

REVIEW

Rekayasa Genetika untuk Mengatasi Masalah-masalah Pascapanen

Genetic Engineering to Control Postharvest Problems

Darda Efendi¹⁾

Diterima 2 Februari 2005 / Disetujui 6 Juli 2005

ABSTRACT

Flavr Savr tomato is a transgenic tomato which is transformed using Polyglacturonase gene in antisense orientation. This is the first whole food product of biotechnology that reaches the market, but unfortunately it does not succeed. Ethylene is thought to act as a natural triggering mechanism for fruit ripening and senescence. Lowering the production of endogenous ethylene from fruit should delay fruit ripening and senescence. Several ways to control ethylene biosynthesis are: inactivation of the gene encoding ACC synthase, ACC oxidase, metabolism of SAM so that ACC is not produced, or metabolism of ACC before it can be converted to ethylene. Effect of ethylene can also be blocked by blocking the perception of ethylene by specific tissues.

Key words: Ethylene, ACC synthase, ACC oxidase, SAM hydrolase, genetic transformation.

PENDAHULUAN

Buah-buahan, sayur-sayuran dan bunga potong mempunyai umur simpan pascapanen yang pendek. Proses pemasakan pada buah-buahan dan senesen pada sayuran dan bunga potong berperan besar terhadap kehilangan hasil yang tinggi. Di negara maju kehilangan pascapanen dapat mencapai 5 - 25%, sedangkan di negara berkembang dapat mencapai 50% (Kader *et al.*, 1985), atau bahkan bisa mencapai 100% (Salunkhe dan Desai, 1984; Kays, 1997). Sampai sekarang, tingkat kehilangan pascapanen belum menurun secara signifikan. Kehilangan ini akan menyebabkan meruginya petani dan pedagang, berkurangnya ketersediaan pangan, rendahnya kualitas komoditi yang diterima konsumen, dan secara umum dapat disebut sebagai pemborosan sumberdaya alam.

Berbagai metoda untuk perpanjangan masa simpan dan pencegahan senesen telah diteliti dan dimanfaatkan secara komersial termasuk penyimpanan pada atmosfir terkendali, atmosfir termodifikasi, penyimpanan pada suhu rendah, penggunaan berbagai bahan kimia dan penggunaan radiasi. Tetapi implementasi dari teknologi ini kadang-kadang sangat sulit karena ketiadaan prasarana yang memadai. Diperlukan teknologi lain yang hasilnya bisa diterapkan tanpa memerlukan banyak sarana dan masukan lain pada tingkat petani.

Bioteknologi, salah satunya adalah rekayasa genetika, merupakan alat yang sangat potensial untuk pemuliaan tanaman. Dua keuntungan utamanya adalah 1) dapat menghilangkan barrier antar spesies sehingga transgen dapat berasal dari spesies bahkan kingdom yang berbeda, 2) dalam banyak kasus, produk bioteknologi adalah produk akhir yang tidak memerlukan teknologi lain untuk mendukungnya (Botella, 2000).

Sejauh ini sebagian besar pendekatan rekayasa genetika untuk masalah-masalah pascapanen difokuskan pada penggunaan gen-gen yang mengatur pelunakan buah (membran dan dinding sel) dan kecepatan pemasakan (produksi atau persepsi etilen) (Botella, 2000). Pendekatan yang digunakan adalah penurunan aktifitas gen dengan 'gene silencing' melalui teknik 'antisense' dan 'gene co-suppression', introduksi transgen untuk mengubah arah metabolisme etilen atau mengubah sensitifitas jaringan terhadap etilen.

PEMBAHASAN

Penundaan Pelunakan Buah

Pelunakan buah banyak dipelajari karena sangat berperan dalam kehilangan pasca panen selama penanganan dan transpor buah-buahan. Kekerasan buah

¹⁾ Staf Pengajar Departemen Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian IPB
Jl. Meranti Kampus IPB Darmaga, Bogor . Telp./Fax (0251) 629353
Email: dardaefendi@yahoo.com

merupakan fungsi dari dinding sel yang merupakan komponen struktural yang mengelilingi setiap sel tanaman. Selama pematangan buah, berbagai enzim yang terlibat dalam degradasi dinding sel disintesis dalam buah, diantaranya selulase untuk memecah selulosa, poligalakturonase (PG) dan pektin metilesterase (PME) yang mendegradasi pektin.

Salah satu gen yang mengontrol pelunakan yang paling banyak dipelajari adalah gen yang mengkode enzim poligalakturonase (PG), yang mengkatalis hidrolisis rantai asam poligalakturonat pada dinding sel (Grierson *et al.*, 1986). Penurunan ekspresi gen PG ini diharapkan akan memperlambat proses pelunakan buah. Sheehy *et al.* (1988) telah berhasil menurunkan level gen pengkode PG dan aktifitas enzim PG dengan teknik sense dan antisense, dan merupakan contoh sukses pertama penggunaan teknologi antisense. Perusahaan Calgene dari USA menggunakan teknologi antisen ini untuk menghasilkan tomat transgenik yang dinamai 'Flavr Savr'. Tomat transgenik rendah PG ini menandai era baru dalam bioteknologi sebagai produk rekayasa genetika pertama yang dipasarkan. Tomat Flavr Savr dipasarkan oleh Calgene di USA tahun 1994 dengan nama dagang "MacGregor's" (Webber, 1994).

Pada buah tomat transgenik ini terjadi penurunan tingkat mRNA poligalakturonase 90- 94%, sedangkan aktivitas enzim poligalakturonase menurun 69 – 93% (Sheehy *et al.*, 1988; Smith *et al.*, 1988). Tomat transgenik yang membawa gen antisense PG ini tidak menunjukkan perubahan kecepatan pelunakan (Smith *et al.*, 1988), walaupun demikian tomat ini lebih tahan pecah, dan lebih sedikit terjadi kerusakan selama proses pascapanen dibanding tomat bukan-transgenik (Schuch *et al.*, 1991).

Karena merupakan produk transgenik komersial pertama, maka tomat Flavr Savr ini juga merupakan produk yang paling banyak dipelajari. Ternyata tomat ini gagal di pasar karena berbagai hal dan ditarik dari peredaran kurang dari setahun sejak dari pelepasannya. Hasil-hasil penelitian menunjukkan bahwa walaupun PG memainkan peranan yang penting dalam perubahan tekstur buah selama pemasakan, tetapi bukanlah faktor primer dalam mengontrol pelunakan buah (Botella, 2000).

Selama proses pemasakan buah, tiap spesies yang berbeda ternyata mempunyai aktifitas enzim-enzim dinding sel yang berbeda, karenanya tidak ada satu strategi umum yang berlaku untuk semua komoditi dalam hal mengontrol pelunakan buah (Botella, 2000). Untuk itu perlu dicari alternatif lain yang berlaku lebih umum pada rentang komoditi yang luas. Etilen adalah hormon tumbuhan pengendali utama pemasakan buah

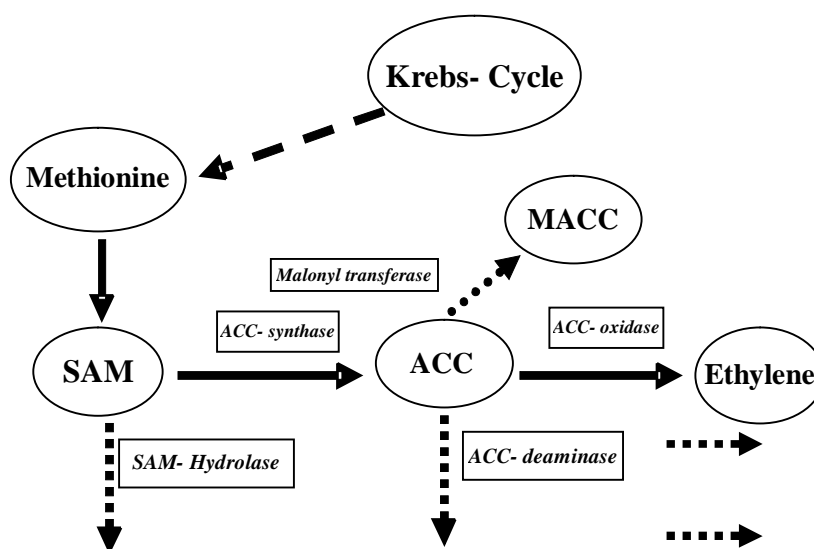
dan senesen (*senescence*) pada sayur-sayuran dan bunga yang paling potensial dan banyak diteliti.

Penghambatan Biosintesis Etilen

Etilen adalah zat yang secara alami berperan sangat penting pada proses fisiologi pascapanen, baik yang bersifat menguntungkan maupun yang merugikan, diantaranya mempercepat senesen dan menurunkan umur simpan, memicu respirasi klimakterik, mempercepat dan menyeragamkan pemasakan (Kader, 1985; Kays, 1997). Etilen mengatur pemasakan buah dengan mengkoordinasikan ekspresi gen-gen yang bertanggung jawab dalam berbagai proses, termasuk peningkatan laju respirasi, autokatalitik produksi etilen, degradasi klorofil, sintesis karotenoid, konversi pati menjadi gula, dan peningkatan aktivitas enzim-enzim pemecah dinding sel (Gray *et al.*, 1992).

Berbagai usaha telah dilakukan untuk mengurangi efek etilen secara kimiawi pada proses pemasakan dan senesen ini termasuk aplikasi *aminoethoxyvinylglycine* (AVG) sebagai penghambat sintesis etilen; ion perak (Ag^+), *2,5-norbornadiene* (NBD), *diazocyclopentadiene* (DACP) dan *1-methylcyclopropene* (1-MCP) sebagai penghambat aksi etilen dengan menonaktifkan penerima (*receptor*) etilen (Sisler dan Serek, 1999a). Perlakuan lingkungan penyimpanan dengan atmosfer terkendali dan penyimpanan pada suhu rendah digunakan karena dapat menunda kemasakan dan menghambat ekspresi mRNA untuk enzim-enzim selulase, poligalakturonase, dan enzim-enzim dalam sintesis etilen yang sangat berhubungan erat dengan kehidupan buah pasca panen (Dopico *et al.*, 1993). Penyimpanan pada suhu rendah masih merupakan masalah pada komoditi tropika karena rentan terhadap 'chilling injury' (Morton, 1987; Kays, 1997).

Skema biosintesis etilen dapat dilihat pada Gambar 1. Selama biosintesis etilen, ATP-metionin-S-adenosiltransferase mengubah metionin menjadi SAM (S-adenosilmetionin). ACC sintase (S-adenosil-L-metionin metiltioadenosine-liase) mengubah SAM menjadi ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) (Alexander dan Grierson, 2002; Tarun *et al.*, 1998). ACC kemudian dikonversi menjadi etilen oleh ACC oksidase (Alexander dan Grierson, 2003; Kende, 1989; McKeon *et al.*, 1995; Kende dan Zeevaart, 1997). Biosintesis etilen dengan demikian dapat diturunkan dengan memblok atau menonaktifkan gen pengkode metionin-S-adenosyltransferase, ACC sintase, ACC oksidase, atau mengintroduksi gen pengkode SAM hidrolase atau ACC deaminase (Gambar 1).



Gambar 1. Skema biosintesis etilen dan beberapa gen yang bertanggung jawab dalam reaksi. SAM adalah S-adenosylmetionine; ACC = 1-ami-nocyclopropane-1-carboxylic acid; MACC = N-Malonyl-ACC. Enzim dengan panah = Tidak secara alamiah ada pada tanaman.

Menonaktifkan Gen Pengkode ACC Sintase.

ACC sintase telah diklon oleh berbagai grup peneliti (Sato dan Theologis, 1989; Nakajima *et al.*, 1990; Van der Straeten *et al.*, 1990; Itai *et al.*, 1999). Oeller *et al.* (1991) telah menggunakan antisense RNA dari ACC sintase untuk menghambat pemasakan buah tomat. Klee *et al.* (1991), dan Kende dan Zeevaart (1997) menyatakan bahwa tomat dengan transformasi dengan antisense ACC sintase menurunkan sintesis etilennya hingga 99 persen (hanya memproduksi etilen 1 persen dibanding tomat bukan-trnsgenik). Walaupun lebih lambat masak tetapi tanaman transgenik ini dapat masak dengan tekstur, warna, aroma dan kekerasan seperti tanaman normal jika diberi perlakuan etilen eksogen (Theologis *et al.*, 1992).

Menonaktifkan Gen Pengkode ACC Oksidase

ACC oksidase yang dulu dikenal sebagai enzim pembentuk-etilen telah diklon dari tomat (Hamilton *et al.*, 1991), pear (Castellano dan Vioque, 2000), dan pepaya (Chen *et al.*, 2003). Pengintegrasian gen pengkode ACC oksidase dengan orientasi antisense dari tomat menurunkan biosintesis etilen sampai 87%-90% (Hamilton *et al.*, 1990; Picton *et al.* 1993), hal yang serupa juga terjadi pada melon (Amor *et al.*, 1998; Flores *et al.*, 2002).

Klee (2003) mencatat bahwa penghambatan biosintesis etilen secara menyeluruh pada semua tingkat perkembangan tanaman dengan menggunakan antisense ACC sintase atau ACC oksidase mengakibatkan pengaruh negatif pada perkembangan tanaman. Di antara efek negatif tersebut adalah pencegahan

terbentuknya akar adventif (Clark *et al.*, 1999) dan meningkatnya kerentanan tanaman transgenik ini terhadap serangan patogen (Knoester *et al.*, 1998). Lund *et al.* (1998), dipihak lain, melaporkan bahwa mutan tomat yang tidak sempurna responnya terhadap etilen memperlihatkan penurunan kerentanannya terhadap patogen. Untuk menghindari efek negatif dari ekspresi transgen ini, maka transgen harus terekspresi hanya pada waktu tertentu dan pada tingkat perkembangan tanaman tertentu dengan menggunakan promoter khusus (Klee, 2003).

Metabolisme ACC sebelum Diubah Menjadi Etilen

Sebuah gen dari bakteri yang mengkodekan ACC deaminase telah diintroduksi pada genom tomat (Klee *et al.*, 1991; Klee, 1993) menyebabkan biosintesis etilen berkurang 90-97% dan menyebabkan pemasakannya tertunda dan tetap keras 6 minggu lebih lama dari buah tanaman kontrol. Klee *et al.* (1991) menyatakan bahwa degradasi dari ACC tidak mempengaruhi kemampuan buah untuk responsif terhadap etilen, dicirikan dengan buah dapat masak normal jika diekspos pada etilen eksogen. Gen pengkode ACC deaminase ini diklon dan dipatenkan oleh perusahaan Monsanto.

Integrasi konstruksi antisen dari gen ACC oksidase (*CMe-ACO1*) pada melon menyebabkan penurunan biosintesis etilen sampai 99% dan menghambat pemasakan (Ayub *et al.*, 1996; Guis *et al.*, 1999). Buah dapat dipertahankan pada tanaman induknya untuk mengakumulasi fotosintat sampai 48 hari setelah penyerbukan tanpa menjadi terlalu masak dan tanpa perubahan kekerasan, sedangkan tanaman kontrol harus

dipanen pada 38 hari setelah penyerbukan (Guis *et al.*, 1999). Perlakuan etilen eksogen dapat digunakan untuk mempercepat kemasakan tanaman transgenik ini (Ayub *et al.*, 1996; Guis *et al.*, 1999).

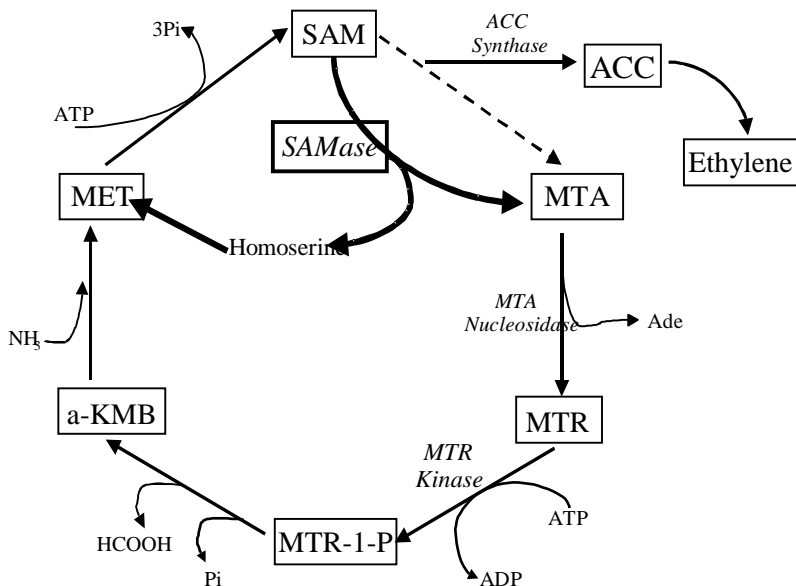
Metabolisme SAM Menjadi Produk Lain

Agritope, sebuah perusahaan bioteknologi, menggunakan SAM hidrolase (SAMase, samK) untuk mengubah SAM menjadi senyawa tak berbahaya bagi tanaman, sehingga SAM tidak tersedia untuk dikonversi menjadi ACC (Good *et al.*, 1994; Kramer *et al.*, 1997) (Gambar 2). Teknik ini dikenal sebagai strategi ‘metabolic shunt’. SAM hidrolase ini berasal dari bacteriophage T3 dan mengkode S-adenosil-metionin hidrolase (Hughes *et al.*, 1987; Bestwick *et al.*, 1991) tetapi telah diubah kodon awalnya untuk mengkode SAM hidrolase yang fungsional pada tanaman (Good *et al.*, 1994; Kramer *et al.*, 1997).

SAM tidak hanya sebagai prekursor dari biosintesis etilen tetapi juga memainkan peranan sentral dalam berbagai reaksi biosintesis termasuk biosintesis poliamin, biosintesis fosfolipid dan metilasi DNA (Good *et al.*, 1994; Ravel *et al.*, 1998). Ekspresi dari SAM-ase yang dikendalikan oleh promoter konstitutif

pada tomat transgenik pada tingkat yang dapat mengubah proses pemasakan buah sudah bersifat merugikan terhadap pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Good *et al.*, 1994). Dalam rangka mengekspresikan *samK* gen hanya pada proses pematangan buah, perlu dilakukan pengendalian ekspresi dengan menggunakan promoter yang aktif khusus pada jaringan buah tomat (Good *et al.*, 1994; Kramer *et al.*, 1997), dan melon (Clendennen *et al.*, 1999) menjelang fase klimakterik.

Terekspresinya SAM hidrolase tidak mengubah ukuran dan bobot buah, kekerasan buah, warna internal dan eksternal, dan total padatan terlarut. Penurunan biosintesis etilen juga terjadi pada turunan tanaman transgenik dan juga pada hibrida tanaman transgenik dengan tanaman normal. Komposisi nilai gizi tomat ini vitamin, kandungan protein total, asam amino dan asam total, tidak dipengaruhi ekspresi transgen *sam-K* (Kramer *et al.*, 1997). Good *et al.* (1994) melaporkan bahwa penurunan sintesis etilen pada tomat transgenik yang membawa gen *sam-K* adalah kira-kira 80%. Buah tomat transgenik ini memerlukan waktu dua kali lebih banyak untuk mencapai kemasakan optimum dibanding buah tanaman control.



Gambar 2. Gen SAMase (SAM hydrolase) dan siklus metionin pada tanaman (Good *et al.*, 1994). Keterangan: SAM, S-adenosylmethionin; SAMase, SAM hydrolase; MTA, 5'-methylthioadenosine; MTR, 5-methylribose; KMB, -ketomethylthiobutyric acid; MET, metionin; ACC,1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid.

Pengubahan Sensitifitas Jaringan terhadap Etilen

Selama pemasakan, buah tidak hanya mensintesis lebih banyak etilen tetapi juga lebih sensitif terhadap etilen (Blakenship and Sisler, 1993; Theologies, 1994), sehingga pendekatan lain untuk memanipulasi

pemasakan dan senesen adalah dengan penghambatan persepsi terhadap etilen. Aplikasinya adalah dengan mengekspresikan gen-gen yang menyebabkan jaringan tertentu tidak sensitif terhadap etilen (Sisler dan Serek, 1997; 1999b). Proses kerja etilen secara sederhana adalah sebagai berikut:

Etilen → Terikat ke Reseptor → Sinyal diteruskan ke inti sel → Perubahan ekspresi gen.

Protein-protein yang berfungsi sebagai penerima (reseptor) etilen telah diklon. Juga telah ditemukan mutan dominan pada arabidopsis (*etr-1*) yang tidak sensitif terhadap etilen karena rusaknya reseptor etilen sehingga tidak terjadi penerusan sinyal ke inti sel (Wilkinson *et al.*, 1997; Bleecker *et al.*, 1999; Botella, 2000; Alexander dan Grierson, 2002). Sampai saat ini telah diidentifikasi adanya 5 gen dari famili ETR ini yaitu *ETR1*, *ERS 1*, *ETR2*, *EIN4* dan *ERS2*. Mutasi dari salah satu anggota famili gen ini menyebabkan sifat dominan insensitif terhadap etilen (Bleecker *et al.*, 1999). Pada tomat telah ditemukan mutan semidominan yang tidak responsif terhadap etilen, disebut 'Never ripe' (*Nr*), yang menyebabkan buah gagal mencapai kematangan (Lanahan *et al.*, 1994; Yen *et al.*, 1995).

Tanaman tomat dan petunia transgenik yang ditransformasi dengan *etr-1* ini tidak sensitif terhadap etilen sehingga tidak terpengaruh oleh etilen. Akibatnya adalah buah tidak mampu masak walaupun diekspos ke etilen, bunga juga tertunda senesen dan gugurnya (Wilkinson *et al.*, 1997). Transgenik petunia yang mengekspresikan gen *CaMV35S-etr-1* secara konstitutif memperlihatkan gejala tertundanya senesen, penurunan fruit-set, penundaan pemasakan buah dan penurunan pembentukan akar adventif (Clark *et al.*, 1999). Pendekatan seperti ini tentu tidak sesuai untuk buah-buahan yang memang diharapkan untuk mencapai kematangan pada waktu yang ditentukan, dan bukannya buah yang tidak mampu masak sama sekali. Dipihak lain, pendekatan ini akan sangat bermanfaat untuk pengembangan tanaman hias, bunga potong dan sayur-sayuran yang dapat ditunda proses senesennya. Klee (2003) menyatakan bahwa tanaman tomat dan petunia yang tidak sensitif terhadap etilen ini tidak bisa diperbanyak dengan setek batang, sesuatu yang merugikan pada tanaman yang diperbanyak secara vegetatif. Untuk itu, seperti juga pada kasus penekanan biosintesis etilen, diperlukan konstruksi gen yang terekspresi hanya pada jaringan tertentu pada waktu yang spesifik dengan menggunakan promoter khusus (Clark *et al.*, 1999; Klee, 2003).

KESIMPULAN

Berbagai keberhasilan mengendalikan enzim yang mengatur degradasi dinding dan membran sel, serta biosintesis dan sensitifitas terhadap etilen tidak dengan sendirinya dapat memecahkan semua masalah-masalah pascapanen. Hal ini berhubungan dengan kualitas internal buah yang tidak dapat dipertahankan selama kualitas eksternal karena buah terus menggunakan gula dan asam-asam sebagai substrat respirasi. Pengendalian metabolisme untuk mempertahankan kualitas internal buah perlu diteliti dan dikembangkan lebih jauh baik

secara kimiawi, modifikasi lingkungan maupun dengan pemanfaatan teknologi rekayasa genetika.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, L., D. Grierson. 2002. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *J. Exp. Bot.* 53 (377): 2039-2055.
- Amor, M.B., M. Guis, A. Latache, M. Bouzayen, J.C. Pech, J.P. Roustan. 1998. Expression of an antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene stimulates shoot regeneration in Cucumis melo. *Plant Cell Rep.* 17:586-589.
- Ayub, R., M. Guiz, M. B. Amor, L. Gillot, J.P. Roustan, A. Latche, M. Bouzayen, J.C. Pech. 1996. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. *Nature Biotech.* 14: 862-866.
- Blankenship S.M., C. Sisler. 1993. Ethylene binding site affinity in ripening apples. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 118: 609-612.
- Bestwick, R.K., W. Wagoner, J.A. Kellogg, W. Pengelly, L. Brown, A. Ferro. 1991. Reduced ethylene biosynthesis in transgenic tobacco plants expressing S-adenosylmethionine hydrolase. *J. Cell Biochem.* 15A:110.
- Bleecker, A.B., A.E. Hall, F.I. Rodriguez, J.J. Esch, B. Binder. 1999. The ethylene signal transduction pathway. *In: Kanelis, A.K., C. Chang, H. Klee, A.B. Bleecker, J.C. Pech, D. Grierson (eds.). Biology dan biotechnology of the plant hormone ethylene II.* Kluwer Acad. Pub. Dordrecht. p. 51-57.
- Botella, J.M. 2000. Biotechnological approach to control postharvest problems. *In: Johnson, G.I., L. V. To, N. D. Duc and M.C. Webb (eds.). Quality assurance in agricultural produce.* ACIAR Proceeding 100. p. 175-183.
- Castellano, J. M., B. Vioque. 2000. Biochemical features and inhibitors of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase isolated from pear fruit. *Eur. Food Res. Technol.* 210: 397-401.

- Chen, Y-T., Y-R. Lee, C-Y. Yang, Y-T. Wang, S-F. Yang, J-F. Shaw. 2003. A novel papaya ACC oxidase gene (CP-ACO2) associated with late stage fruit ripening and leaf senescence. *Plant Sci.* 164: 531-540.
- Clark, D.G., E.K. Gubrium, J.E. Barrett, T.A. Nell, H.J. Klee. 1999. Root formation in ethylene-insensitive plants. *Plant Physiol.* 121:53-59.
- Clark, D.G., H.J. Klee, J.E. Barret, T.A. Nell. 1999. Horticultural performance of ethylene insensitive petunias. *In: Kanelis, A.K., C. Chang, H. Klee, A.B. Bleeker, J.C. Pech, dan D. Gierson (eds.). Biology dan biotechnology of the plant hormone ethylene II.* Kluwer Acad. Pub. Dordrecht. p. 357-363.
- Clendennen, S.K., J.A. Kellogg, K.A. Wolff, W. Matsumura, S. Peters, J.E. Vanwinkle, B. Copes, M. Pieper, M.G. Kramer. 1999. Genetic engineering of cantaloupe to reduce ethylene biosynthesis dan control ripening. *In: Kanelis, A.K., C. Chang, H. Klee, A.B. Bleeker, J.C. Pech, dan D. Gierson (eds.). Biology dan biotechnology of the plant hormone ethylene II.* Kluwer Acad. Pub. Dordrecht. p. 371-379.
- Dopico, B., A.L. Lowe, I.D. Wilson, C. Merodio, D. Grierson. 1993. Cloning dan characterization of avocado fruit mRNAs dan their expression during ripening dan low-temperature storage. *Plant Mol. Biol.* 21:437-449.
- Evans, D. A. 2003. Genetic engineering of flavor and shelf life in fruits and vegetables. http://www.agribiotechnet.com/nabc/nabc8/0763_8.pdf. [Diakses Agustus, 2003].
- Flores, F., F.E. Yahyaoui, G. D. Billerbeck, F. Romajaro, A. Latche, M. Bouzayen, J-C. Pech, C. Ambid. 2002. Role of ethylene in the biosynthetic pathway of oliphatic ester aroma volatiles in Charentais Cantaloupe Melon. *J. Exp. Bot.* 53 (387): 201-206.
- Good, X., J.A. Kellogg, W. Wagoner, D. Langhoff, W. Matsumura, R.K. Bestwick. 1994. Reduced ethylene synthesis by transgenic tomatoes expressing S-adenosylmethionine hydrolase. *Plant Mol. Biol.* 26:781-790.
- Gray, J., S. Picton, J. Shabbeer, W. Schuch, D. Grierson. 1992. Molecular biology of fruit ripening dan its manipulation with ethylene gene. *Plant Mol. Biol.* 19:69-87.
- Grierson, D., M.J. Maunders, A. Slater, J. Ray, C.R. Bird, W. Schuch, M.J. Holdworth, G.A. Tucker, J.E Knapp. 1986. Gene expression during tomato ripening. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, B314, 399-410.
- Guis, M., T. Bouquin, H. Zegzouti, R. Ayub, M. Ben Amor, E. Lasserre, R. Botondi, J. Raynal, A. Latche, M. Bouzayen, C. Balague, J. C. Pech. 1999. Differential expression of ACC oxidase genes in melon and physiological characterization of fruit expressing and antisense ACC oxidase gene. *In: Kanelis, A.K., C. Chang, H. Klee, A.B. Bleeker, J.C. Pech, D. Gierson (eds.). Biology dan biotechnology of the plant hormone ethylene II.* Kluwer Acad. Pub. Dordrecht. p. 327-337.
- Hamilton, A.J., G.W. Lycett, D. Grierson. 1990. Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature* 346:284-287.
- Hamilton, A.J., M. Bouzayen, D. Grierson. 1991. Identification of tomato gene for the ethylene-forming enzyme by expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:7434-7437.
- Hughes, J.A., L.R. Brown, A.J. Ferro. 1987. Nucleotide sequence dan analysis of the coliphage T3 S-adenosylmethionine hydrolase gene dan its surrounding ribonuclease III processing sites. *Nucl. Acid Res.* 15:717-729.
- Itai, A., T. Kawata, K. Tanabe, F. Tamura, M. Uchiyama, M. Tomomitsu, N. Shiraiwa. 1999. Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase genes controlling the ethylene level of ripening fruit in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Mol. Gen. Genet.* 261: 42-49.
- Kader, A.A., R.F. Kasmire, F.G. Mitchell, M.s. Reid, N.F. Sommer, J.F. Thomson. 1985. Postharvest technology of horticultural crops. University of California. 192 pp.
- Kays, S.J. 1997. Postharvest physiology of perishable plant products. Exon Press. Athens. 532 pp.
- Kende, H. 1989. Enzymes of ethylene biosynthesis. *Plant Physiol.* 91:1-4.
- Kende, H., J.A.D. Zeevaart. 1997. The five "classical" plant hormones. *Plant Cell.* 9:1197-1210.

- Klee, H.J. 1993. Ripening physiology of fruit from transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants with reduced ethylene synthesis. *Plant Physiol.* 102:911-916.
- Klee, H.J. 2003. Application of ethylene technology to climacteric fruits: a progress report. *In: Vasil, I.K.* (ed.). *Plant Biotechnology 2002 dan Beyond.* Kluwer Acad. Pub. Netherlands. p. 297-303.
- Klee, H.J., M. B. Hayford, K. A. Kretzmer, G. F. Barry, G. M. Kishore. 1991. Control of ethylene synthesis by expression of bacterial enzyme in transgenic tomato. *Plant Cell* 3:1187-1193.
- Knoester, M., L.C. van Loon, J. van den Heuvel, J. Hennig, J.F. Bol, H.J.M. Linthorst. 1998. Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:1933-1937.
- Kramer, M.G., J. Kellogg, W. Wagoner, W. Matsumura, X. Good, S. Peters, G. Clough, R. K. Bestwick. 1997. Reduced ethylene synthesis dan ripening control in tomatoes expressing S-adenosyl-methionine hydrolase. *In: Kanelis, A.K., C. Chang, H. Kende dan D. Grierson* (eds.). *Biology dan biotechnology of the plant hormone ethylene.* Kluwer Acad. Pub. Dordrecht. p. 307-319.
- Lanahan, M.B., Yen H.C., J.J. Giovannoni, H.J. Klee. 1994. The Never ripe mutation blocks ethylene perception in tomato. *Plant Cell* 6: 521-530.
- Lund, S.T., R.E. Stall, H.J. Klee. 1998. Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. *Plant Cell.* 10:371-382.
- McKeon, T. A., J. C. F-Maculet, S-F. Yang. 1995. Biosynthesis and metabolism of ethylene. *In: Davies, P.J.* (ed.). *Plant Hormones; Physiology, Biochemistry and Molecular Biology.* 2nd ed. Kluwer Acad. Pub. Dordrecht. p. 118-139.
- McGarvey, D.J., R. Sirevag, R.E. Christofferson. 1992. Ripening-related gene from avocado fruit. *Plant Physiol.* 8:554-559.
- Morton, J.F. 1987. *Fruits of warm climates.* Creative Resource Systems, Inc. Winterville NC. 505 p.
- Nakajima, N., H. Mori, K. Yamazaki, H. Imaseki. 1990. Molecular cloning dan sequence of a complementary-DNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase induce by tissue wounding. *Plant Cell Physiol.* 31:1021-1029.
- Oeller P.W., L-M. Wong, L.P. Taylor, D. A. Pike, A. Theologies. 1991. Reversible inhibition of tomato fruits senescence by antisense RNA. *Science* 254:437-439.
- Picton, S., S.L. Barton, M. Bouzayen, A.J. Hamilton, D. Grierson. 1993. Altered ripening and leaf senescence in tomatoes expressing an antisense ethylene-forming enzyme transgene. *Plant J.* 3:469-481.
- Ravanel, S., B. Gaklere, D. Job, R. Douce. 1998. The specific features of methionine biosynthesis dan metabolism in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:7805-7812.
- Salunkhe, D.K., B.B. Desai. 1984. *Postharvest biotechnology of fruits.* CRC Press. Boca Raton. 168 pp.
- Sato, T., A. Theologies. 1989. Cloning the mRNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, the key enzyme for ethylene biosynthesis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:6621-6625.
- Schuch, W. J. Kanczler, J. Robertson, D. Hobson, G. Tucker, D. Grieson, S. Bright, C. Bird. 1991. Fruit quality characteristics of transgenic tomato fruit with altered polygalacturonase activity. *HortSci.* 26: 1517-1520.
- Sheehy, R.E., M. Kramer, W.R. Hiatt. 1988. Reduction of polygalacturonase activity in tomato fruit by antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:8805-8809.
- Sisler, E.C., M. Serek. 1997. Inhibition of ethylene responses in plants at the receptor level: recent developments. *Physiol. Plant.* 100: 577-582.
- Sisler, E.C., M. Serek. 1999a. Compounds controlling ethylene receptor. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 40: 1-7.
- Sisler, E.C., M. Serek. 1999b. Control of ethylene responses at the receptor level. *In: Kanelis, A.K., C. Chang, H. Kende, D. Grierson* (eds.). *Biology and biotechnology of the plant hormone ethylene.* Kluwer Acad. Pub. Dordrecht. p. 45-50.
- Smith C.J., C.F. Watson, J. Ray, C.R. Bird, P.C. Morris, W. Schuch, D. Grierson. 1988. Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. *Nature* 334:724-726.

- Starrett, D.A., G.G. Laties. 1991. The effect of ethylene dan propylene pulses on respiration, ripening advancement, ethylene-forming enzyme, dan 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase activity in avocado fruit. *Plant Physiol.* 95:921-927.
- Starret A.A., G.G. Laties. 1993. Ethylene dan wound-induced gene expression in the preclimateric phase of ripening avocado fruit dan mesocarp disc. *Plant Physiol.* 103:227-234.
- Tarun, A. S., J. S. Lee, A. Theologis. 1998. Random mutagenesis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase: A key enzyme in ethylene biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 9796-9801.
- Theologies, A., T. I. Zarembinski, P.W. Oeller, X. Liang, S. Abel. 1992. Modification of fruit ripening by suppressing gene expression. *Plant Physiol.* 100:549-551.
- Theologies, A. 1994. Control of ripening. *Current Opinion in Biotechnology*, 5: 152-157.
- Van Der Straeten, D., L.V. Wiemeersch, H.M. Goodman, M.V. Montagu. 1990. Cloning dan sequence of two different cDNAs encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:4859-4863.
- Ververidis, P., P. John. 1991. Complete recovery *in vitro* of ethylene-forming enzyme activity. *Phytochemistry* 3:725-727.
- Webber, G.D. 1994. Biotechnology information series, genetically engineered fruits and vegetables. Iowa State University. Ames. Iowa. <http://www.extension.iastate.edu/publications/NCR551.pdf>. [Diakses , February, 2005].
- Wilkinson, J.Q., M.B. Lanahan, D.G. Clark, A.B. Bleeker, C. Chant, E.M. Meyerowitz, H.J. Klee. 1997. A dominant mutant receptor from *Arabidopsis* confers ethylene insensitivity in heterologous plants. *Nature Biotechnology*, 15: 444-447.
- Yen, H-C, S. Lee, S. D. Tanksley, M. B. Lanahan, H. J. Klee, J. J. Giovannoni. 1995. The Tomato *Never-ripe* Locus Regulates Ethylene-inducible Gene Expression and Is Linked to a Homolog of the *Arabidopsis ETR7* Gene. *Plant Physiol.* (1 995) 107: 1343-1353.