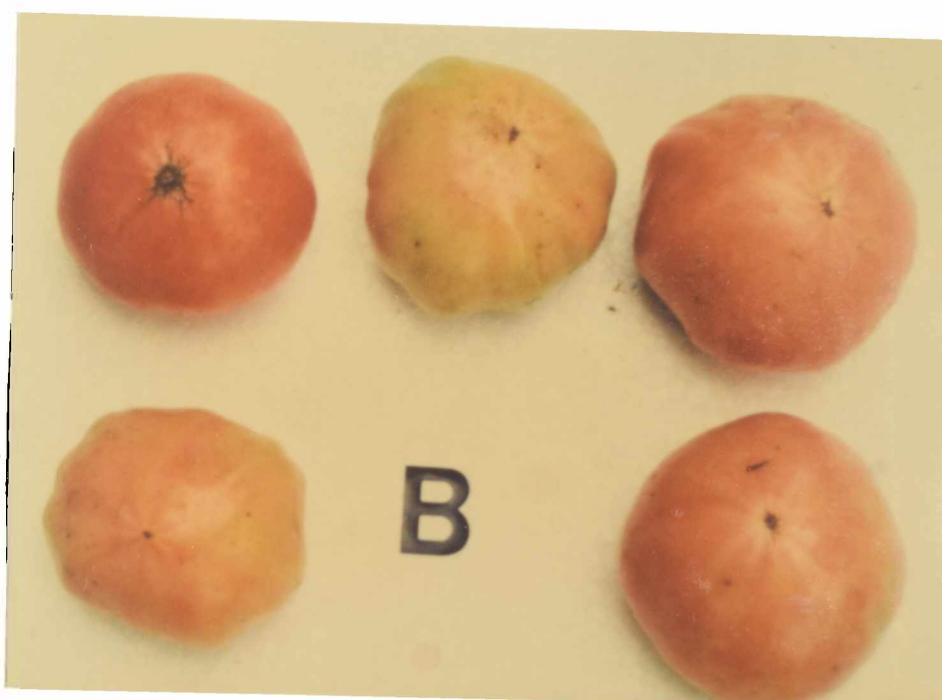


Tomates almacenados
9 días a 10°C en CO₂.



Figura 20:
Tomates almacenados
9 días a 10°C y
9 días a 25°C en
aire.

Tomates almacenados
a 10°C 3 días en CO₂,
6 días en aire y
9 días a 25°C en
aire.



Tomates almacenados
a 10°C 9 días en CO₂
y 9 días a 25°C en
aire.

evolución de dicho metabolito ha sido estudiada por Hoffman y Yang (1980), quienes observaron que el nivel de ACC comienza a aumentar cuando el tomate adquiere el estado de madurez denominado rosado "pintón". Una vez que se inicia el proceso de senescencia el contenido de dicho metabolito desciende. Acorde a Su y col. (1984) el incremento del nivel de ACC se debe a la síntesis "de novo" de la ACC sintetasa.

A efectos de determinar si el contenido de ACC es afectado por el tratamiento de los frutos con atmósferas enriquecidas en dióxido de carbono, se almacenaron tomates en aire o en atmósfera modificada a 10° y 25°C, determinándose el contenido de ACC del tejido a distintos tiempos.

En la Figura 21 se muestran los resultados obtenidos a 25°C con tomates tratados o no con la atmósfera enriquecida con dióxido de carbono. En la misma se puede observar que en los tomates que permanecieron en aire el contenido de ACC en el pericarpio se mantiene constante (0,90 nmoles/gr) durante los tres primeros días de almacenamiento; luego comienza a aumentar alcanzando un valor de 4,7 nmoles/gr en el día que presentan su máxima coloración. Con el fin de ver si esto que ocurría en el pericarpio era representativo de todo el fruto se analizó el contenido de ACC en tomate entero. Se observó que tanto en el pericarpio como en los frutos enteros mantenidos en aire a 25°C, el ACC se incrementa a partir del tercer día de almacenamiento, siendo el contenido de este metabolito semejante en ambos casos (Figura 22).

En los tomates almacenados a alta temperatura tratados

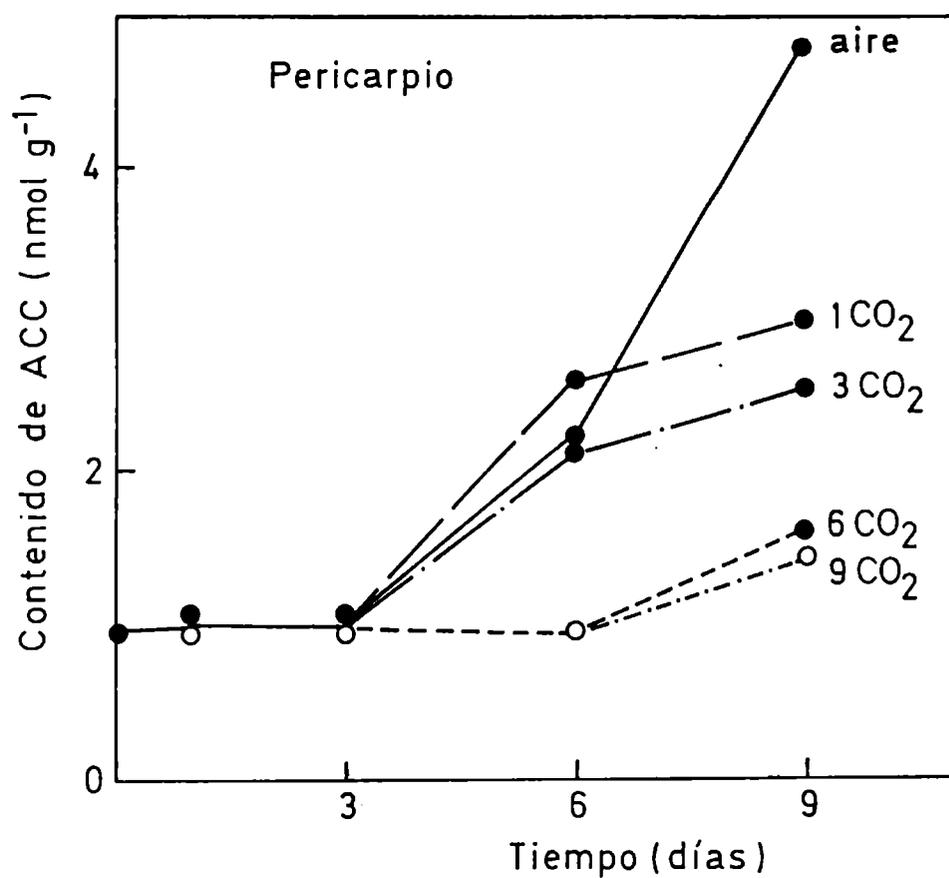


Figura 21: Variación en el contenido de ACC en el pericarpio de tomates almacenados a 25°C en aire (●—●) ó en una atmósfera enriquecida en CO₂ durante 1 (●— —●), 3 (●— . —●), 6 (●---●) y 9 días (o-.-.-o).

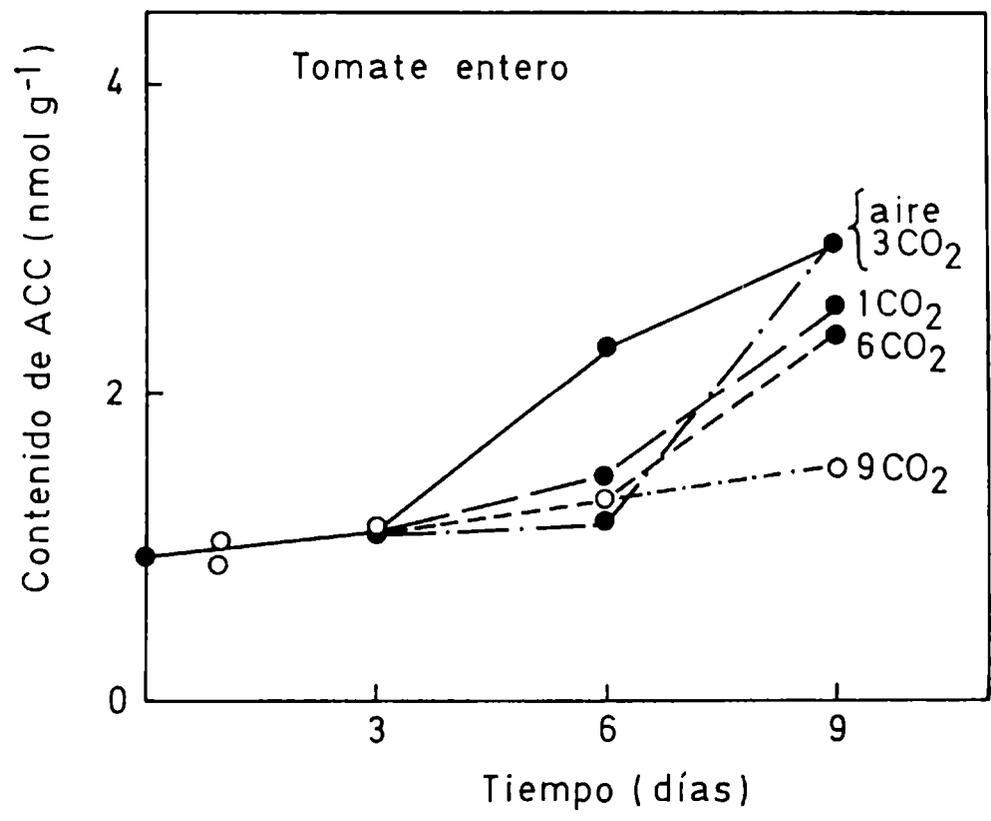


Figura 22: Variación en el contenido de ACC de tomates almacenados a 25°C en aire (●—●) ó en una atmósfera enriquecida en CO₂ durante 1 (●- -●), 3 (●- . -●), 6 (●- - -●) y 9 días (o-.-.-o).

durante 1 y 3 días con una atmósfera enriquecida en dióxido de carbono se detectó un aumento del contenido de ACC del pericarpio a partir del tercer día, alcanzando un nivel constante luego del sexto día. En el fruto entero el nivel de ACC se incrementa recién a partir del sexto día de almacenamiento (Figura 22). Períodos de tratamiento con la atmósfera modificada de 6 y 9 días impiden el aumento del nivel de ACC tanto en pericarpio como en tomate entero. En el primer caso la transferencia de los frutos a aire provoca un ligero aumento de dicho metabolito.

Los resultados mostrados en la Figura 23 indican que el almacenamiento de tomates a baja temperatura, independiente de la atmósfera empleada, evita la síntesis de ACC. Este metabolito sólo comienza a aumentar su nivel cuando los frutos son transferidos a 25°C, siempre y cuando la exposición al dióxido de carbono no haya sido muy prolongada como para dañar el fruto, tanto fisiológicamente como por acción de la flora contaminante.

4.4. VARIACION DEL CONTENIDO DE MACC DURANTE EL ALMACENAMIENTO

En las plantas el ACC puede ser convertido en etileno o en un N-malonil derivado denominado MACC (Amrhein y col., 1981; Hoffman y col., 1982b, Adams y Yang, 1979). La velocidad de producción de etileno puede ser afectada por tres reacciones: la conversión de ACC en etileno, la transformación de SAM en ACC y el pasaje de ACC a MACC. Como se vio en la Sección 4.1., la producción de etileno es menor en frutos almacenados en una

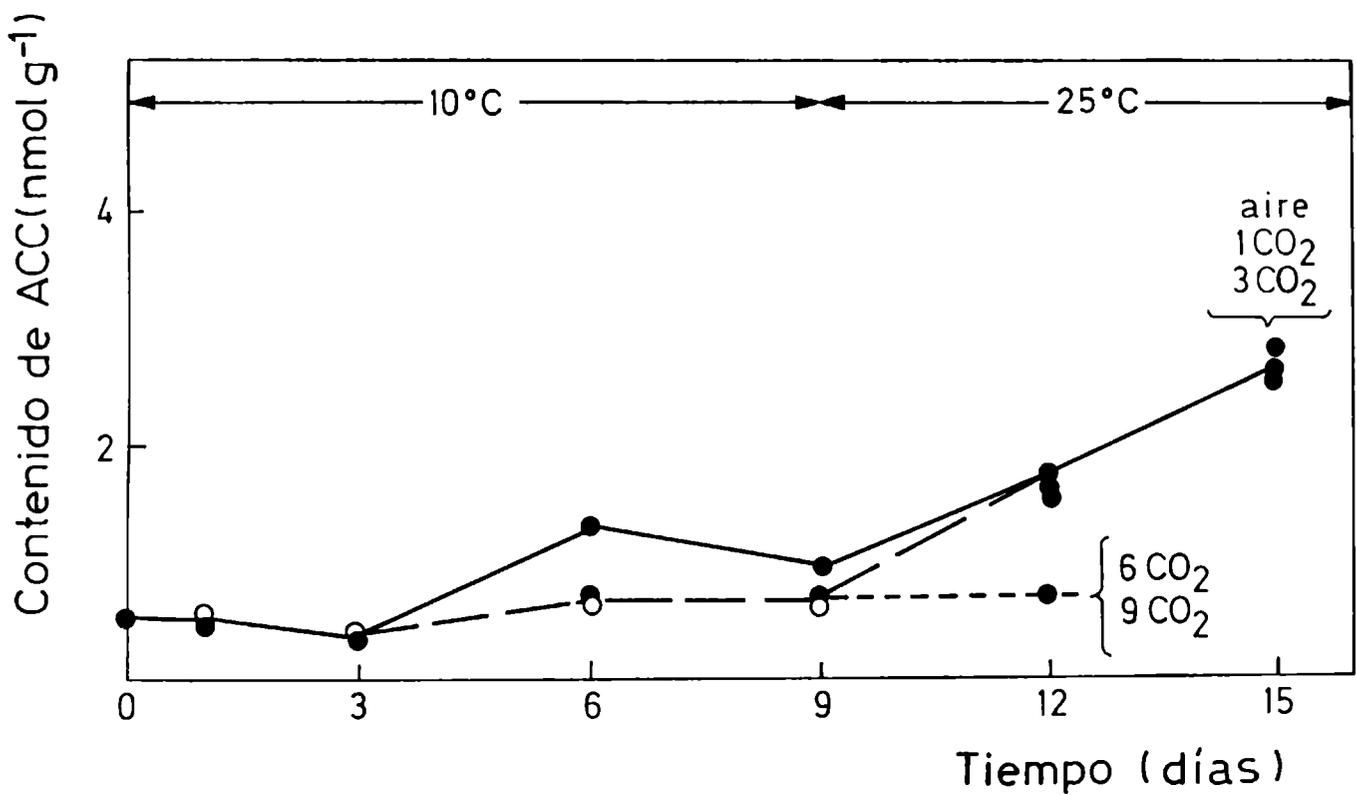


Figura 23: Variación en el contenido de ACC en el pericarpio de tomates almacenados a 10°C durante 9 días y luego transferidos a 25°C en aire (●—●) ó en una atmósfera enriquecida en CO₂ durante 1 (●—●), 3 (●—●), 6 (●—●) y 9 días (○—●).

atmósfera enriquecida en dióxido de carbono que aquellos mantenidos en aire. A efectos de analizar si este hecho es debido, al menos en parte, a una mayor malonización del ACC, se estudió la variación del contenido de MACC en el pericarpio de tomates tratados o no con una atmósfera modificada.

Los resultados obtenidos durante el almacenamiento realizado a 25°C se muestran en la Figura 24. En ella se puede observar que el contenido de MACC del pericarpio de los tomates conservados en la atmósfera normal (aire) comienza a incrementarse a partir del tercer día, coincidentemente con el aumento en el nivel de ACC. Cabe además señalar que el nivel de MACC fue siempre mayor que el correspondiente a ACC. Estos resultados son comparables con los hallados por Knee (1985) en manzana, quien observó que el ACC y MACC aumentan a medida que el fruto madura, manteniéndose en todo momento el nivel de MACC por encima del de ACC.

Cuando los tomates son tratados con una atmósfera enriquecida en dióxido de carbono se detecta el siguiente comportamiento: tratamientos por períodos hasta 3 días no modifican el comportamiento observado en aire; sin embargo, el nivel de MACC alcanzado es superior al detectado en el control (tomates mantenidos en aire). Tratamientos por tiempos mayores (6 días) inhiben el incremento en el nivel de MACC, inhibición que desaparece cuando los frutos son transferidos a aire. Nuevamente se observa un paralelismo entre el comportamiento de ACC y de MACC. La variación observada en el contenido de MACC en pericarpio es la misma que se presenta en tomate entero (Figura 25).

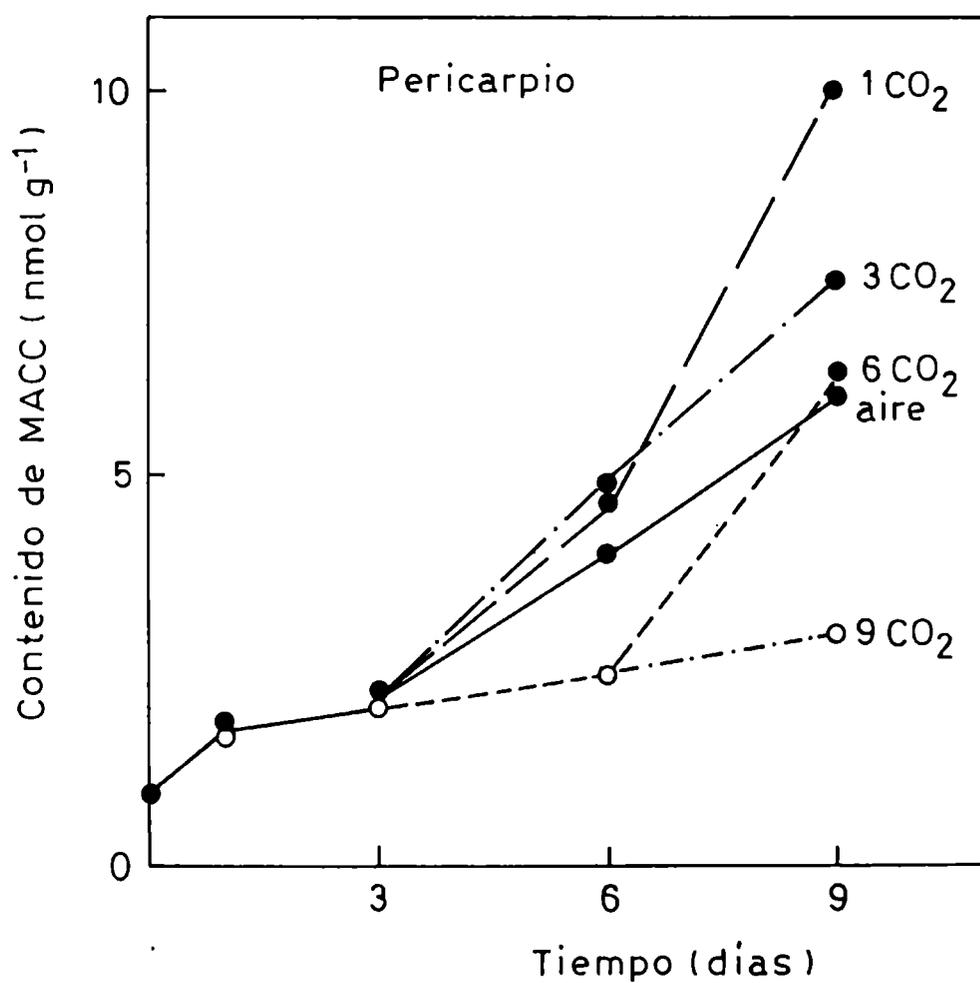


Figura 24: Variación en el contenido de MACC en el pericarpio de tomates almacenados a 25°C en aire (●—●) ó en una atmósfera enriquecida en CO₂ durante 1 (●- -●), 3 (●- . -●), 6 (●-----●) y 9 días (o-.-.-o).

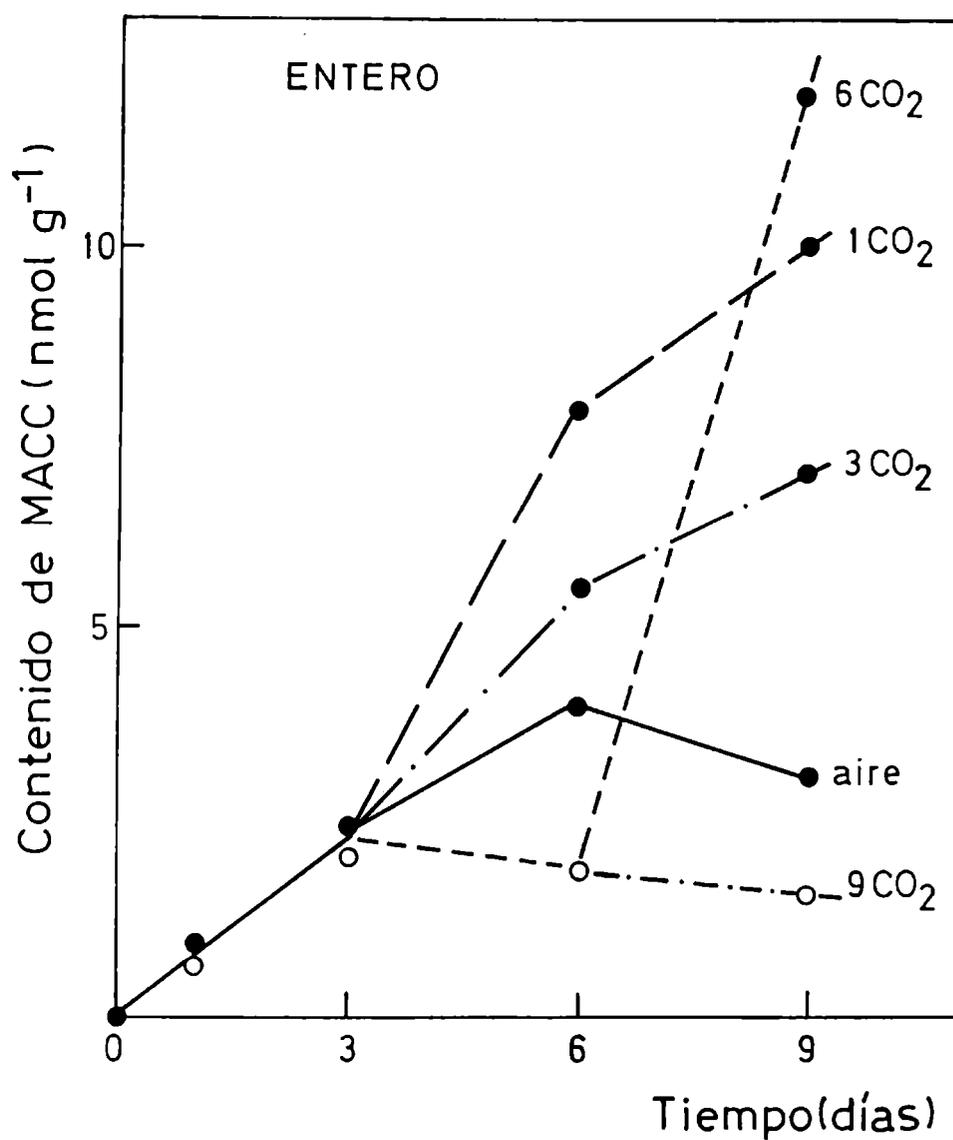


Figura 25: Variación en el contenido de MACC en tomates almacenados a 25°C en aire (●—●) ó en una atmósfera enriquecida en CO₂ durante 1 (●- -●), 3 (●- . -●), 6 (●---●) y 9 días (o-.-o).

Los resultados obtenidos durante el almacenamiento a baja temperatura, 10°C, se muestran en la Figura 26. En la misma se puede observar que el nivel de MACC, al igual de lo que ocurría con el correspondiente a ACC, permanece constante en tanto se mantengan los frutos a baja temperatura. Cuando éstos son transferidos a 25°C se observa un aumento en el contenido de este metabolito. Los tratamientos prolongados, 6 y 9 días, con atmósferas enriquecidas en dióxido de carbono, no arrojaron resultados debido al daño que se produce en los tomates por acción de la baja temperatura. Daño que fue detectado en experiencias previas (Sección 4.3.).

Los resultados obtenidos sugieren que la disminución observada en la síntesis de etileno, como consecuencia del tratamiento con atmósferas modificadas o por la acción de la baja temperatura, no sería debida a una mayor malonización del ACC. Para tratamientos superiores a los 3 días no se detecta una acumulación del MACC; podría ocurrir que este metabolito a su vez tuviera otro destino no determinado en nuestros ensayos.

4.5. VARIACION DEL CONTENIDO DE AZUCARES SOLUBLES DURANTE EL ALMACENAMIENTO

Los azúcares solubles de la mayoría de las variedades comerciales de tomates son reductores (Hamner y Maynard, 1942; Winsor y col., 1962a; Lambeth y col., 1964). Dichos azúcares constituyen entre el 1,5 - 4,5% del peso fresco, lo que equivale al 65% del total de sólidos solubles (Winsor, 1966). Los componentes mayoritarios son glucosa y fructosa; con una pequeña

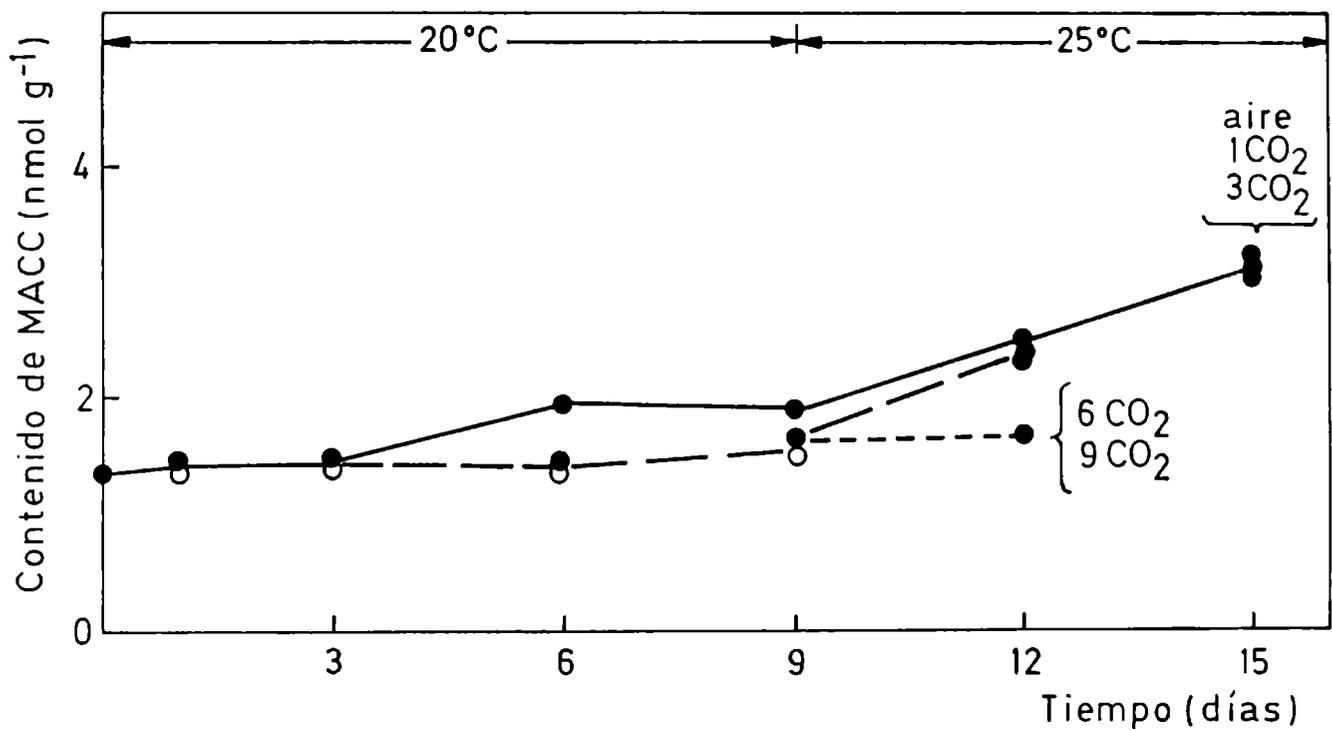


Figura 26: Variación en el contenido de MACC en el pericarpio de tomates almacenados a 10°C durante 9 días y luego transferidos a 25°C en aire (●—●) ó en una atmósfera enriquecida en CO₂ durante 1 (●—●), 3 (●—●), 6 (●—●) y 9 días (○—○).

predominancia de este último; la sacarosa en general no excede el 0,4% del peso fresco (Davies, 1958; Freeman, 1960; Simandle y col., 1966).

El contenido en azúcares solubles se incrementa durante la maduración de los frutos (Winsor y col., 1962a; Lambeth y col., 1964), el mayor incremento se observa con la aparición del pigmento amarillo (Winsor y col., 1962a, b).

A los efectos de ver si durante el almacenamiento de tomates enteros en la atmósfera modificada se altera el metabolismo de estos azúcares es que se estudió la variación de los mismos durante la conservación.

4.5.1. Cambios del contenido de glucosa y fructosa durante el almacenamiento

El método analítico empleado (véase Sección 2.6.3.2.) para separar los azúcares solubles no nos permitió resolver el par glucosa-fructosa, por lo tanto ambos monosacáridos se informan juntos. En la Figura 27 se muestran los resultados obtenidos al almacenar tomates a 25°C. En ella se puede observar que el contenido de los azúcares correspondiente a los frutos almacenados en aire prácticamente no varía.

Los tomates tratados con la atmósfera enriquecida con dióxido de carbono (independientemente del tiempo que dura el tratamiento) se comportan de manera semejante a los controles (frutos mantenidos en aire). Goodenough y col. (1982) observaron que durante el almacenamiento de tomates en atmósfera modificada (5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂) el contenido de glucosa y fructosa

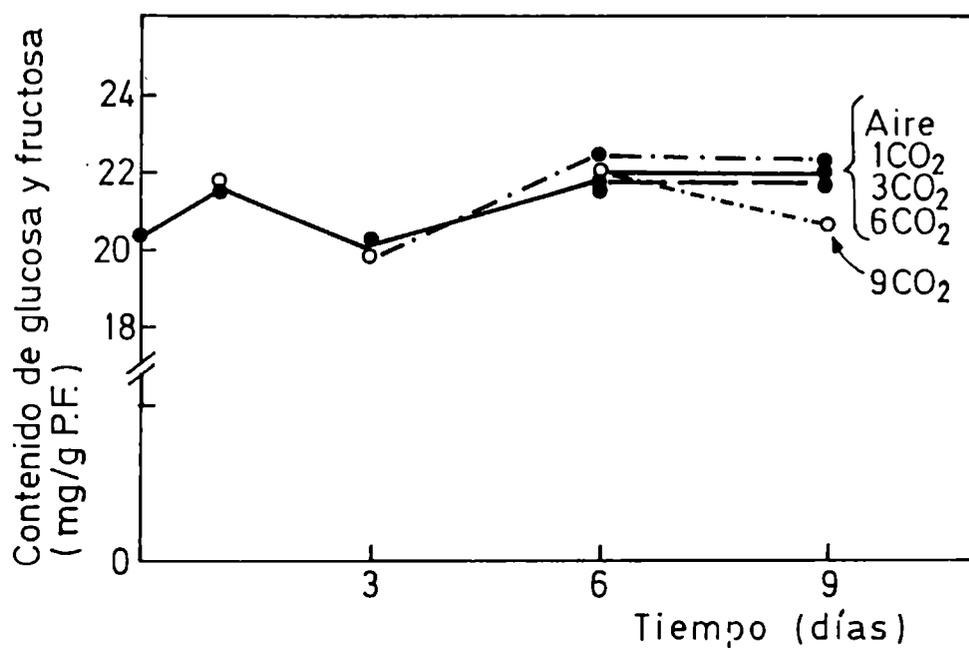


Figura 27: Cambios en el contenido de glucosa y fructosa en el pericarpio de tomates almacenados a 25°C en aire (●—●) ó en una atmósfera enriquecida en CO₂ durante 1 (●— —●), 3 (●— . —●), 6 (●---●) y 9 días (o-.-o).

aumenta a expensas de la degradación de almidón. Durante dicho almacenamiento no se observó desarrollo de color y de otros parámetros relacionados con la madurez; por lo que dichos autores concluyeron que la variación en el contenido de fructosa y glucosa tiene lugar aún en presencia de una atmósfera modificada.

Los resultados obtenidos en los almacenamientos llevados a cabo a 10°C se muestran en la Figura 28. En la misma se puede ver que no existe una gran variación en el contenido de glucosa y fructosa durante el almacenamiento, coincidentemente con lo observado a alta temperatura. Los frutos tratados con la atmósfera modificada se comportan igual a los controles.

4.5.2. Cambios en el contenido de sacarosa durante el almacenamiento

La variación en el contenido de sacarosa durante el almacenamiento en atmósfera normal o modificada se muestra en la Figura 29. En dicha figura se puede observar que a medida que los frutos mantenidos en aire van madurando el nivel de sacarosa disminuye. El descenso de este metabolito comienza a manifestarse a partir del tercer día, llegando a valores no detectables antes del sexto día. Estos resultados concuerdan con los hallados por Goodenough y col. (1982) quienes informaron que el contenido de sacarosa disminuye a medida que el fruto madura.

El tratamiento de los tomates por períodos de 1 y 3 días con la atmósfera modificada provoca un retardo en el consumo de sacarosa, cuyo descenso comienza a manifestarse a partir del sexto día.

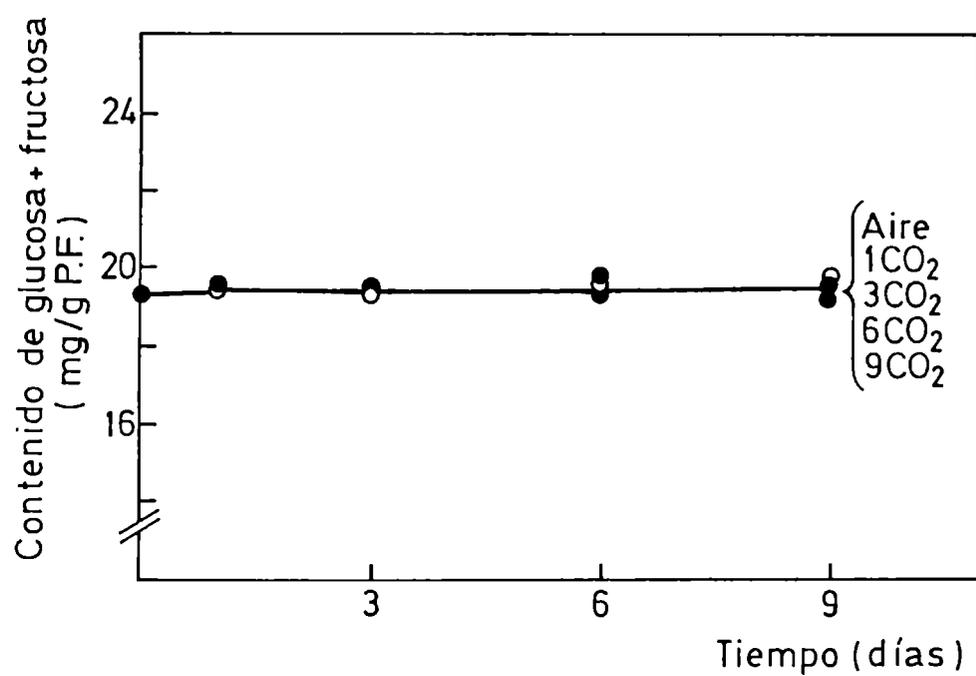


Figura 28: Cambios en el contenido de glucosa y fructosa en el pericarpio de tomates almacenados a 10°C durante 9 días y luego transferidos a 25°C en aire (●—●) ó en atmósfera enriquecida en CO₂ durante 1 (●—●), 3 (●—●), 6 (●—●) y 9 días (○—○).

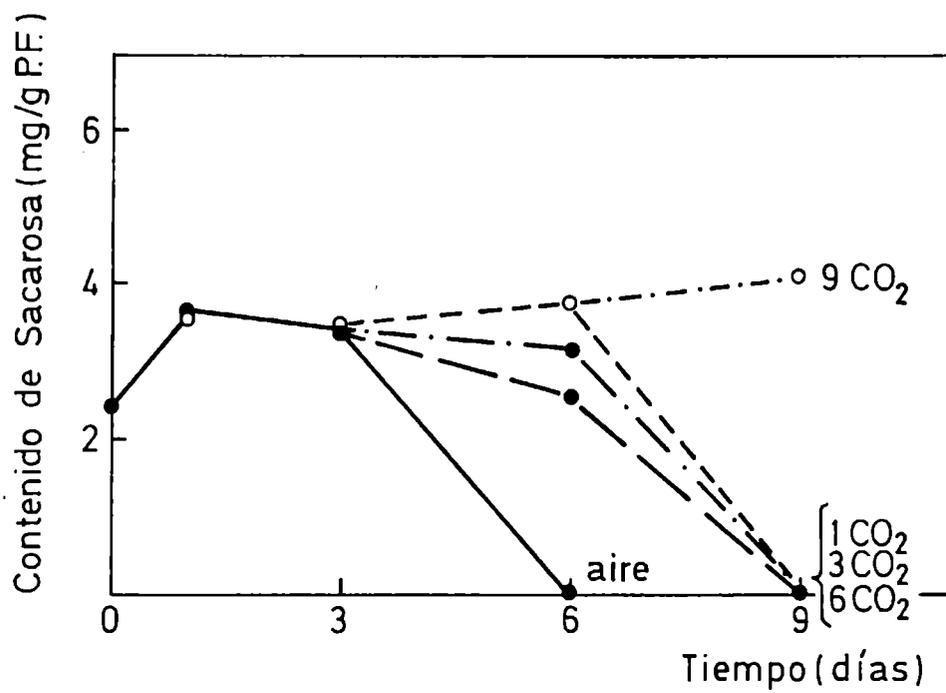


Figura 29: Cambios en el contenido de sacarosa en el pericarpio de tomates almacenados a 25°C en aire (●—●) ó en una atmósfera enriquecida en CO₂ durante 1 (●--●), 3 (●-.-●), 6 (●---●) y 9 días (o-.-o).

Tratamientos con la atmósfera enriquecida en dióxido de carbono durante seis días impiden la transformación de la sacarosa, la cual comienza a detectarse recién cuando se concluye el tratamiento.

En los experimentos de almacenamiento llevados a cabo a 10°C el nivel de sacarosa presente en el tejido es inferior al correspondiente a frutos almacenados a 25°C. No se observó que el contenido de dicho disacárido variara durante el almacenamiento ni que el mismo sea afectado por el tratamiento con dióxido de carbono (Figura 30). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Buescher (1975) quien informó que el nivel de sacarosa disminuye al almacenar los frutos a temperaturas menores a los 15°C.

4.6. VARIACION DEL CONTENIDO DE INVERTASA DURANTE EL ALMACENAMIENTO

Como se observó que el contenido de sacarosa en el pericarpio de los tomates disminuía a medida que los frutos maduraban, se intentó ver si dicho efecto se podía correlacionar con la actividad de invertasa presente en el tejido. En la Figura 31 se muestran los resultados obtenidos. En ella se puede observar que en los frutos almacenados en aire el contenido de dicha enzima aumenta a medida que los frutos van madurando. El incremento en la actividad de invertasa es anterior al descenso observado en el contenido de sacarosa. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Grierson y col. (1981) quienes informaron que la actividad de la invertasa se

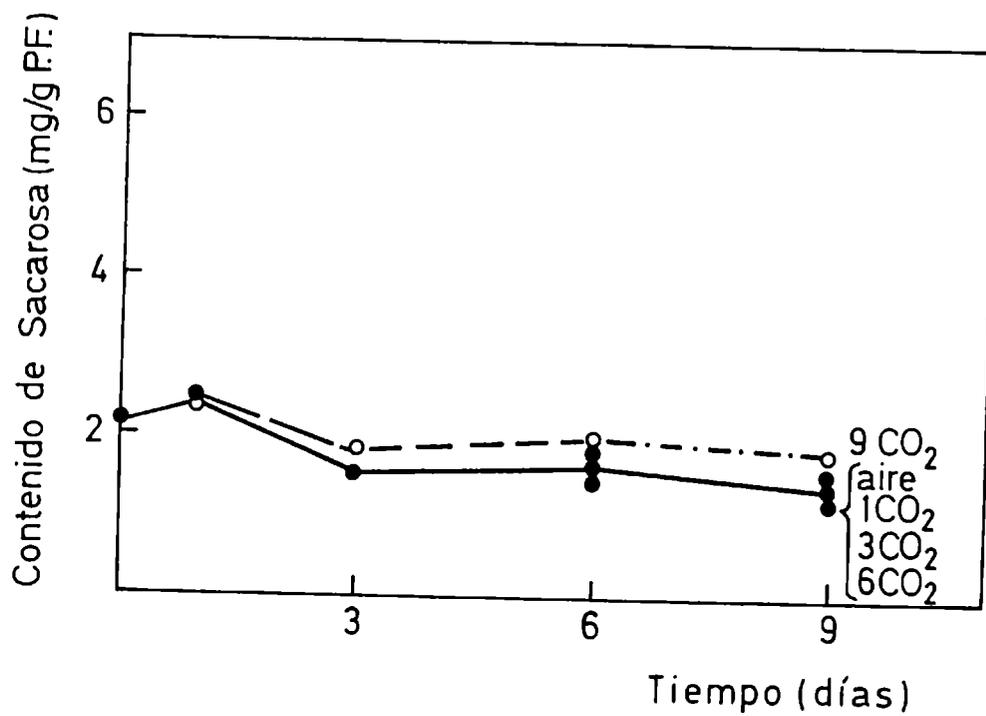


Figura 30: Cambios en el contenido de sacarosa en el pericarpio de tomates almacenados a 10°C durante 1 día y luego transferidos a 25°C en aire (●—●) ó en una atmósfera enriquecida en CO₂ durante 1 (●- -●), 3 (●- . -●), 6 (●---●) y 9 días (o-.-o).

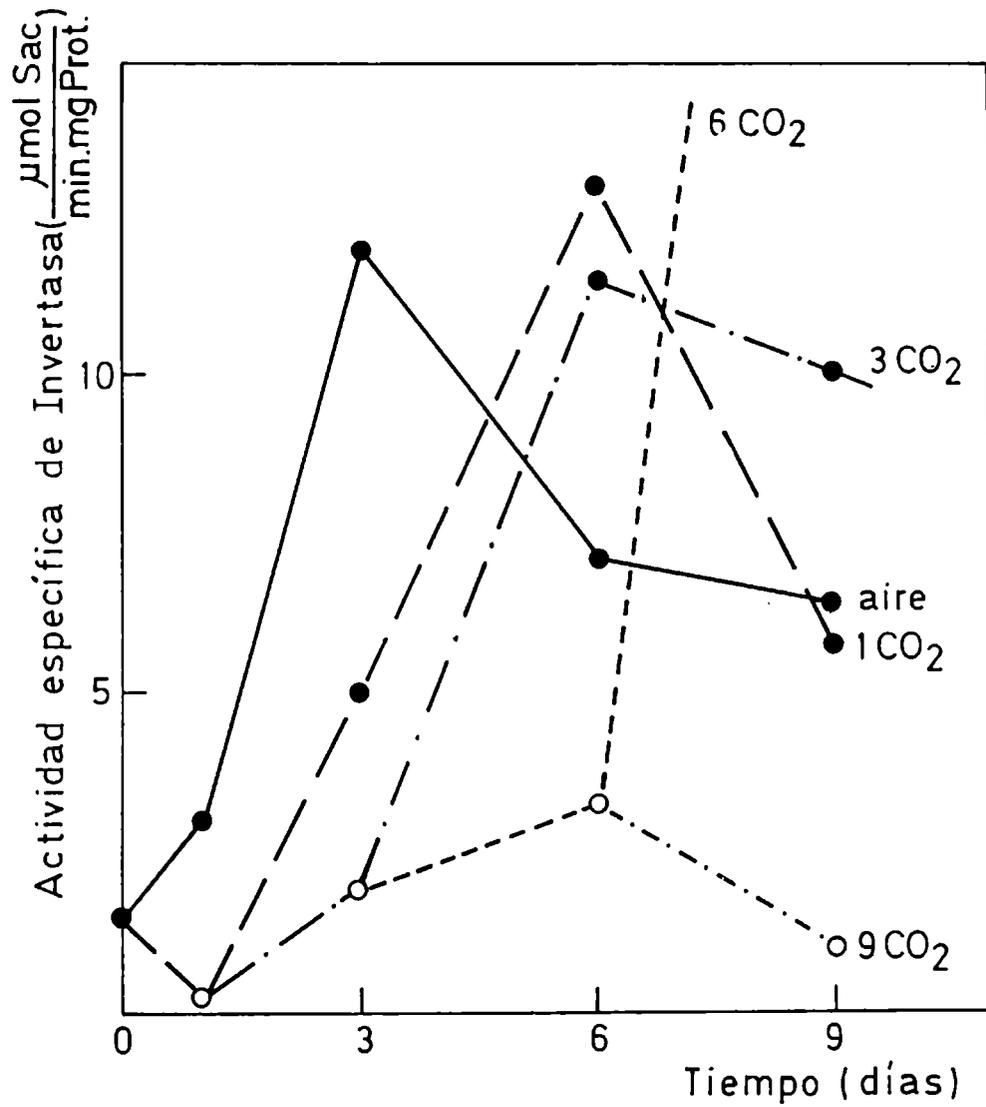


Figura 31: Variación en la actividad específica de invertasa aislada a partir de pericarpio de tomates almacenados a 25°C en aire (●—●) ó en una atmósfera enriquecida en CO₂ durante 1 (●- -●), 3 (●- . -●), 6 (●---●) y 9 días (o-.-o).

incrementa a medida que los frutos maduran. Se ha sugerido que el incremento observado en la actividad de dicha enzima es debido a una síntesis de novo (Iki y col., 1978). Sin embargo, no hay acuerdo si el contenido de invertasa en el fruto maduro es mayor que en el senescente (Manning y Maw, 1975; Nakagana y col., 1980). Se han presentado evidencias de la existencia de una proteasa neutra la cual degrada la invertasa de forma selectiva cuando el fruto se halla en el estadio de senescencia (Nakagana y col., 1981). Nosotros hallamos que cuando el fruto va entrando en dicho estado la actividad de dicha enzima desciende.

En los frutos tratados con la atmósfera modificada no se observa aumento en la actividad de invertasa hasta una vez concluído el tratamiento. Este resultado concuerda con la variación observada en el contenido de sacarosa en dichos frutos. Jeffery y col. (1984) observaron que el incremento en la actividad de invertasa era dependiente de la producción de etileno lo que también estaría de acuerdo con lo encontrado por nosotros, ya que la producción de etileno de dichos frutos está inhibida por la presencia de dióxido de carbono en la atmósfera. Cuando los frutos son repuestos al aire se observa un aumento de la síntesis de etileno y por consiguiente de la actividad de invertasa.

4.7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos con tomate entero muestran que el almacenamiento a alta temperatura, 25°C, en una atmósfera enriquecida en dióxido de carbono inhibe el desarrollo de color de los frutos; color que evoluciona normalmente cuando los tomates son transferidos a una atmósfera normal (Figura 14). Asimismo, altos contenidos de dióxido de carbono impiden la disminución del nivel de sacarosa durante el almacenamiento (Figura 29), efecto que es revertido en aire. En este último caso se detectó, en forma coincidente, un incremento en la actividad específica de invertasa del tejido (Figura 31).

Ambos efectos, inhibición del desarrollo de color e inducción de la invertasa, son consecuencia de una disminución de la síntesis de etileno provocada por el tratamiento con dióxido de carbono (Figura 12). Este tratamiento a su vez impide el aumento del nivel de ACC y MACC en el tejido (Figuras 21 y 24).

Los frutos almacenados a baja temperatura, 9 días a 10°C, tratados durante 1 a 3 días con dióxido de carbono, se comportan como los mantenidos en aire. Este resultado se explica si se tiene en cuenta que el almacenamiento en atmósfera enriquecida en dióxido de carbono concluye antes que se inicie el proceso de maduración; proceso que se ve retrasado por la baja temperatura. Tratamientos por períodos más prolongados, mayores a 3 días, provocan daños fisiológicos en los frutos y estimulan la contaminación de los mismos. Los frutos tratados por 6 y 9 días a 25°C no presentaron daño fisiológico ni contaminación, por lo

que parecería que el daño antes descrito sería debido al efecto sinérgico de la baja temperatura y altas concentraciones de dióxido de carbono en la atmósfera (Figura 20).

El conjunto de estos resultados nos permitiría concluir que el dióxido de carbono frena el proceso de maduración de los frutos a través de una disminución de la síntesis de etileno. En cuanto al sitio de acción del dióxido de carbono, éste debería estar localizado en un paso anterior a la transformación de ACC a etileno, puesto que este metabolito no se acumula por acción del tratamiento antes mencionado.

CONCLUSIONES

MODO DE ACCION DEL DIOXIDO
DE CARBONO SOBRE LA VIA
DE SINTESIS DE ETILENO

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que los tomates almacenados a temperatura ambiente en una atmósfera enriquecida en dióxido de carbono o aquéllos mantenidos en aire a baja temperatura poseen un período de vida útil mayor que los mantenidos en aire a 25°C. Esto es consecuencia de una disminución de la velocidad de las reacciones metabólicas, efecto de la temperatura, o por una inhibición en la síntesis de etileno, efecto de la atmósfera.

El incrementar el contenido de dióxido de carbono de la atmósfera implica generalmente disminuir el nivel de oxígeno de la misma. Cabe preguntarse si la inhibición de la síntesis de etileno por la atmósfera es provocada por el contenido de dióxido de carbono, el de oxígeno o ambos. Los resultados obtenidos en este trabajo (Figura 8) muestran que el nivel de ACC del fruto condiciona el efecto del contenido de oxígeno sobre la producción de hormona. El valor promedio de ACC para frutos en condiciones de almacenar es de 1 nmol/g; en estas condiciones se debería disminuir el contenido de oxígeno de la atmósfera hasta un 13% para inhibir la síntesis de etileno. Estos resultados indicarían que el efecto de la atmósfera sobre la producción de hormona, en las condiciones de almacenamiento más usuales, es debida al contenido de dióxido de carbono.

Estudios previos demostraron que el etileno es sintetizado a partir de metionina, siendo su precursor inmediato el ACC (Adams y Yang, 1979; Lieberman y col., 1966). Nos resta conocer

en qué paso el dióxido de carbono ejerce su acción.

Los estudios realizados con discos de pericarpio de tomate mostraron que la actividad de las enzimas involucradas en los sistemas de conversión de SAM en ACC y ACC en etileno, no eran afectadas por el dióxido de carbono (Figura 9, Tablas 2 y 4) Este hecho es extrapolable a fruto entero, puesto que no se detectó variación del contenido de ACC ni de su derivado malonizado, MACC, mientras los frutos fueron mantenidos en este tipo de atmósferas (Figuras 21,22,23,24,25,26). Si el dióxido de carbono afectara la actividad del sistema formador de etileno sería esperable una acumulación de uno o los dos metabolitos mencionados, en tanto que si alterara la actividad de la ACC sintetasa el nivel de ACC podría disminuir o mantenerse constante.

La última opción está basada en el hecho que en los tomates almacenados a 25°C en aire no se detecta un aumento en el nivel de ACC previo a la síntesis de etileno. Esto sugiere la existencia de una regulación metabólica que implicaría que todo el ACC formado se transforma en etileno. Por lo tanto una inhibición de la actividad de la ACC sintetasa no necesariamente provocaría una disminución del nivel de ACC del tejido concomitante con la disminución de la producción de etileno. Cuando esta hormona alcanza un cierto nivel, induce "per sé" a la ACC sintetasa. A partir de este momento se pierde la regulación antes mencionada, detectándose una acumulación de ACC en el tejido. Este hecho lo hemos verificado en las experiencias llevadas a cabo con tomates enteros, almacenados en aire a 25°C o tratados con dióxido de carbono hasta un período máximo

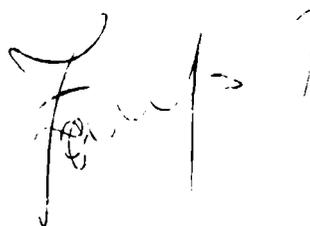
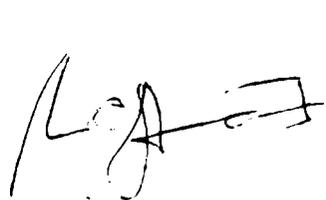
de tres días. La desregulación metabólica es coincidente con el desarrollo de color superficial así como de otros cambios relacionados con la maduración y posterior senescencia de los frutos.

Dado que el ACC es el precursor inmediato del etileno, su nivel necesariamente debe incidir en la síntesis de esta hormona. Estudios realizados por Acaster y Kende (1982) han mostrado que la ACC sintetasa posee una vida media corta lo que implica una síntesis continua de la misma para mantener el nivel requerido de ACC. Esto nos llevó a preguntarnos si el dióxido de carbono podría estar afectando la cantidad de enzima existente en el tejido. Los resultados obtenidos (Figura 11) indican que altos niveles de dióxido de carbono inhiben la inducción de la ACC sintetasa provocada por corte y que dicha inhibición es detectable después de 90 minutos de incubación, tiempo tres veces superior al correspondiente a la vida media de esta enzima. Además se observó que la cantidad de ACC sintetasa no llega a cero a tiempos ampliamente superiores al de su vida media. Estos hechos, conjuntamente con la no alteración de la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis hormonal, sugieren que el dióxido de carbono podría actuar a nivel de transcripción y/o a nivel de traducción.

Estudios realizados recientemente en peras (Knee, 1987) indican la existencia de mRNAs preformados correspondientes a ACC sintetasa. Extrapolando estos hallazgos a nuestro sistema, podríamos explicar por qué, en los experimentos realizados con discos de pericarpio de tomate tratados con dióxido de carbono,

se detecta una cierta cantidad de enzima a tiempos mayores que su vida media. Sin embargo, el hecho que en tomates enteros el nivel de ACC permanezca constante a lo largo de períodos de tratamiento con atmósferas enriquecidas del orden de 9 días, sugiere que la inhibición ejercida por el dióxido de carbono es parcial puesto que resulta difícil pensar en tiempos de vida media de RNAs mensajeros del orden mencionado (9 días).

En base a lo expuesto consideramos que el dióxido de carbono inhibe parcialmente la síntesis "de novo" de la ACC sintetizada. Esto provoca una disminución de la cantidad de ACC transformada en etileno y por ende un retraso en los eventos de maduración regulados por esta hormona. Los resultados obtenidos en este trabajo no permiten discernir si el punto de acción del dióxido de carbono es a nivel de la etapa de transcripción y/o de traducción. Asimismo, es posible afirmar que el mecanismo de acción del dióxido de carbono, a los niveles usados, no provoca daños o modificaciones irreversibles en el tejido para tiempos de exposición cortos y que su presencia es indispensable para que se mantenga su efecto (Figuras 12, 14, 21, 24, 29 y 31).



RECEBIDO
MESAS
* 150
ENTRADA
LETRA N°

BIBLIOGRAFIA

- Acaster, M.A. and Kende, H. (1982) Properties and partial purification of ACC synthase. *Plant Physiol.* 72, 139-145.
- Adams, D.O. and Yang, S.F. (1977) Methionine metabolism in apple tissue: Implication of S-adenosylmethionine as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Plant Physiol.* 60, 892-896.
- Adams, D.O. and Yang, S.F. (1979) Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 170-174.
- Airan, J.W. and Barnabas, J. (1953) Organic and sugars in *Lycopersicon esculentum*. *J. Univ. Bombay* 22, 29-31.
- Amrhein, N.; Scheebeck, D.; Skorupka, H.; Tophof, S. and Stockigt, J. (1981) Identification of a major metabolite of the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in higher plants. *Naturwissenschaften* 68, 619-620.
- Apelbaum, A.; Burgoon, A.C.; Anderson, J.D.; Solomos, T. and Lieberman, M. (1981) Some characteristics of system converting 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene. *Plant Physiol.* 67, 80-84.
- Bailey, L.H. (1949) *Manual of cultivated plants*, 2nd. ed. Mac Millan, New York.
- Bendall, D.S.; Ranson, S.L.; Walker, D.A. (1960) Effects of CO₂ on the oxidation of succinate and reduced diphosphopyridine nucleotide by ricinus mitochondria. *Biochem. J.* 76, 221-228.

- Boller, T.; Herner, R.C. and Kende, H. (1979) Assay for an enzymatic formation of an ethylene precursor, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Planta* 145, 293-303.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Buefler, G. (1984) Ethylene-enhanced 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase activity in ripening apples. *Plant Physiol.* 75, 192-196.
- Buefler, G. (1986) Ethylene-promoted conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in peel of apple at various stages of fruit development. *Plant Physiol.* 80, 539-543.
- Buescher, R.W. (1975) Organic acid and sugar levels in tomato pericarps as influenced by storage at low temperature. *HortScience* 10, 158-159.
- Buescher, R.W. (1979) Influence of CO₂ on postharvest ripening and deterioration of tomatoes. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 104, 445-449.
- Burg, S.P. and Thimann, K.V. (1959) The physiology of ethylene formation in apples. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 45, 335-344.
- Burg, S.P. (1962) The physiology of ethylene formation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 13, 265-302.
- Burg, S.P. and Burg, E.A. (1965a) Gas exchange in fruit. *Plant Physiol.* 18, 870-884.
- Burg, S.P. and Burg, E.A. (1965b) Ethylene action and the ripening of fruit. *Science* 148, 1190-1196.

- Burg, S.P. and Burg, E.A. (1966) Fruit storage at subatmospheric pressure. *Science* 153, 314-315.
- Burg, S.P. (1973) Ethylene in plant growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 591-597.
- Cameron, A.C.; Fenton, C.A.L.; Yu, Y.B.; Adams, D.O. and Yang, S.F. (1979) Increased production of ethylene by plant tissue treated with 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *HortScience* 14, 178-180.
- Clutter, M.E. and Miller, E.V. (1961) Ascorbic acid and time of ripening of tomatoes. *Ecom. Bot.* 15, 218-222.
- Coursey, D.G. (1971) Biodeteriorative losses in tropical horticultural produce, en "Biodeterioration of Materials" (Walters, A.H. and Heuck-van der Plas, E.H., Eds.), Applied Science, Baking England, pp. 464-480.
- Craft, C.C. (1960) C₂H₄ production by tomato tissue. *Plant Physiol. Proc.* 35
- Cronin, D.A. and Smith, S. (1979) A simple and rapid procedure for analysis of reducing, total and individual sugars in potatoes. *Potato Res.* 22, 99-105.
- Chaves, A.R. and Tomas, J.O. (1984) Effect of a brief CO₂ exposure on ethylene production. *Plant Physiol.* 76, 88-91.
- Chaves, A.R. and Mudridge, A. (1986) Efecto de la temperatura sobre el desarrollo del color en tomate platense. 3er. Simposio sobre color en alimentos. 21 de agosto de 1986.
- Dalal, K.B.; Salunkhe, D.K.; Boe, A.A. and Olson, L.E. (1965) Certain physiological and biochemical changes in the developing tomato fruit (*Lycopersicon esculentum* Mill) *J. Food Sci.* 30, 504-508.

- Dalal, K.B.; Salunkhe, D.K. and Olson, L.E. (1966) Physiological and biochemical changes in greenhouse-grown tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) J. Food Sci. 31, 461-467.
- Davies, J.N. (1958) Rep. Glasshouse Crops Res. Inst. 1967, 67.
- Davies, J.N. (1966) Occurrence of sucrose in the fruit of some species of *Lycopersicon*. Nature 209, 640-645.
- De Laat, A.M.M. and Van Loon, L.C. (1982) The modulation of the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by light. Planta 153, 193-200.
- Dennis, C.; Browne, K.M. and Adamicki, F. (1979) Controlled atmosphere storage of tomatoes. Proc. Symp. on Quality of Vegetables. Acta Hort. 93, 75-80.
- Even-Chen, Z.; Mattoo, A.K. and Goren, R. (1982) Inhibition of ethylene biosynthesis by aminoethoxyvinylglycine and by polyamines shunt label from 3,4(¹⁴C)methionine into spermidine in aged orange peel discs. Plant Physiol. 69, 385-388.
- FAO (1981) FAO Production yearbook 34.
- Freeman, J.A. (1960) Ph.D. Thesis, Washington State University.
- Fryer, H.C.; Ascham, L.; Cardwell, A.B.; Frazier, J.C. and Willis, W.W. (1954) Effect of fruit cluster position on the ascorbic acid content of tomatoes — relation between storage of maturity and ascorbic acid content of tomatoes. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 64, 360-371.
- Georgiev, H.P. and Balzer, M.M. (1962) Analytical methods for determining the stages of ripening of tomatoes. Arch. Gartemb. 10, 398-408.

- Gepstein, S. and Thimann, K.V. (1980) The effect of light on the production of ethylene from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid by leaves. *Planta* 149, 196-199.
- Goodenough, P.W.; Tucker, G.A.; Grierson, D. and Thomas, T. (1982) Changes in colour, polygalacturonase, monosaccharides and organic acids, during storage of tomatoes. *Phytochemistry* 21, 281-284.
- Grierson, D.; Tucker, G.A. and Robertson, N.G. (1981) The regulation of genes expression during the ripening of tomato fruit. En "Quality in stored and processed vegetables and fruit" (P.W. Goodenough and R.K. Atkin, Ed.), London Academic Press.
- Guy, M. and Kende, H. (1984) Conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by isolated vacuoles of *Pisum sativum* L. *Planta* 160, 281-287.
- Hamner, K.C. and Maynard, L.A. (1942) Factors influencing the nutritive value of the tomato. Misc. Publs. US Dep. Agric. N° 502, pp. 23.
- Hansen, E. (1942) Quantitative study of ethylene production in relation to respiration of pears. *Botan. Gaz.* 103, 543-548.
- Hoffman, N.E. and Yang, S.F. (1980) Changes of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content in ripening fruit in relation to their ethylene production rates. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 105, 492-495.
- Hoffman, N.E. and Yang, S.F. (1982a) Enhancement of wound-induced ethylene synthesis in preclimateric cantaloupe. *Plant Physiol.* 69, 317-322.

- Hoffman, N.E.; Yang, S.F. and Mc Keon, T. (1982b) 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.
- Hoffman, N.E.; Yang, S.F.; Ichihara, A. and Sakamura, S. (1982c) Stereospecific conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene by plant tissues. Conversion of stereoisomers of 1-amino-2-ethylcyclopropanecarboxylic to 1-butene. *Plant Physiol.* 70, 195-199.
- Hoffman, N.E.; Fu, J.R. and Yang, S.F. (1983a) Identification and metabolism of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid in germinating peanut seeds. *Plant Physiol.* 71, 197-199.
- Hoffman, N.E.; Liu, Y. and Yang, S.F. (1983b) Changes in 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid content in wilted wheat leaves in relation to their ethylene production and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content. *Planta* 157, 518-523.
- Hyodo, H.; Tanaka, K. and Watanabe, K. (1983) Wound-induced ethylene production and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase in mesocarp tissue of winter squash fruit. *Plant Cell Physiol.* 24, 963-969.
- Hyodo, H.; Tanaka, K. and Yoshisaka, J. (1985) Inhibition of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase activity by polyamines, their compounds and metabolites of S-adenosyl-methionine. *Plant Cell Physiol.* 26, 161-167.

- Imaseki, H. and Watanabe, A. (1978) Inhibition of ethylene production by osmotic shock. Further evidence for membrane control of ethylene production. *Plant Cell Physiol.* 19, 345-348.
- INDEC (1987) Enero-Marzo, pg. 42-43.
- Iki, K.; Setiguchi, K.; Kurata, K.; Tada, T.; Nakagana, H.; Ogura, N. and Takehana, H. (1978) Immunological properties of β -fructofuranosidase from ripening tomato fruit. *Phytochemistry* 17, 311-312.
- Jeffery, D.; Smith, C.; Goodenough, P.; Prosser, I. and Grier-son, D. (1984) Ethylene-independent and ethylene dependent biochemical changes in ripening tomatoes. *Plant Physiol.* 74, 32-38.
- Kao, C.H. and Yang, S.F. (1982) Light inhibition of the conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in leaves is mediated through carbon dioxide. *Planta* 155, 261-266.
- Kaski, I.J.; Webster, G.L. and Kirch, E.R. (1944) Ascorbic acid content of tomatoes. *Fd. Res.* 9, 386-391.
- Kende, H. and Boller, T. (1981) Wound ethylene and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in ripening tomato fruit. *Planta* 151, 476-481.
- Knee, M. (1985) Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid during apples fruit development. *J. Exp. Bot.* 36, 670-678.
- Knee, M. (1987) Development of ethylene biosynthesis in pear fruit at -1°C . *J. Exp. Botany* 38, 1724-1733.
- Konze, J.R. and Kwiatkowski, G.M.K. (1981) Rapidly induce ethylene formation after wounding is controlled by the regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthesis. *Planta* 151, 327-330.

- Lambeth, V.N.; Fields, M.L. and Huecker, D.E. (1964) Sugar-acid ratio of selected tomato varieties. Bull. Mo. Agric. Exp. Stn. N°850, pp. 40.
- Lieberman, M. and Hardenburg, R.E. (1954) Effect of modified atmosphere on respiration and yellowing of Broccoli. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 63, 409-414.
- Lieberman, M. and Mapson, L.W. (1964) Genesis and biogenesis of ethylene. Nature 204, 343-345.
- Lieberman, M.; Kunishi, A.T.; Mapson, L.W. and Wardale, D.A. (1965) Ethylene production from methionine. Biochem. J. 97, 449-459.
- Lieberman, M.; Kunishi, A.T.; Mapson, L.W. and Wardale, D.A. (1966) Stimulation of ethylene production in apple tissue slices by methionine. Plant Physiol. 41, 376-382.
- Lieberman, M.; Kunishi, A.T. and Owens, L.D. (1974) Specific inhibitors of ethylene production as retardants the ripening process in fruit. En "Facteurs et regulation de la Maturation des Fruit". Colloques Int. CNRS N°238, Paris, pp. 161-170.
- Lieberman, M. (1979) Biosynthesis and action of ethylene. Ann. Rev. Plant Physiol. 30, 533-591.
- Liu, Y.; Hoffman, N.E. and Yang, S.F. (1985) Ethylene-promoted malonylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid participates in autoinhibition of ethylene synthesis in grapefruit flavedo discs. Planta 164, 565-568.
- 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.

- Lurssen, K.; Naumann, K. and Schroder, R. (1979) 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid -an intermediated of the ethylene biosynthesis in higher plants. *Z. Pflanzenphysiol.* 92, 285-294.
- Maclinn, W.A. and Fellers, C.R. (1938) Ascorbic acid in tomatoes and tomato products. *Bull. Mass. Agric. Exp. Stn.* N° 354, pp.20.
- Manning, K. and Maw, G.A. (1975) Distribution of acid invertase in the tomato plant. *Phytochemistry* 14, 1965-1969.
- Marcellin, P. and Chaves, A.R. (1982) Effets d'un traitement intermitten en atmospere fortement enrichie en gaz carbonique sur la maturation de tomates vertes a 20° et 12°C. *Academie D' Agriculture de France. Seance* 13, 112-123.
- Mendoza, G. (1977) Study of postharvest losses of salad tomatoes in the caribbean in the Dominican Republic. En "Report of the Seminar on the reduction of postharvest food losses in the caribbean and Central American" August 8-11, 1977 - Santo Domingo, República Dominicana.
- Murr, D.P. and Yang, S.F. (1975) Conversion of 5'-methylthioadenosine to methionine by apple tissue. *Phytochemistry* 14, 1291-1292.
- Nakagana, H.; Iki, K.; Hirata, M.; Ishigami, S. and Ogura, N. (1980) Inactive β -fructofuranosidase molecules in senescent tomato fruit. *Phytochemistry* 19, 195-197.
- Nakagana, H.; Ishigami, S.; Sekiguchi, K.; Kurata, K. and Ogura, N. (1981) Selective degradation of altered tomato β -fructofuranosidase molecules by neutral protease. *Phytochemistry* 20, 1229-1230.

- Odawara, S.; Watanabe, A. and Imaseki, H. (1977) Involvement of cellular membrane in regulation of ethylene production. *Plant Cell Physiol.* 18, 569-575.
- Olliver, M. (1967) En "The vitamins" (Sebrel, W.H. and Harris, R.S., Eds.) Academic Press, New York, pp. 359.
- Onesirosan, P.T. and Fatunla, T. (1976) Fungal fruit rots of tomatoes in southern Nigeria. *J. Hortic. Sci.* 51, 519-526.
- Parson, C.S.; Anderson, R.E. and Penney, R.W. (1970) Storage of mature green tomatoes in controlled atmosphere. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 95, 791-797.
- Preger, R. and Gepstein, S. (1984) Carbon dioxide-independent and -dependent components of light inhibition of the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene in oat leaves. *Physiol. Plant.* 60, 187-190.
- Rando, R.R. (1974) Chemistry and enzymology of k_{cat} inhibitors. *Science* 185, 320-324.
- Ranson, S.L.; Walker, D.A. and Clarke, I.D. (1960) Effect of carbon dioxide on mitochondrial enzymes from Ricinus. *Biochem. J.* 76, 216-221.
- Riov, J. and Yang, S.F. (1982) Effects of exogenous ethylene production in citrus leaf tissue. *Plan Physiol.* 70, 136-141.
- Roberts, D.R.; Walker, M.A.; Thompson, J.E. and Dumbroff, E.B. (1983) The effect of inhibitors of polyamine and ethylene biosynthesis on senescence ethylene production and polyamine levels in cut carnations. *Plant Cell Physiol.* 25, 315-322.
- Rosa, J.T. (1925) Ripening of tomatoes. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* 22, 315-322.

- Rosa, J.T. (1926) Selected of tomatoes. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 23, 233-237.
- Salunkhe, D.K. and Wu, M.T. (1973) Effect of low oxygen atmosphere storage on ripening and associated biochemical changes of tomato fruits. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 98, 12-16.
- Sando, C.E. (1920) Process of ripening in tomato considered species from com. stand point. Bull. US Dept. Agric. N°859, pp. 44.
- Saywell, L.G. and Cruess, W.V. (1932) Components of canning tomatoes. Bull. Calif. Agric. Exp. Stn. N°545, pp. 61-
- Shipway, M.R. and Branmlage, M.J. (1973) Effect of carbon dioxide on activity of apple mitochondria. Plan Physiol. 51, 1095-1098.
- Simandle, P.A.; Brogdon, J.L.; Sweeney, J.P.; Mobley, E.A. and Davies, D.W. (1966) Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 89, 532
- Steppe, H.M. (1976) Postharvest losses of agricultural products, Rep. W.P./225/76, serial N°240, UNDP, Tehran, Iran.
- Su, L.Y.; Mc Keon, T.; Grierson, D.; Cantwell, M. and Yang S.F. (1984) Development of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase and polygalacturonase activities during the maturation and ripening of tomato fruit. HortScience 19, 576-578.
- Umbreit, W.W.; Burris, R.H. and Stauffer, J.F. (1949) Manometric techniques and tissue metabolism. Capítulo 3, Burges Publ. Co. Minneapolis, USA.
- Wang, C.Y. (1977) Effect of CO₂ treatment on storage and shelf life of sweet peppers. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 102, 808-811.
- Wang, C.Y. and Mellenthin, W.H. (1977) Effect of aminoethoxy analog of rhizobitoxine on ripening of pears. Plant Physiol. 59, 546-549.

- Wang, C.Y. and Adams, D.O. (1982) Chilling-induced ethylene production in cucumbers (*Cucumis sativus* L.) *Plant Physiol.* 69, 424-427.
- Williams, K.T. and Bevenue, A. (1954) Some carbohydrate components of tomato. *J. Agric. Fd. Chem.* 2, 472-474.
- Wills, R.B.H.; Scott, K.J. and Wimalasiri, P. (1979) Short pre-storage exposures to high carbon dioxide or low oxygen atmospheres for the storage of some vegetables. *HortScience* 14, 528-532.
- Winsor, G.W.; Davies, J.N. and Massey, D.M. (1962a) Composition of tomato fruit. III. Juices from whole fruit and locules at different stages of ripeness. *J. Sci. Fd. Agric.* 13, 108-115.
- Winsor, G.W.; Davies, J.N. and Massey, D.M. (1962b) Composition of tomato fruit. IV. Changes in some constituents of the fruit walls during ripening. *J. Sci. Fd. Agric.* 13, 141-145.
- Winsor, G.W. (1966) *Scient. Hort.* 28, 27
- Wokes, F. and Organ, J.G. (1943) Oxidizing enzymes and vitamin C in tomatoes. *Biochem. J.* 37, 259-265.
- Wu, M.T.; Jadhav, S.J. and Salunkhe, D.K. (1972) Effect of sub atmospheric pressure storage on ripening of tomato fruit. *J. Food Sci.* 37, 952-958.
- Yoshii, H. and Imaseki, H. (1981) Biosynthesis of auxin-induced ethylene, effect of indole-3-acetic acid, benzyladenine and abscisic acid on endogenous levels of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and ACC synthase. *Plant Cell Physiol.* 22, 269-279.

- Yu, Y.B.; Adams, D.D. and Yang, S.F. (1979) 1-aminocyclopropane-1-carboxylic synthase, a key enzyme in ethylene biosynthesis. Arch. Biochem. Biophys. 198, 280-286.