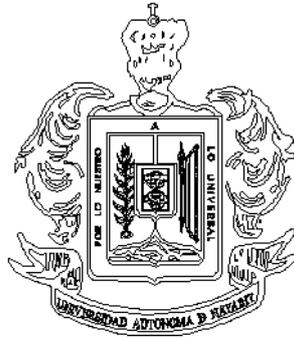


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
ÁREA DE CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS Y PESQUERAS  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS



ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES DURANTE LA  
MADURACIÓN DEL FRUTO DE GUANÁBANA (*Annona muricata* L.) EN  
MANEJO POSTCOSECHA

Tesis presentada como requisito parcial para la obtención del grado de:

**Doctorado en Ciencias en el Área de Ciencias Agrícolas**

Por:

M. C. Mónica Elizabeth Martínez González

Director:

Rosendo Balois Morales

Co-director:

Dr. Moisés Alberto Cortés Cruz

Xalisco, Nayarit; junio de 2019



Este trabajo fue financiado por el FONDO SECTORIAL DE INVESTIGACIÓN PARA LA EDUCACIÓN a través del proyecto “Caracterización morfológica, bioquímica y genética de guanábana (*Annona muricata* L.)” número 242718.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NAYARIT**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICO AGROPECUARIAS**

CBAP/095/19.

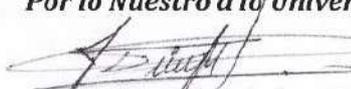
Xalisco, Nayarit; 12 de junio de 2019.

**M.C. GLORIA MACHAIN IBARRA**  
**DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR**  
**NIVEL SUPERIOR Y POSGRADO**  
**P R E S E N T E.**

Con base al oficio de fecha 01 de junio del presente, enviado por los **CC. Dr. Rosendo Balois Morales, Dr. Moisés Alberto Cortés Cruz, Dr. Irán Alia Tejacal y Dra. Graciela Guadalupe López Guzmán**, donde se indica que el trabajo de tesis cumple con lo establecido en forma y contenido, y debido a que ha finalizado con los demás requisitos que establece nuestra institución, se autoriza a la **M.C. Mónica Elizabeth Martínez González**, continúe con los trámites necesarios para la presentación del examen de grado de Doctorado en Ciencias Biológico Agropecuarias en el Área de Ciencias Agrícolas.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente  
*"Por lo Nuestro a lo Universal"*

  
Dr. J. Diego García Paredes  
/Coordinador del Posgrado



C.c.p.- Expediente

&mefm



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE NAYARIT

Tepec, Nayarit a 01 de junio de 2019.

**Dr. Juan Diego García Paredes**  
Coordinador del Posgrado en  
Ciencias Biológico Agropecuarias  
Universidad Autónoma de Nayarit  
**PRESENTE**

Los suscritos, integrantes del Comité Tutorial de la **M.C. Mónica Elizabeth Martínez González**, declaramos que hemos revisado la tesis titulada "**Análisis de expresión diferencial de genes durante la maduración del fruto de guanábana (*Annona muricata* L.) en manejo postcosecha**" y aprobamos que puede ser presentada para aspirar al grado de Doctora en Ciencias Agrícolas.

**Comité tutorial**

**Dr. Rosendo Batois Morales**  
Director

**Dr. Moisés Cortés Cruz**  
Co-Director

**Dr. Iran Alía Tejacal**  
Asesor

**Dra. Graciela Guadalupe López Guzmán**  
Asesora

## **DEDICATORIA**

*Dedico este logro a los que me dieron la vida, el amor y el apoyo incondicional. Esto es tan de ustedes como mío.*

*Gracias eternas padres, Roberto y Elvia; hermanos Roberto y Alex; y a mi inspiración, Leonardo.*

## AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias y al Coordinador del mismo, Dr. J. Diego García Paredes, por permitirme ser parte de este posgrado.

Al SETUAN y sus representantes, por el apoyo con la gestión del permiso que me permitió cursar el doctorado.

A las instituciones y sus representantes que colaboraron para culminar este proyecto: UAN, UAEM, CNRG, IBT-UNAM, CENITT.

Al Dr. Moisés Cortés, por sus atenciones en Tepatitlán, dentro y fuera del CNRG y por iluminarme con sus amplios conocimientos.

Al Dr. Rosendo Balois por dirigir este trabajo, por su tiempo y confianza.

Al Dr. Iran Alia, por agilizar las gestiones necesarias y por su recibimiento en Cuernavaca.

A la Dra. Graciela López, por sus asesorías.

Al M.C. Apatzingán Palomino, por tus asesorías, esfuerzo y dedicación a este proyecto.

Al Dr. Guillermo Berumen, por tu oportuna intervención, tus conocimientos y tu apoyo.

A la Dra. Gabriela Peña y Dr. Adrián Ochoa por su colaboración, conocimientos y recursos.

A la IBQ. Nancy Ruelas, por el apoyo con los análisis fisicoquímicos de este trabajo, tu amistad, tus porras y gran apoyo.

A Dr. Eloy, Dr. Edgar, Dra. Sumaya, Dra. Prisca, M.C. Andrés, M.C. Oscar, Biol. Tania, Lupita Pánuco, por su amistad y compañerismo.

A todos quienes me apoyaron en el gran proceso que viví durante este periodo.

*“You wanna be excellent? Really excellent at what you do? Then be excellent every day, in every part of your life. That’s how the great ones do it.”*  
*-Carol Danvers*

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi

### **ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES DURANTE LA MADURACIÓN DEL FRUTO DE GUANÁBANA (*Annona muricata* L.) EN MANEJO POSTCOSECHA**

Resumen .....	1
Abstract .....	2
Introducción General .....	3
Hipótesis .....	7
Objetivo General .....	7
Objetivos Específicos .....	7
Literatura citada .....	7

### **CAPÍTULO I. POSTCOSECHA DE FRUTOS MADURACIÓN Y CAMBIOS BIOQUÍMICOS**

1.1 Resumen .....	12
1.2 Abstract .....	13
1.3 Introducción .....	13
1.4 Maduración fisiológica de los frutos .....	14
1.5 El proceso de maduración, cambios bioquímicos y sensoriales .....	15
1.5.1 Modificación del color .....	16
1.5.2 Modificación de la textura .....	17

1.5.3 Modificación del aroma .....	17
1.6 Actividad respiratoria .....	19
1.7 El etileno .....	20
1.8 Biosíntesis de etileno .....	21
1.9 Control químico de la respuesta al etileno .....	22
1.10 Conclusiones .....	22
1.11 Literatura citada .....	23

**CAPÍTULO II. POSTCOSECHA DE FRUTOS: MADURACIÓN, ABLANDAMIENTO Y CONTROL TRANSCRIPCIONAL**

2.1 Resumen .....	32
2.2 Abstract .....	33
2.3 Introducción .....	34
2.4 Biosíntesis de etileno y clasificación de frutos .....	35
2.5 Regulación molecular de la biosíntesis de etileno .....	36
2.6 Control transcripcional de la maduración .....	38
2.7 Pérdida de la firmeza .....	40
2.8 Conclusiones y perspectivas .....	42
2.9 Literatura citada .....	43

**CAPÍTULO III. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO DEL PROCESO DE MADURACIÓN DE FRUTOS DE GUANÁBANA (*Annona muricata* L.) MADURADOS A DOS TEMPERATURAS POR RNA-Seq**

3.1 Resumen .....	52
3.2 Abstract .....	53

3.3	Introducción	54
3.4	Materiales y Métodos	56
3.4.1	Sitio experimental y material vegetal	56
3.4.2	Extracción de RNA total	56
3.4.3	Preparación de las genotecas para la secuenciación del transcriptoma	56
3.5	Resultados y Discusión	59
3.5.1	Obtención de genotecas de genes expresados diferencialmente (GED)	59
3.6	Conclusiones y perspectivas	62
3.7	Agradecimientos	63
3.8	Literatura citada	63

**CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES RELACIONADOS CON EL AUMENTO DE ACIDEZ Y EL ABLANDAMIENTO EN EL FRUTO DE GUANÁBANA (*Annona muricata* L.)**

4.1	Resumen	67
4.2	Abstract	68
4.3	Introducción	69
4.4	Materiales y métodos	71
4.4.1	Sitio experimental, material vegetal y tratamientos	71
4.4.2	Parámetros de madurez de los frutos	72
4.4.3	Extracción de RNA total	72
4.4.4	Selección y diseño de primers	72
4.4.5	Síntesis de DNA complementario (cDNA)	73
4.4.6	Amplificación del cDNA	74
4.4.7	Análisis de expresión diferencial por qPCR	75
4.4.8	Análisis estadístico	75
4.5	Resultados y discusión	76

4.5.1 Atributos de calidad postcosecha de guanábana . . . . .	76
4.5.2 Análisis de la expresión de genes relacionados con el ácido cítrico y el ácido málico . . . . .	81
4.5.3 Análisis de la expresión de genes relacionados con el ablandamiento . . . . .	86
4.6 Conclusiones . . . . .	89
4.7 Agradecimientos . . . . .	90
4.8 Literatura citada . . . . .	90
<b>CONCLUSIONES GENERALES . . . . .</b>	<b>100</b>
<b>PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES . . . . .</b>	<b>101</b>
<i>CURRICULUM VITAE . . . . .</i>	<i>102</i>

## ÍNDICE DE CUADROS

**Cuadro 3.1.** Concentración e integridad de los RNA utilizados para la construcción de genotecas; rendimiento de las genotecas ..... 60

**Cuadro 4.1.** Lista de primers diseñados para el análisis del nivel de expresión mediante PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) ..... 74

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Etapas entre la formación del fruto y la senescencia .....	15
<b>Figura 1.2.</b> Principales pasos en la biosíntesis de etileno .....	21
<b>Figura 2.1.</b> Principales pasos en la biosíntesis de etileno .....	36
<b>Figura 3.1.</b> Análisis de integridad de los RNA de mesocarpio de guanábana .....	61
<b>Figura 3.2.</b> Revisión del tamaño de las genotecas y cuantificación de los fragmentos obtenidos .....	61
<b>Figura 4.1. (a).</b> Comportamiento de los sólidos solubles totales y <b>(b)</b> comportamiento del pH, durante la vida postcosecha de los frutos de guanábana almacenados a 15 y 28 °C ..	77
<b>Figura 4.2.</b> Comportamiento de la acidez titulable en frutos de guanábana después de la cosecha almacenados a 15° y 28 °C .....	81
<b>Figura 4.3. (a).</b> Expresión relativa de <i>NAD-MH</i> y <b>(b)</b> expresión relativa de <i>CSM</i> , durante la maduración poscosecha de frutos de guanábana .....	82
<b>Figura 4.4.</b> Comportamiento de la firmeza durante la vida postcosecha de los frutos de guanábana almacenados a 15 y 28 °C .....	87
<b>Figura 4.5.</b> Expresión relativa de <i>EXP</i> , durante la maduración poscosecha de frutos de guanábana .....	88

# **ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES DURANTE LA MADURACIÓN DEL FRUTO DE GUANÁBANA (*Annona muricata* L.) EN MANEJO POSTCOSECHA**

## **RESUMEN GENERAL**

El fruto de guanábana (*Annona muricata* L.) posee una corta vida de anaquel que va de los seis a los ocho días después de la cosecha, tiempo en el cual el fruto se ablanda. Dentro de los cambios fisicoquímicos en la maduración postcosecha, el pH disminuye y hay un incremento tanto de azúcares solubles, como de acidez total, lo que le otorga su sabor distintivo ligeramente ácido. En frutos de guanábana cosechados en madurez fisiológica en Compostela, Nayarit se evaluó el efecto de la temperatura cuando los frutos fueron almacenados a temperatura ambiente (TA) y de refrigeración a 15 °C (T15) hasta alcanzar la madurez de consumo. Se evaluaron los siguientes índices de madurez: firmeza, sólidos solubles totales (SST), acidez total titulable (ATT) y pH cada tres días después de la cosecha.

Por otra parte, debido a que hasta el momento no se cuenta con la secuencia del genoma de guanábana, surgió la necesidad de generar información que ayude a comprender el proceso de maduración a nivel molecular. Para ello se abordaron dos enfoques, por un lado, se contruyeron genotecas de cDNA de frutos de guanábana en tres estados de madurez para su posterior análisis transcriptómico por RNA-Seq con el fin de evaluar el efecto de la temperatura de almacenamiento en la expresión de genes de mesocarpio de guanábana; y por el otro, se seleccionaron tres genes reportados en el proceso de maduración del fruto, para evaluar su expresión diferencial: uno relacionado con el ablandamiento (*expansina*, *EXP*) y dos relacionados con el metabolismo de los ácidos málico y cítrico [*malato deshidrogenasa dependiente de NAD (NAD-MH)* y *citrato sintasa mitocondrial (CSM)*, respectivamente]. Para realizar un análisis de expresión génica se utilizó la transcripción reversa en tiempo real o reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-qPCR o qPCR) que se ha vuelto ampliamente utilizada en especies vegetales no modelo. Los patrones de expresión de los genes candidatos en tres estados de madurez se correlacionaron con los cambios en la ATT y en la firmeza. Los resultados mostraron que los frutos almacenados a ambas temperaturas disminuyeron por lo menos 6 veces su firmeza y el pH disminuyó a valores menores de 4.0. Además, los SST aumentaron a más de 15 °Brix bajo ambas condiciones de temperatura; y la ATT alcanzó valores de hasta 0.92% (TA) y 0.71% (T15). Por otro lado, el análisis de

expresión diferencial mostró que, a TA, la acumulación de *EXP* aumentó continuamente hasta que los frutos alcanzaron la madurez de consumo mientras que a T15, la expresión disminuyó dos terceras partes (frutos menos blandos a T15, consistente con los valores de firmeza). Los niveles de expresión del gen *NAD-MH* se elevaron hasta 10 veces (10X) en la madurez de consumo de los frutos dejados madurar a TA (más ácidos, se correlaciona con los valores de ATT); a diferencia de los frutos a T15 que no mostraron diferencia significativa en su aumento entre la madurez fisiológica y de consumo en los frutos madurados a T15. Por otro lado, el gen *CSM* mostró una disminución no significativa de su expresión hasta finales de la maduración bajo ambos tratamientos.

### ABSTRACT

Soursop fruits (*Annona muricata* L.) have a short shelf life from, six to eight days after harvest, time in which the fruits soften. Within the physicochemical changes in postharvest ripening, pH decreases while soluble sugars and total acidity increase, which confers its slightly acidic taste. Soursop fruits were harvested at physiological maturity in Compostela, Nayarit. We evaluated the effect of temperature [room temperature (RT) versus 15 °C (refrigeration)] until ripe stage, measuring firmness, total soluble solids (TSS), total titratable acidity (TTA) and pH every three days after harvest. On the other hand, since there no genomic information regarding the maturation process of soursop, it is necessary to generate information that helps the better understanding the maturation process at the molecular level. For this, two approaches were used, on the one hand, cDNA libraries from soursop fruits in three maturity stages were constructed for further transcriptomic analysis by RNA-Seq to evaluate the effect of storage temperature on the expression of soursop ripening-related genes; and on the other hand, three genes were selected to evaluate the differential expression; one softening-related (*expansin*, *EXP*) and two related to the metabolism of malic and citric acids [*NAD-dependent malate dehydrogenase* (*NAD-MH*) and *mitochondrial citrate synthase* (*CSM*), respectively]. To perform a gene expression analysis, we used real time reverse transcription or quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR or qPCR) that has become widely used in non-model plant species. The patterns of expression of the candidate genes in three stages of maturity were correlated with changes in TTA and firmness. Our results showed that fruits stored under both temperatures, firmness presented a 6-fold decrease at least and pH declined to less than 4.0. In addition, TSS increased up to 15 °Brix under both temperature

conditions; and TTA raised up to 0.92% (RT) and 0.71% (T15). On the other hand, the differential expression analysis showed that the accumulation of *EXP* increased slightly under RT and decreased rapidly two thirds under T15 conditions (less soft fruits at T15, consistent with firmness values). The expression levels of *NAD-MH* increased up to 10-fold (10X) under RT treatment (more acid fruits, correlated with TTA values), unlike, T15 fruits that showed no significant difference between physiological and horticultural maturity. Conversely, *CSM* showed no significative decrease in expression until the end of ripening under both treatments.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

El fruto de guanábana (*Annona muricata* L.) pertenece a la familia Annonaceae y ha sido clasificado como climatérico (Biale y Barcus, 1970). Se ha reportado que presenta un comportamiento diferente al de otros frutos climatéricos durante la maduración postcosecha, ya que se ha reportado que presenta dos picos climatéricos (Márquez-Cardozo *et al.*, 2012), y que junto con el marcado incremento de azúcares solubles, también hay un notable aumento en la concentración de ácidos orgánicos, al mismo tiempo que ocurre una disminución de pH, lo que le otorga su sabor característico (Lima *et al.*, 2003; Brasil *et al.*, 2008; Márquez Cardozo *et al.*, 2012; González-Agüero *et al.*, 2016).

México es el principal productor de guanábana en el mundo, con 28,853.66 toneladas en el último año, siendo el estado de Nayarit la principal entidad productora (21,810.86 t), específicamente el municipio de Compostela (21,157.5 t), por lo que este fruto tiene un gran potencial de comercialización en la entidad (SIAP, 2017). La principal problemática del fruto de guanábana durante su manejo postcosecha es su corta vida de anaquel debido a la alta tasa de respiración y de producción de etileno (Márquez Cardozo *et al.*, 2012) y a la susceptibilidad al daño por frío. Por su acelerado metabolismo los frutos de guanábana sufren cambios bioquímicos, fisicoquímicos y fisiológicos que los hacen altamente perecederos (Lima y Alves, 2011).

Dentro de estos cambios está la pérdida de firmeza que ocurre por la degradación de la pared celular, que se ha asociado a cambios bioquímicos en las fracciones de la pared celular que resultan de la degradación de polímeros tales como celulosa, hemicelulosas y pectinas (Brummell, 2006; Payasi *et al.*, 2009; Martínez-González *et al.*, 2017b). Esta

degradación involucra la acción de distintas enzimas hidrolíticas y de proteínas que no tienen actividad hidrolítica pero que debilitan la pared celular como las xiloglucano endotransglucosilasas (XET) y las expansinas (EXP), entre otras (Li *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2015; Dautt-Castro *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016). Estas proteínas han sido ampliamente estudiadas, mostrando marcados incrementos en su actividad, niveles de mRNA y de proteína acompañando al ablandamiento del fruto (Ali *et al.*, 2004; Sane *et al.*, 2007; Mann *et al.*, 2008). En el fruto de chirimoya existen reportes sobre la expresión de genes relacionados con la pared celular (*XET* y *EXP*) (Shen *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2016), sin embargo, en guanábana no se han reportado este tipo de estudios.

Otro de los cambios más importantes en el fruto de guanábana, es la acumulación de ácidos orgánicos en el proceso de maduración. En la familia de las anonáceas, como la guanábana (*A. muricata*; Paull *et al.*, 1983), la chirimoya (*A. cherimola*; Palma *et al.*, 1993; González-Agüero *et al.*, 2016) y el saramuyo (*A. squamosa*; Bolívar-Fernández *et al.*, 2009) se han reportado aumentos en la ATT durante la maduración. En el fruto de guanábana, la ATT aumenta lentamente durante el proceso de crecimiento (Borrero *et al.*, 1995) y al inicio de la maduración (Aziz y Yusof, 1994); a lo largo de la maduración, el aumento es mayor (Paull *et al.*, 1983; Lima *et al.*, 2003a, 2003b). De todos los ácidos encontrados, el ácido málico es el que más se acumula durante la maduración del fruto de guanábana. Paull *et al.* (1983) identificaron un aumento de siete veces en el contenido de este ácido, mientras que el contenido de ácido cítrico solo se triplicó. Por lo tanto, concluyeron que es el aumento de ácido málico el que contribuye significativamente al sabor ácido del fruto. Ambos ácidos mostraron el mayor pico de concentración a 3 y 4 días después de la cosecha y después disminuyeron (Pareek *et al.*, 2011).

Para poder explicar estos y otros cambios en frutos de guanábana, se han realizado estudios a nivel bioquímico y fisicoquímico (Márquez Cardozo *et al.*, 2012; Jiménez-Zurita *et al.*, 2017a) aunque a pesar de su importancia económica y agronómica en la región, se sabe muy poco acerca de los mecanismos moleculares de su proceso de maduración. La principal limitante de los avances en la investigación del proceso de maduración a nivel molecular es la falta de información genómica, por lo que, se ha vuelto necesario realizar estudios de expresión génica. Los estudios de expresión génica son importantes porque constituyen una estrategia útil para el entendimiento, a nivel molecular, de los patrones de expresión bajo una condición determinada. El análisis global de la expresión génica en una célula o tejido es posible a través de la secuenciación

masiva de RNA (RNA-Seq) (Wang *et al.*, 2010; Garber *et al.*, 2011; Egan *et al.*, 2012; Ward *et al.*, 2012), que permite identificar los genes expresados diferencialmente durante un proceso en específico (Czechowski *et al.*, 2005; González-Agüero *et al.*, 2013) sin un genoma de referencia (Feng *et al.*, 2012) como es el caso de la guanábana.

En este trabajo se contruyeron genotecas de cDNA de guanábana con el fin de que, en una etapa posterior, se obtenga el transcriptoma de mesocarpio de guanábana para estudiar el proceso de maduración bajo dos temperaturas de almacenamiento por RNA-Seq. Asimismo, se identificó la presencia de transcritos expresados diferencialmente relacionados con el ablandamiento y la síntesis de ácidos orgánicos y se cuantificaron sus niveles de expresión por PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), que es un método ampliamente utilizado para las mediciones de expresión génica. Se evaluó la expresión diferencial de tres genes de interés; uno relacionado con el ablandamiento (*expansina*, *EXP*) y dos relacionados con el metabolismo de los ácidos málico y cítrico [*malato deshidrogenasa dependiente de NAD (NAD-MH)* y *citrato sintasa mitocondrial (CSM)*, respectivamente].

Por lo anteriormente mencionado, el objetivo de este estudio fue correlacionar la expresión de los genes de interés con los cambios fisicoquímicos que ocurren en el fruto de guanábana durante la maduración postcosecha. Para ello, se analizó el nivel de expresión de los genes *EXP*, *NAD-MH* y *CSM* por qPCR. Los análisis moleculares asociados al proceso de maduración, así como la evaluación de la expresión génica correlacionada con los análisis fisicoquímicos permitieron aportar información importante acerca de algunos de los cambios ocurridos durante la maduración del fruto de guanábana.

En el presente documento, los dos primeros capítulos son publicaciones realizadas como artículos de revisión de la bibliografía consultada para comprender el proceso de maduración de los frutos. Por ello el Capítulo I se refiere a los cambios bioquímicos, fisiológicos y sensoriales que ocurren en los frutos durante su maduración y en el Capítulo II se describe el proceso de ablandamiento de los frutos, además del control transcripcional de la maduración.

En los Capítulos III y IV se describe la parte experimental del trabajo. En el Capítulo III se presenta la información que hasta el momento se tiene del análisis transcriptómico del proceso de maduración de guanábana por RNA-Seq utilizando la tecnología de secuenciación de siguiente generación (NGS, *Next Generation Sequencing*). Esto nos

permitirá un análisis profundo del transcriptoma. En plantas, este tipo de análisis de expresión de su conjunto de genes ha contribuido al conocimiento en áreas como el desarrollo y la maduración del fruto. Aunque ya se realizó la parte experimental de la secuenciación, los datos obtenidos aún están siendo analizados.

El rápido ablandamiento del fruto de guanábana y el aumento en la acidez fueron los procesos en los cuales enfocamos este trabajo. Por ello, el Capítulo IV se refiere al análisis de expresión diferencial de genes relacionados con la maduración del fruto de guanábana por qPCR donde se evaluó la expresión de tres genes de interés, relacionados con el ablandamiento (*expansina*, *EXP*) y con el metabolismo de los ácidos málico y cítrico [*malato deshidrogenasa dependiente de NAD (NAD-MH)* y *citrato sintasa mitocondrial (CSM)*, respectivamente]. Las expansinas son proteínas de la pared celular que no presentan actividad hidrolítica, sin embargo, se ha demostrado que influye en la estructura de la celulosa/hemicelulosa (McQueen-Mason y Cosgrove, 1995). Se ha mostrado que estas proteínas se unen fuertemente a la celulosa, que está cubierta de glucanos de la matriz. El mecanismo de acción propuesto involucra la ruptura de los puentes de hidrógeno entre las microfibrillas de celulosa y los glucosidos entrecruzados, lo que permite que la pared se relaje (McQueen-Mason y Cosgrove, 1995).

Por otro lado, la enzima NAD-MH es la responsable de la síntesis del ácido málico a partir de oxalacetato en el citoplasma de la célula, relacionándose así con el aumento observado en la del ácido málico (Famiani *et al.*, 2015). Adicionalmente, la síntesis del ácido cítrico ocurre en la mitocondria vía el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (CAT). Se ha propuesto que la enzima citrato sintasa mitocondrial (CSM) cataliza el paso clave de la síntesis de citrato (González-Agüero *et al.*, 2016). Aunque la actividad de CSM ha sido positivamente correlacionada con la acumulación de citrato en fresa y cítricos (Sadka *et al.*, 2001; Ianetta *et al.*, 2004), en nuestro estudio la expresión de *CSM* no mostró diferencias significativas durante la maduración de los frutos, a diferencia de *EXP* y *NAD-MH*, que mostraron aumento significativo en su expresión directamente relacionados con la disminución de la firmeza y el aumento en la acidez, respectivamente.

## **HIPÓTESIS**

El análisis de expresión diferencial permitirá identificar el efecto de la temperatura sobre la expresión de genes vinculados con procesos característicos de la maduración postcosecha en frutos de guanábana.

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar la expresión diferencial de genes vinculados al proceso de maduración en frutos de guanábana almacenados a diferentes temperaturas.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Analizar los parámetros fisicoquímicos de frutos de guanábana en diferentes estados de madurez almacenados a dos temperaturas.
2. Generar y secuenciar genotecas de cDNA de frutos de guanábana en diferentes estados de madurez.
3. Evaluar los niveles de expresión génica de frutos de guanábana almacenados a dos temperaturas por bioinformática y/o qPCR.

## **LITERATURA CITADA**

- Ali, Z. M., Chin, L. H., y Lazan, H. 2004. A comparative study on wall degrading enzymes, pectin modifications and softening during ripening of selected tropical fruits. *Plant Sci.* 167, 317–327.
- Aziz, P. A., y Yusof, S. 1994. Physico-chemical characteristics of soursop fruit (*Annona muricata*) during growth and development. *Asean Food Journal*, 9, 147-147.
- Biale, J. B. y Barcus, D. E. 1970. Respiratory patterns in tropical fruits of the Amazon Basin. *Tropical Science*. 12, 93-104.
- Bolivar-Fernandez, N., Saucedo-Veloz, C., Solis-Pereira, S., y Sauri-Duch, E. 2009. Ripening of sugar apple fruits (*Annona squamosa* L.) developed in Yucatan, Mexico. *Agrociencia*, 43, 133–141.
- Borrero, F. V., Hernández, E., Jiménez, R., y Roa, A. 1995. Determinación de índices de madurez de cosecha en guanabana (*Annona muricata*) en dos regiones de Colombia. In: IV Simposio Internacional de Manejo, Calidad y Fisiología

- Postcosecha de Frutas. Santiago, Universidad de Chile. Ed. Lizana (Publicaciones Misceláneas Agrícolas Vol. 42), pp. 25-43.
- Brasil, I. M., Otoch, M. D. L. O., Costa, J. H., Maia, G. A., Lima, M. D. G. S., y Arnholdt-Schmitt, B. 2008. Isolation of total RNA from ripe and unripe soursop (*Annona muricata* L.) fruit. *African Journal of Plant Science*. 2(9), 094-098.
- Brummell, D. A. 2006. Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biology*, 33(2), 103-119.
- Chen, H. J., Cao, S.F., Fang, X. J., Mu, H. L., Yang, H. L., Wang, X., Xu, Q. Q., Gao, H. Y. 2015. Changes in fruit firmness: cell wall composition and cell wall degrading enzymes in postharvest blueberries during storage. *Scientia Horticulturae*. 188, 44–48.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M. K. y Scheible, W. R. 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 139: 5–17.
- Dautt-Castro, M., Ochoa-Leyva, A., Contreras-Vergara, C. A., Pacheco-Sanchez, M. A., Casas-Flores, S., Sanchez-Flores, A., Kuhn, D. N., e Islas-Osuna, M. A. 2015. Mango (*Mangifera indica* L.) cv. Kent fruit mesocarp *de novo* transcriptome assembly identifies gene families important for ripening. *Frontiers in Plant Science*. 6, 62.
- Egan, A., Schlueter, J., y Spooner, D. 2012. Applications of Next-Generation Sequencing in Plant Biology. *American Journal of Botany*. 99 (2): 175-185, EE.UU.
- Feng, C., Chen, M., Xu, C. J., Bai, L., Yin, X. R., Li, X., Allan, A. C., Ferguson, I. B., y Chen, K. S. 2012. Transcriptomic analysis of Chinese bayberry (*Myrica rubra*) fruit development and ripening using RNA-Seq. *BMC genomics*. 13(1), 19.
- Garber, M., Grabherr, M., Guttman, M. y Trapnell, C. 2011. Computational Methods for Transcriptoma Annotation and Quantification Using RNAseq. *Nature Methods* 8: 469-478, EE.UU.
- González-Agüero, M., García-Rojas, M., Di Genova, A., Correa, J., Maass, A., Orellana, A. y Hinrichsen, P. 2013. Identification of two putative reference genes

from grapevine suitable for gene expression analysis in berry and related tissues derived from RNA-Seq data. *BMC genomics*, 14(1), 878.

- González-Agüero, M., Tejerina Pardo, L., Zamudio, M. S., Contreras, C., Undurraga, P. y Defilippi, B. G. 2016. The unusual acid-accumulating behavior during ripening of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) is linked to changes in transcription and enzyme activity related to citric and malic acid metabolism. *Molecules*, 21(5), 398.
- Jiménez-Zurita, J. O., Balois-Morales, R., Alia-Tejacal, I., Sánchez Herrera, L. M., Jiménez-Ruiz, E. I., Bello-Lara, J. E., García-Paredes, J. D. y Juárez-López, P. 2017. Cold Storage of Two Selections of Soursop (*Annona muricata* L.) in Nayarit, Mexico. *Journal of Food Quality*.
- Li, C. R., Shen, W. B., Lu, W. J., Jiang, Y. M., Xie, J. H. y Chen, J. Y. 2009. 1-MCP delayed softening and affected expression of *XET* and *EXP* genes in harvested cherimoya fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 52(3), 254-259.
- Lima, M. A. C., Alves, R. E., Filgueiras, H. A. C. y Enéas-Filho, J. 2003a. Comportamento respiratório e qualidade pós-colheita de graviola (*Annona muricata* L.) 'morada' sob temperatura ambiente. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 25 (1), 49-52.
- Lima, M. A. C., Alves, R. E., y Filgueiras, H. A. C. 2003b. Avaliação da Qualidade e da Suscetibilidade ao Escurecimento Oxidativo de Graviola (*Annona muricata* L.) Durante a Maturação Pós-Colheita. In: *Proceeding of the Interamerican Society for Tropical Horticulture*. (Vol. 46, pp. 23-26).
- Lima, M. C. y Alves, R. E. 2011. Soursop (*Annona muricata* L.). In: *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits: Mangosteen to White Sapote* (pp. 363-392e). Woodhead Publishing Limited.
- Liu, K., Liu, J., Li, H., Yuan, C., Zhong, J. y Chen, Y. 2016. Influence of postharvest citric acid and chitosan coating treatment on ripening attributes and expression of cell wall related genes in cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) fruit. *Scientia Horticulturae*, 198, 1-11.

- Mann, H. S., Alton, J. J., Kim, S., y Tong, C. B. S. 2008. Differential expression of cell-wall modifying genes and novel cDNAs in apple fruit during storage. *Journal of the American Horticultural Science*. 133, 152–157.
- Márquez Cardozo, C. J., Villacorta Lozano, V., Yepes Betancur, D. P., Velásquez, C., y Cartagena Valenzuela, J. R. 2012. Physiological and Physico-Chemical Characterization of the Soursop Fruit (*Annona muricata* L. cv. Elita). *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*. 65(1), 6477-6486.
- Liu, K., Liu, J., Li, H., Yuan, C., Zhong, J. y Chen, Y. 2016. Influence of postharvest citric acid and chitosan coating treatment on ripening attributes and expression of cell wall related genes in cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) fruit. *Scientia Horticulturae*, 198, 1-11.
- Martínez-González, M. E., Balois-Morales, R., Alia-Tejacal, I., Cortes-Cruz, M. A., Palomino-Hermosillo, Y. A. y López-Gúzman, G. G. 2017b. Postcosecha de frutos: maduración, ablandamiento y control transcripcional. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, (19), 4089-4101.
- Palma, T., Aguilera, J. M. y Stanley, D. W. 1993. A Review of postharvest events in cherimoya. *Postharvest Biology and Technology*. 2: 187-208.
- Pareek, S., Yahia, E. M., Pareek, O. P., y Kaushik, R. A. 2011. Postharvest physiology and technology of *Annona* fruits. *Food Research International*. 44(7), 1741-1751.
- Paull, R. E., Deputy, J. y Chen, N. J. 1983. Changes in organic acids, sugars, and headspace volatiles during fruit ripening of soursop (*Annona muricata* L.). *Journal of the American Society for Horticultural Science*.
- Payasi, A., Mishra, N. N., Chaves, A. L. S. y Singh, R. 2009. Biochemistry of fruit softening: an overview. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 15(2), 103-113.
- Sane, V. A., Sane, A. P., Nath, P. 2007. Multiple forms of expansin genes are expressed during banana fruit ripening and development. *Postharvest Biology and Technology*. 45, 184–192.

- Servicio de Información Agrícola y Pesquera (SIAP). 2017. Cierre de la Producción Agrícola. Consultado el 3 de octubre de 2018. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>.
- Shen, W. B., Li, C. R., Chen, J. Y., Xie, J. H. y Lu, W. J. 2009. Expansin gene expression in cherimoya fruit is correlated with flesh firmness during fruit ripening and softening. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 84(3), 333-339.
- Wang, L., Feng, Z., Wang; X., Wang; X. y Zhang, X. 2010. DEGseq: an R Package for Identifying Differentially Expressed Genes from RNASeq Data. *Bioinformatics* 26: 136-138, China.
- Ward, J., Ponnala, L., Weber, C. 2012. Strategies for Transcriptome Analysis in Nonmodel Plants. *American Journal of Botany*. 99 (2): 267-276, EE.UU.

## CAPÍTULO I

### POSTCOSECHA DE FRUTOS MADURACIÓN Y CAMBIOS BIOQUÍMICOS

#### FRUIT POSTHARVEST: MATURATION AND BIOCHEMICAL CHANGES

Mónica Elizabeth Martínez-González<sup>1</sup>, Rosendo Balois-Morales<sup>2\*</sup>, Irán Alia-Tejaca<sup>3</sup>, Moises Alberto Cortés-Cruz<sup>4</sup>, Yolotzin Apatzingan Palomino-Hermosillo<sup>2</sup>, Graciela Guadalupe López-Gúzman<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias, Universidad Autónoma de Nayarit. Ciudad de la cultura “Amado Nervo”. C.P. 63155. Tepic, Nayarit, México (mc.monica.martínez@gmail.com). <sup>2</sup>Universidad Autónoma de Nayarit, Unidad de Tecnología de Alimentos. Ciudad de la cultura “Amado Nervo” s/n. C.P. 63155. Tepic, Nayarit, México. (balois\_uanayar@hotmail.com\*, pasingan@gmail.com, lguzman2303@hotmail.com). <sup>3</sup>Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad Núm. 1001, Col. Chamilpa. C.P. 62209. Cuernavaca, Morelos, México. (iran.alia@uaem.mx). <sup>4</sup>Centro Nacional de Recursos Genéticos. INIFAP. Blvd. de la Biodiversidad No. 400. C.P. 47600. Tepatitlán, Jalisco, México. (cortes.moises@inifap.gob.mx).

#### 1.1. Resumen

La formación de frutos carnosos involucra tres etapas: crecimiento, desarrollo y maduración. El objetivo de esta revisión se enfoca en la recopilación de la información sobre investigaciones relevantes relacionadas con la maduración de los frutos y los cambios bioquímicos que ocurren durante el manejo postcosecha de éstos. Para realizar esta búsqueda de estudios se hizo uso de múltiples bases de datos (Scielo, Redalyc, Elsevier, Scopus, Wiley online library, Sciencedirect, Springer). La maduración del fruto es un importante proceso que activa a todo un conjunto de rutas bioquímicas que hacen que éste sea atractivo y deseable para los consumidores. El estudio de la maduración de los frutos ha sido de gran interés en la investigación ya que los cambios bioquímicos y fisicoquímicos que ocurren durante esta etapa ocasionan grandes pérdidas económicas. Es importante tener conocimiento de los procesos, lo que permite que los investigadores biotecnólogos y fitomejoradores generen más conocimiento o propongan materiales

hortofrutícolas sobresalientes, aplicación de técnicas de manejo poscosecha más efectivas y aprovechables para disminuir las pérdidas poscosecha.

*Palabras clave:* poscosecha, maduración, etileno, frutos climatéricos

## **1.2. Abstract**

The making of fleshy fruits involves three stages: fruit set, fruit development, and fruit ripening. The aim of this review is to compile information on relevant research related to fruit maturation and the biochemical changes occurring during post-harvest management. In order to find information multiple databases were used (Scielo, Redalyc, Elsevier, Scopus, Wiley online library, Sciencedirect, Springer). The ripening of a fruit is an important process that activates a whole set of biochemical pathways that make the fruit attractive and desirable for consumers. The study of fruit ripening has been an area of considerable research interest since the biochemical and physicochemical changes occurring during this stage cause great economic losses. It is important to know about these processes, that allow biotechnologists and plant breeders generate more knowledge or to propose outstanding horticultural materials, application of more effective and useable postharvest management techniques to reduce postharvest losses

*Key words:* postharvest, ripening, ethylene, climacteric fruits

## **1.3. Introducción**

El ablandamiento de los frutos es una serie de eventos genéticamente programados, caracterizados por procesos bioquímicos y fisiológicos que alteran su firmeza, color, sabor y textura (Nishiyama *et al.*, 2007). Dado que la mayor parte de los atributos de calidad son el resultado del proceso de maduración, se ha considerado esencial comprender los mecanismos regulatorios involucrados en esta etapa de desarrollo de los frutos (Bouzayen *et al.*, 2010).

Los frutos son productos altamente perecederos debido a su arquitectura celular y la intensa actividad metabólica (Dos Santos *et al.*, 2015). Algunos procesos de deterioro causan a los agricultores pérdidas de hasta el 40% del valor de la cosecha antes de que lleguen al consumidor (Kitinoja *et al.*, 2011). La aplicación de las tecnologías apropiadas para mantener la calidad depende del conocimiento de la estructura del fruto, la fisiología

y las transformaciones metabólicas (Pech *et al.*, 2013), por ello se han realizado estudios con el fin de comprender mejor el órgano floral y el desarrollo del fruto (Bao *et al.*, 2010; Seymour *et al.*, 2013), el papel de las hormonas y los genes relacionados con el desarrollo y la maduración (Alexander y Grierson, 2002; Cara y Giovannoni, 2008; Kumar *et al.*, 2014), así como los desórdenes fisiológicos (Pegoraro *et al.*, 2010) y las alteraciones epigenéticas asociadas a la maduración (Manning *et al.*, 2006; Zhong *et al.*, 2013) (tomado de Dos Santos *et al.*, 2015).

El objetivo de esta investigación es recopilar la información más relevante publicada referente a los cambios que ocurren en los frutos durante la etapa postcosecha.

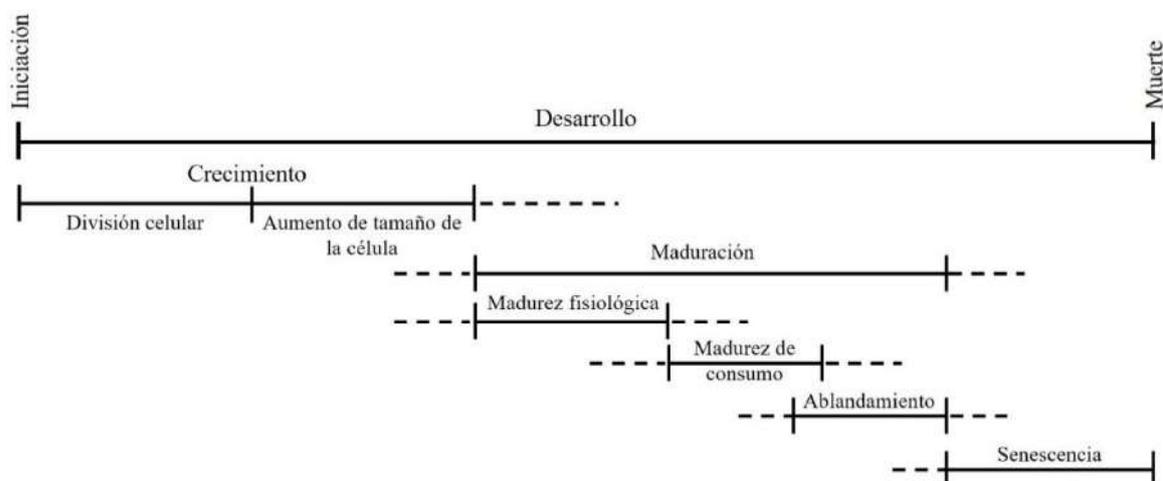
#### **1.4. Maduración fisiológica de los frutos**

El desarrollo del fruto ocurre en tres etapas: crecimiento, desarrollo y maduración, seguidas por el ablandamiento y la senescencia (Alba *et al.*, 2005).

El fruto comienza a desarrollarse poco tiempo después de la polinización y la fertilización (O'Neill, 1997) a través de la división celular, fenómeno que se presenta en las primeras etapas del desarrollo (Dos Santos *et al.*, 2015). Después de este periodo, el crecimiento ocurre debido al aumento de tamaño de la célula al aparecer las vacuolas. Esta etapa se caracteriza por el crecimiento y alargamiento del fruto, seguida por una fase de maduración, donde el número de células se mantiene relativamente constante, observándose un aumento en el tamaño de las mismas (Dos Santos *et al.*, 2015). Esta expansión aumenta en la maduración, etapa donde el fruto es capaz de madurar aún adherido a la planta.

Dentro de las etapas mencionadas, ocurren varios pasos que se llevan a cabo entre el inicio del desarrollo del fruto y su senescencia (Figura 1.1). La madurez fisiológica ocurre antes del desarrollo completo del fruto que después de cosechado debe sobrevivir con sus propios sustratos acumulados (Dos Santos *et al.*, 2015). Este es un paso intermedio entre el fin del crecimiento y el inicio de la senescencia (Dos Santos *et al.*, 2015). Las actividades bioquímicas y fisiológicas involucradas en el ablandamiento, como cambios en la firmeza y en la velocidad de respiración, entre otros; son irreversibles una vez iniciadas (Omboki *et al.*, 2015). Solo pueden retrasarse o disminuir su velocidad con la aplicación externa de ciertos procedimientos (Omboki *et al.*, 2015).

Además, desde el desarrollo y hasta la maduración, varios genes están involucrados y entre estos se encuentran los factores de transcripción (TFs) que tienen gran importancia en la modulación de la expresión de varios genes y procesos metabólicos (O'Neill 1997; Giovannoni, 2001).



**Figura 1.1.** Etapas entre la formación del fruto y la senescencia (Watada *et al.*, 1984; Dos Santos *et al.*, 2015).

### 1.5. El proceso de maduración, cambios bioquímicos y sensoriales

En las etapas finales del crecimiento y el desarrollo, ocurre el proceso de maduración en dos pasos: la madurez fisiológica, es cuando el fruto alcanza su máximo tamaño y el mayor vigor de las semillas; y segundo, la madurez de consumo, aquí los cambios del fruto incluyen 1) la modificación del color a través de la alteración en el contenido de clorofilas, carotenoides y la acumulación de los flavonoides; 2) la modificación de la textura vía alteración del turgor celular y de la estructura de la pared celular y por el metabolismo; 3) la modificación de azúcares, ácidos orgánicos y compuestos volátiles que afectan la calidad nutricional, el sabor y el aroma del fruto; y 4) aumento en la susceptibilidad al ataque de patógenos oportunistas que están asociados a la pérdida de integridad de la pared celular (Giovannoni, 2004; Seymour *et al.*, 2013; Dos Santos *et al.*, 2015). A continuación, se describen estos fenómenos más a detalle:

### 1.5.1. Modificación del color

Los pigmentos son esenciales para que los frutos sean atractivos, se acumulan comúnmente en la cutícula durante el proceso de maduración, aunque muchos frutos climatéricos también acumulan pigmentos en el tejido de la pulpa durante la maduración postcosecha, a diferencia de los frutos no climatéricos (Bouzayen *et al.*, 2010). Los pigmentos más importantes son los carotenoides y las antocianinas (Bartley y Scolnik, 1995). Además de su papel en la pigmentación, son importantes para la salud humana como fuentes de vitamina A y compuestos antioxidantes, respectivamente (Bartley y Scolnik, 1995). Los carotenoides comprenden a los carotenos, como el licopeno, el  $\beta$ -caroteno y las xantofilas que incluyen a la luteína (Bouzayen *et al.*, 2010). Las antocianinas pertenecen a la subclase flavonoide de los compuestos fenólicos (He y Giusti, 2010). En la uva (*Vitis vinifera*), donde las antocianinas son cruciales para la calidad del vino, se ha demostrado que el etileno estimula la coloración de la baya, por lo que se concluye que esta hormona está involucrada en la regulación de los genes de la biosíntesis de antocianinas (El-Kereamy *et al.*, 2003; Bouzayen *et al.*, 2010). Es sabido que las condiciones ambientales y el manejo de la huerta, donde se incluyen el riego, la poda y la fertilización impactan fuertemente en la coloración de los frutos (Bouzayen *et al.*, 2010). Estudios han demostrado que existe una correlación positiva entre la síntesis de antocianinas y la intensidad de la luz solar en diversos frutos como la manzana (*Malus domestica*) (Ju *et al.*, 1999), la uva (*Vitis vinifera*) (Dokoozlian y Kliewer, 1996; Bergqvist *et al.*, 2001; Spayd *et al.*, 2002), el durazno (*Prunus persica*) (Jia *et al.*, 2005), la fresa (*Fragaria ananassa*) (Da Silva *et al.*, 2007) y el litchi (*Litchi chinensis*) (Tyas *et al.*, 1998). En estos casos, la luz del sol aumenta la síntesis de antocianinas (de Pascual-Teresa y Sánchez-Ballesta, 2008). Los cambios de temperatura también juegan un papel importante, se ha observado que ambientes con temperaturas bajas favorecen la acumulación de antocianinas, mientras que climas cálidos disminuyen la síntesis de estos compuestos (Leng *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2004; Mori *et al.*, 2005).

Las deficiencias en nutrientes, especialmente fósforo (P) y nitrógeno (N) inducen la acumulación de antocianinas en diferentes especies (Hodges y Niozillo, 1995; de Pascual-Teresa y Sánchez-Ballesta, 2008). En tomate (*Solanum lycopersicum*), además de aumentar el contenido de flavonoides, el estrés por N también produce efectos en la expresión diferencial de genes que codifican enzimas para la biosíntesis de antocianinas (Bongue- Bartelsman y Phillips, 1995). En contraste, se ha reportado que altos niveles de

N aplicado a árboles de durazno (*Prunus persica*) y nectarina (*Prunus persica* var. *nucipersica*) afectan negativamente la calidad del fruto, ya que la madurez se retrasa, el porcentaje de coloración roja disminuye y el tamaño del fruto no aumenta en comparación con los frutos tratados con niveles óptimos de N (Daane *et al.*, 1995). Se observaron resultados similares en aronia negra (*Aronia melanocarpa* cv. Viking) al utilizar un fertilizante con combinación de N, P y potasio (K) (Jeppsson, 2000).

### **1.5.2. Modificación de la textura**

Uno de los principales factores asociado con el deterioro postcosecha de los frutos es la velocidad de ablandamiento, que provoca una vida de anaquel más corta, reduciendo los tiempos de transporte y distribución y aumenta las pérdidas postcosecha (Bapat *et al.*, 2010). El ablandamiento de los frutos es causado por el efecto acumulativo de una serie de modificaciones que ocurren en las redes de polímeros que constituyen la pared celular primaria. El ablandamiento del fruto es un proceso complejo que involucra tres pasos subsecuentes: 1) relajación de la pared celular mediada por expansinas; 2) despolimerización de hemicelulosas; y 3) despolimerización de poliuronidos por la poligalacturonasa u otras enzimas hidrolíticas (Brummell *et al.*, 1999; Payasi *et al.*, 2009); lo cual contribuye a una pérdida de firmeza y cambios en calidad de la textura (Brummell y Harpster, 2001). Las modificaciones en los polímeros de la pared celular durante el ablandamiento son complicadas y se considera que involucran una acción coordinada e interdependiente de un rango de enzimas y proteínas modificadoras de la pared celular tales como la poligalacturonasa (PG, EC 3.2.1.15), pectinmetilesterasa (PME, EC 3.1.1.11),  $\beta$ -galactosidasa (EC 3.2.1.23) xiloglucano endotransglicosilasa (XET, EC 2.4.1.207) y expansinas (Brummell y Harpster, 2001; Payasi *et al.*, 2009).

### **1.5.3. Modificación del aroma**

El aroma es una mezcla compleja de un amplio rango de compuestos. Los compuestos volátiles del aroma contribuyen decisivamente a la calidad sensorial de los frutos (Bouzayen *et al.*, 2010). En años recientes, los esfuerzos en la investigación se han dirigido hacia el aislamiento de genes relacionados a los compuestos volátiles en frutas (Aharoni *et al.*, 2000; Yahyaoui *et al.*, 2002; Beekwilder *et al.*, 2004; El-Sharkawy *et al.*, 2004; Pech *et al.*, 2008). Las clases más importantes de compuestos que confieren olor son los monoterpenos, sesquiterpenos y compuestos derivados de lípidos, azúcares y aminoácidos. Se sabe que el etileno controla la velocidad de maduración, la duración de la vida de anaquel y la mayoría de los eventos de maduración en frutos climatéricos

(Bouzayen *et al.*, 2010). También se ha demostrado que el etileno tiene un papel clave en la regulación de genes involucrados en la producción de compuestos volátiles en múltiples especies frutales a través del uso de mutantes en tomate, líneas transgénicas de RNA antisentido en manzana y otros inhibidores de receptores de etileno (en manzana, Schaffer *et al.*, 2007; en tomate, Kovacs *et al.*, 2009 y Gapper *et al.*, 2013). Por lo tanto, se ha observado que los genotipos generados para tener una vida de anaquel extendida, han resultado en una severa pérdida de sabor y olor, ya que muchos genes de la biosíntesis del aroma son regulados por el etileno (El-Sharkawy *et al.*, 2004; Manríquez *et al.*, 2006). Dandekari *et al.* (2004), reportaron una regulación diferencial de etileno con respecto a los componentes de la calidad de la fruta en manzana. Se ha reportado que existe una correlación directa entre el etileno y la producción del aroma durante la maduración del fruto de manzana (Wang *et al.*, 2007). Asimismo, Schaffer *et al.* (2007), identificaron 17 genes candidatos que era probable que fueran puntos de control de etileno con respecto a la producción del aroma en manzana, aunque solo ciertos puntos en las rutas de la biosíntesis del aroma eran regulados por el etileno. Es decir, el primer paso en algunas rutas y los últimos pasos de todas las rutas biosintéticas contenían enzimas reguladas por etileno. Con estos hallazgos concluyeron que los pasos tanto inicial como final de las rutas biosintéticas son puntos importantes de regulación transcripcional para la producción del aroma en manzana. Un reto importante para el futuro será desunir la regulación por disminución de etileno de la inhibición de la producción de compuestos volátiles (Bouzayen *et al.*, 2010).

Al final de la etapa de madurez de consumo, ocurren algunos cambios fisiológicos relacionados con la senescencia que llevan al deterioro de la membrana y a la muerte celular. En este aspecto, la madurez de consumo puede ser considerada como el primer paso de un proceso de muerte celular programada (Bouzayen *et al.*, 2010). Durante la senescencia la síntesis de carbohidratos cesa y tiene lugar la degradación de las proteínas, clorofilas, lípidos y ácidos nucleicos, que requiere la síntesis de enzimas hidrolíticas, así como la síntesis de carotenoides y de compuestos antioxidantes (Gapper *et al.*, 2013).

Dichas enzimas son sintetizadas a partir de la activación de genes que las codifican; así como también, todos los cambios bioquímicos y fisiológicos que tienen lugar durante esta etapa son promovidos por la expresión coordinada de genes relacionados con la maduración del fruto (Bouzayen *et al.*, 2010). También codifican para proteínas reguladoras que participan en las rutas de señalización y en la maquinaria transcripcional

que regula la expresión de genes y genera el programa de desarrollo de la maduración (Bouzayen *et al.*, 2010). El conjunto de genes que controlan la firmeza, el sabor, el color y el aroma del fruto están regulados por un diferente conjunto específico de genes que a su vez pueden ser regulados ya sea por uno solo o por un conjunto de factores de transcripción (Nath *et al.*, 2007).

### **1.6. Actividad respiratoria**

Los frutos son definidos fisiológicamente con base a la presencia (climatéricos) o ausencia (no climatéricos) de un aumento en la respiración y en la síntesis de etileno al comienzo de la madurez de consumo (Lelièvre *et al.*, 1997).

Los frutos climatéricos son aquellos que pueden madurar no sólo adheridos a la planta, sino también después de la cosecha, cuando son cortados en la etapa pre climatérica, como el tomate (*Solanum lycopersicum*), la manzana (*Malus domestica*) y el plátano (*Musa* spp.), este tipo de frutos alcanza más pronto la senescencia (Fernández-Trujillo *et al.*, 2007; Obando-Ulloa *et al.*, 2008) en vista de que la respiración está acompañada por un aumento similar en los niveles de etileno, que coordina y sincroniza el proceso de maduración (Omboki *et al.*, 2015).

Por otro lado, los frutos no climatéricos como la fresa (*Fragaria* spp.), la uva (*Vitis vinifera* L.) y los cítricos, solo alcanzan la maduración cuando aún están unidos a la planta, ya que no presentan un aumento en la respiración y en la producción de etileno después de la cosecha (Biale, 1964; Given *et al.*, 1988; Chervin *et al.*, 2004). Los frutos no climatéricos no desarrollan los patrones climatéricos que incluyen el aumento en la respiración, biosíntesis de etileno y respuesta autocatalítica al etileno, pero muestran algunas respuestas típicas al etileno como desverdizado (cambios en la coloración de verde a amarillo o anaranjado y ablandamiento (síntesis de enzimas que degradan la pared celular), entre otros (Dos Santos *et al.*, 2015). Es decir, se llevan a cabo los mismos cambios bioquímicos en el color, textura, sabor y olor del fruto. Esto sugiere que los genes involucrados son los mismos que están expresados diferencialmente debido a la evolución que sus reguladores han sido conservados vía procesos evolutivos (Omboki *et al.*, 2015).

Los frutos climatéricos sufren un deterioro masivo durante el manejo postcosecha, lo que se traduce en pérdidas económicas significativas (Bapat *et al.*, 2010). El proceso de la maduración involucra aspectos tales como la regulación del control metabólico, la comunicación entre organelos, los reguladores de crecimiento y la expresión genética

(Alexander y Grierson, 2002). Diversos estudios genéticos han sugerido que el proceso de la maduración está programado en la célula y que requiere de la expresión diferencial de genes, lo que resulta en la transcripción de mRNA específicos y en la síntesis de proteínas de *novo* (Lincoln y Fischer, 1988; Darley *et al.*, 2001).

En este sentido, se han utilizado técnicas de biología molecular dirigidas al aislamiento, reconocimiento y expresión de los genes de las principales enzimas que actúan durante el ablandamiento que se presenta en la maduración de los frutos (Brummell y Harpster, 2001); sin embargo, las diferencias moleculares que hay entre la maduración climatérica y no climatérica aún son poco conocidas (Giovannoni, 2004).

Aunque el papel específico de la respiración climatérica en la maduración del fruto aún no está claro, la incorporación del etileno como coordinador de la maduración de especies climatéricas probablemente sirva para facilitar la maduración rápida y coordinada (Giovannoni, 2004).

### **1.7. El etileno**

El crecimiento y desarrollo del futo son controlados por la producción de hormonas, las cuales son susceptibles a los cambios ambientales (McClellan y Chang, 2008). Entre estas hormonas se encuentra el etileno, que controla muchos procesos en las plantas superiores, como la senescencia de los órganos, respuesta al estrés, la germinación de la semilla (Owino *et al.*, 2006; Zhu y Zhou; 2007; Jiang *et al.*, 2011; Oms-Oliu *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2013), la cicatrización de heridas (Capitani *et al.*, 1999), además de las interacciones con otras hormonas e iones metálicos (Cervantes, 2002). Asimismo, ha sido identificado como la principal hormona que inicia y controla el proceso de maduración del fruto (Abeles *et al.*, 1992; Lara y Vendrell, 2003; Owino *et al.*, 2006; McClellan y Chang, 2008; Pech *et al.*, 2008; Asif *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Bapat *et al.*, 2010; Iguarán y Alzate, 2014). En resumen, la presencia del etileno inicia la maduración y la completa en varias etapas (Omboki *et al.*, 2015).

En frutos carnosos, se ha intentado disminuir la biosíntesis del etileno durante la maduración para retardar el deterioro en postcosecha (Bapat *et al.*, 2010) puesto que una vez que la maduración ha sido iniciada, el proceso es incontrolable (Jiang *et al.*, 2011). La mayor parte de los procedimientos utilizados para limitar la biosíntesis de etileno se enfocan en el aumento o disminución de la temperatura y la modificación de la atmósfera

en la que se conservan los frutos (Lara y Vendrell, 2003; Zhu y Zhou, 2007; Asif *et al.*, 2009).

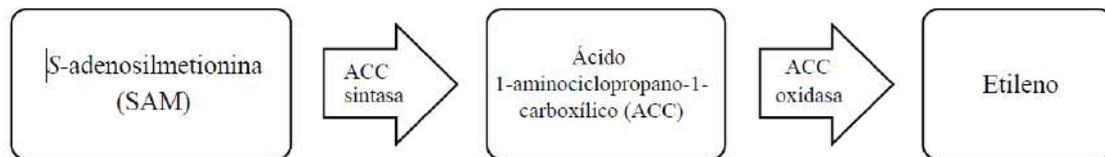
### **1.8. Biosíntesis de etileno**

El etileno se produce en la mayoría de los tejidos de plantas (Oms-Oliu *et al.*, 2011). En los frutos existen dos sistemas distintivos de biosíntesis.

El sistema 1 corresponde a una baja producción de etileno en el periodo pre-climatérico de los frutos climatéricos y está presente a lo largo del desarrollo de frutos no climatéricos. El sistema 2 se refiere a una producción de etileno autorregulatoria llamada “síntesis autocatalítica”, y es específica para frutos climatéricos (Bapat *et al.*, 2010). Es decir, que en el inicio de la maduración, los frutos climatéricos presentan un punto máximo de respiración, seguido por una explosión en la producción de etileno, mientras que, en los frutos no climatéricos, la maduración es independiente del etileno, el cual está presente solo a un nivel basal (Asif *et al.*, 2009). Además, la explosión climatérica de la producción de etileno estimula los genes responsables de la biosíntesis del etileno (Lara y Vendrell, 2003).

La ruta biosintética del etileno (Fig.1. 2) está bien establecida (Yang y Hoffman, 1984). Esta hormona de la maduración inicia con la conversión de metionina a S-adenosil- L-metionina (SAM) y ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) (Kende, 1993). Dos enzimas clave están involucradas en la ruta biosintética, la ACC sintasa (ACS), que convierte a SAM en ACC, y la ACC oxidasa (ACO) que convierte a ACC en etileno (Kende, 1993) y se han identificado y caracterizado los genes correspondientes que las codifican (Sato y Theologis, 1989; Hamilton *et al.*, 1990, 1991). Los perfiles de expresión y mecanismos de regulación de los genes de ACS y ACO en frutos han sido investigados en plantas (Liu *et al.*, 2015).

En tomate se ha reportado que tanto ACS como ACO son codificadas por una familia de multigenes de cinco y nueve miembros, respectivamente, con expresión regulada diferencialmente durante el desarrollo y la madurez del fruto (Bapat *et al.*, 2010; Bouzayen *et al.*, 2010). Asimismo, los genes de ACS y ACO han sido utilizados como blanco para suprimir la producción de etileno y retardar la maduración y la senescencia de los frutos en otras especies como melón (*Cucumis melo* var. *cantalupensis*; Ayub *et al.*, 1996), manzana (Wang *et al.*, 2009) y en frutos de mora (*Morus atropurpurea* cv. Jialing; Liu *et al.*, 2015).



**Figura 1.2.** Principales pasos en la biosíntesis de etileno.

### 1.9. Control químico de la respuesta al etileno

Un inhibidor de etileno, un compuesto llamado 1-metilciclopropano (1-MCP), ha probado ser un antagonista potente de la acción del etileno y ahora es usado como una herramienta de investigación para poder llegar a un mejor entendimiento de los procesos reguladores de etileno y para la extensión de la vida de anaquel de frutas y vegetales (Blankenship y Dole, 2003). Se ha observado un amplio rango de efectos que varían entre especies e incluso entre cultivares (Watkins, 2006). Parece ser que este compuesto tiene limitantes en muchas especies, pero su mayor éxito ha sido prolongar la vida de anaquel de los frutos de manzana, lo que llevado a que sea ampliamente utilizado en la industria.

El 1-MCP se aplica mejor después de que la maduración ha iniciado. La aplicación preclimática resulta en una severa inhibición de la maduración que puede ser problemática para recuperarse (Omboki *et al.*, 2015). Se determinó que la actividad del 1-MCP está influenciada por los niveles internos de etileno (Zhengke *et al.*, 2009). Este es un descubrimiento importante que puede ser explotado para el cultivo hortícola a escala industrial o comercial (Omboki *et al.*, 2015).

### 1.10. Conclusiones

Hay un notable progreso en el estudio de los mecanismos de la maduración de los frutos, pero un gran número de preguntas aún permanecen sin respuesta.

El etileno juega un papel determinante en el proceso de maduración y su relación con los diferentes procesos que ocurren en esta etapa en los frutos climatéricos, pero aún quedaría por abordar la función de otras hormonas y la forma en la que actúan junto con el etileno. Asimismo, otro tema sobre el que se requiere más información, es el mecanismo por el cual el etileno selecciona genes específicos de regulación de la maduración.

Por otro lado, aunque en frutos no climatéricos hay información acerca de los mecanismos que regulan el proceso de maduración, existe interés en el tema y se realizan estudios que están generando información valiosa.

Como resultado de esta búsqueda exhaustiva de información relacionada con los cambios bioquímicos en la maduración de los frutos durante su manejo poscosecha, se permite una actualización de lo que se hace en investigación sobre el tema, cuya información servirá para que los investigadores biotecnólogos y fitomejoradores generen conocimiento o propongan materiales vegetales sobresalientes con una técnica de manejo poscosecha más efectiva y aplicable, lo que impactaría en la economía de países cuya principal actividad es la agricultura.

### **1.11. Literatura citada**

- Abeles F., Morgan P. y Saltveit M. 1992. Ethylene in plant biology. Academic Press. 2a ed. New York, EE.UU. 414 p.
- Aharoni, A., Keizer, L. C., Bouwmeester, H. J., Sun, Z., Alvarez-Huerta, M., Verhoeven, H. A., Blass, J., van Houwelingen, A. M. M. L., de Vos, R. C. H., Van der Voet, H., Jansen, R. C., Guis, M., Mol, J., Davis, R. W., Schena, M., van Tunen, A. J. y O'Connell, A. P. 2000. Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *The Plant Cell*. 12(5): 647-661.
- Alba, R., Payton, P., Fei, Z., McQuinn, R., Debbie, P., Martin, G. B. y Giovannoni, J. J. 2005. Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. *The Plant Cell*. 17(11):2954-2965.
- Alexander, L. y Grierson, D. 2002. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*. 53:2039-2055.
- Asif, M., Pathak, N., Solomos, T. y Trivedi P. 2009. Effect of low oxygen, temperature and 1-methylcyclopropene on the expression of genes regulating ethylene biosynthesis and perception during ripening in apple. *South African Journal of Botany*. 75(1):137-144.
- Bao, F., Azhakanandam, S. y Franks, R. G. 2010. SEUSS and SEUSS-LIKE transcriptional adaptors regulate floral and embryonic development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 152:821-836.

- Bapat, V. A., Trivedi, P. K., Ghosh, A., Sane, V. A., Ganapathi, T. R. y Nath, P. 2010. Ripening of fleshy fruit: molecular insight and the role of ethylene. *Biotechnology Advances*. 28(1):94-107.
- Bartley, G. E. y Scolnik, P. A. 1995. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *The Plant Cell*. 7(7):1027-1038.
- Beekwilder, J., Alvarez-Huerta, M., Neef, E., Verstappen, F. W., Bouwmeester, H. J. y Aharoni, A. 2004. Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana. *Plant Physiology*. 135:1865–1878.
- Bergqvist, J., Dokoozlian, N. y Ebisuda, N. 2001. Sunlight exposure and temperature effects on berry growth and composition of Cabernet Sauvignon and Grenache in the Central San Joaquin Valley of California. *American Journal of Enology and Viticulture*. 52(1):1-7.
- Biale, J. B. 1964. Growth, maturation, and senescence in fruits. *Science*. 146:880-888.
- Blankenship, S. M. y Dole, J. M. 2003. 1-Methylcyclopropene: a review. *Postharvest Biology and Technology*. 28(1):1-25.
- Bongue-Bartelsman, M. y Phillips, D. A. 1995. Nitrogen stress regulates gene expression of enzymes in the flavonoid biosynthetic pathway of tomato. *Plant Physiology and Biochemistry*. 33(5):539-546.
- Bouzayen, M., Latché, A., Nath, P. y Pech, J. C. 2010. Mechanism of fruit ripening. In: *Plant Developmental Biology-Biotechnological Perspectives*, vol. 1. Pua, E.C. y Davey, M.R. (eds.). Springer-Verlag. Berlin, Germany. 319-339 pp.
- Brummell, D. A., Harpster, M. H., Civello, P. M., Palys, J. M., Bennett, A. B. y Dunsmuir, P. 1999. Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *The Plant Cell*. 11(11):2203-2216.
- Brummell, D. A. y Harpster, M. H. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. En: *Plant Cell Walls*. Carpita, N.C.; Campbell, M. y Tierney, M. (eds.). 1a ed. Springer Science. Netherlands. 311-340 pp.
- Capitani, G., Hohenester, E., Feng, L., Storici, P., Kirsch, J. F. y Jansonius, J. N. 1999. Structure of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, a key enzyme in the

- biosynthesis of the plant hormone ethylene. *Journal of Molecular Biology*. 294(3):745-756.
- Cara, B. y Giovannoni, J. J. 2008 Molecular biology of ethylene during tomato fruit development and maturation. *Plant Science*. 175:106-113.
- Cervantes, E. 2002. Ethylene: new interactions, still ripening. *Trends in Plant Science*. 7(8):334-335.
- Chervin, C., El-Kereamy, A., Roustan, J. P., Latché, A., Lamon, J. y Bouzayen, M. 2004. Ethylene seems required for the berry development and ripening in grape, a non-climacteric fruit. *Plant Science*. 167(6):1301-1305.
- Da Silva, F. L., Escribano-Bailón, M. T., Alonso, J. J. P., Rivas-Gonzalo, J. C. y Santos-Buelga, C. 2007. Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT-Food Science and Technology*. 40(2):374-382.
- Daane, K. M., Johnson, R. S., Michailides, T. J., Crisosto, C. H., Dlott, J. W., Ramirez, H. T., Yokota, G. Y. y Morgan, D. P. 1995. Nitrogen fertilization affects nectarine fruit yield, storage qualities, and susceptibility to brown rot and insect damage. *California Agriculture*. 49(4):8.
- Dandekari, A. M., Teo, G., Defilippi, B. G., Uratsu, S. L., Passey, A. J., Kader, A. A., Stow, J. R., Colgan, R. J. y James, D. J. 2004. Effect of down-regulation of ethylene biosynthesis on fruit flavor complex in apple fruit. *Transgenic research*. 13(4):373-384.
- Darley, C. P., Forrester, A. M. y McQueen-Mason, S. J. 2001. The molecular basis of plant cell wall extension. En: *Plant Cell Walls*. Carpita, N.C., Campbell, M. y Tierney, M. (eds.). 1a ed. Springer Science. Netherlands. 179-195 pp.
- de Pascual-Teresa, S. y Sánchez-Ballesta, M. T. 2008. Anthocyanins: from plant to health. *Phytochemistry reviews*. 7(2):281-299.
- Dokoozlian, N. K. y Kliewer, W. M. 1996. Influence of light on grape berry growth and composition varies during fruit development. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 121(5):869-874.
- Dos Santos, R. S., Arge, L. W. P., Costa, S. I., Machado, N. D., de Mello-Farias, P. C., Rombaldi, C. V. y de Oliveira, A. C. 2015. Genetic regulation and the impact of omics in fruit ripening. *Plant Omics*. 8(2):78-88.

- El-Kereamy, A., Chervin, C., Roustan, J. P., Cheynier, V., Souquet, J. M., Moutounet, M., Raynal, J., Ford, C., Latché, A., Pech, J. C. y Bouzayen, M. 2003. Exogenous ethylene stimulates the long-term expression of genes related to anthocyanin biosynthesis in grape berries. *Physiologia Plantarum*. 119:175–182.
- El-Sharkawy, I., Jones, B., Gentzbittel, L., Lelièvre, J. M., Pech, J. C. y Latché, A. 2004. Differential regulation of ACC synthase genes in cold-dependent and -independent ripening in pear fruit. *Plant Cell Environment*. 27:1197–1210.
- Fernández-Trujillo, J. P., Obando, J., Martínez, J. A., Alarcón, A. L., Eduardo, I., Arús, P. y Monforte, A. J. 2007. Mapping fruit susceptibility to postharvest physiological disorders and decay using a collection of near-isogenic lines of melon. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 132(5):739-748.
- Gapper, N. E., McQuinn, R. P. y Giovannoni, J. J. 2013. Molecular and genetic regulation of fruit ripening. *Plant Molecular Biology*. 82(6):575-591.
- Giovannoni J. J. 2001. Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annual Review of Plant Physiology*. 52:725-749.
- Giovannoni, J. J. 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell*. 16(suppl 1):S170-S180.
- Given, N. K., Veis, M. A. y Grierson, D. 1988. Hormonal regulation of ripening in the strawberry, a non-climacteric fruit. *Planta*. 174(3):402-406.
- Hamilton, A. J., Bouzayen, M. y Grierson, D. 1991. Identification of a tomato gene for the ethylene-forming enzyme by expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 88(16):7434-7437.
- Hamilton, A. J., Lycett, G. W. y Grierson, D. 1990. Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature*. 346(6281):284-287.
- He, J. y Giusti, M. M. 2010. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annual Review of Food Science and Technology*. 1:163-187.
- Hodges, D. M. y Nozzolillo, C. 1995. Anthocyanin and anthocyanoplast content of cruciferous seedlings subjected to mineral nutrient deficiencies. *Journal of Plant Physiology*. 147(6):749-754.

- Iguarán, E. J. C. y Alzate, O. A. T. 2014. Hallazgos de la biosíntesis del etileno en frutas climatéricas y de los factores que afectan la ruta metabólica. *Alimentos Hoy*. 22(31):46-63.
- Jeppsson, N. 2000. The effects of fertilizer rate on vegetative growth, yield and fruit quality, with special respect to pigments, in black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) cv. Viking. *Scientia Horticulturae*. 83(2):127-137.
- Jia, H. J., Araki, A. y Okamoto, G. 2005. Influence of fruit bagging on aroma volatiles and skin coloration of 'Hakuho' peach (*Prunus persica* Batsch). *Postharvest Biology and Technology*. 35(1):61-68.
- Jiang, T., Wang, P., Yin, X., Zhang, B., Xu, C., Li, X. y Chen K. 2011. Ethylene biosynthesis and expression of related genes in loquat fruit at different developmental and ripening stages. *Scientia Horticulturae*. 130(2):452-458.
- Ju, Z., Duan, Y. y Ju, Z. 1999. Effects of covering the orchard floor with reflecting films on pigment accumulation and fruit coloration in Fuji apples. *Scientia Horticulturae*. 82(1):47-56.
- Kende, H. 1993. Ethylene biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*. 44(1):283-307.
- Kitinoja, L., Saran, S., Roy, S. K. y Kader, A. A. 2011. Postharvest technology for developing countries: challenges and opportunities in research, outreach and advocacy. *Journal of the Science Food and Agriculture*. 91:597-603.
- Kumar, R., Khurana, A. y Sharma, A.K. 2014 Role of plant hormones and their interplay in development and ripening of fleshy fruits. *Journal of Experimental Botany*. 65:4561-4575.
- Lara, I. y Vendrell, M. 2003. Cold-induced ethylene biosynthesis is differentially regulated in peel and pulp tissues of 'Granny Smith' apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 29(2):109-119.
- Lelièvre, J. M., Latché, A., Jones, B., Bouzayen, M. y Pech, J. C. 1997. Ethylene and fruit ripening. *Physiologia Plantarum*. 101:727-739.
- Leng, P., Itamura, H., Yamamura, H. y Deng, X. M. 2000. Anthocyanin accumulation in apple and peach shoots during cold acclimation. *Scientia Horticulturae*. 83(1):43-50.

- Li, X. J., Hou, J. H., Zhang, G. L., Liu, R. S., Yang, Y. G., Hu, Y. X. y Lin, J. X. 2004. Comparison of anthocyanin accumulation and morpho-anatomical features in apple skin during color formation at two habitats. *Scientia Horticulturae*. 99(1):41-53.
- Lincoln, J. E. y Fischer, R. L. 1988. Diverse mechanisms for the regulation of ethylene-inducible gene expression. *Molecular and General Genetics*. 212(1):71-75.
- Liu, C., Zhao, A., Zhu, P., Li, J., Han, L., Wang, X., Fan, W., Lü, R., Wang, C., Li, Z., Lu, C. y Lu, C. 2015. Characterization and expression of genes involved in the ethylene biosynthesis and signal transduction during ripening of mulberry fruit. *PloS one*, 10(3), e0122081.
- Manning, K., Tor, M., Poole, M., Hong, Y., Thompson, A. J., King, G. J., Giovannoni, J.J. y Seymour, G.B. 2006. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nature Genetics*. 38(8):948-952.
- Manríquez, D., El-Sharkawy, I., Flores. F. B., Regad, F., Bouzayen, M., Latché, A. y Pech, J. C. 2006. Fruit-specific gene expression and biochemical characteristics of two highly divergent alcohol dehydrogenases of melon. *Plant Molecular Biology*. 61:675–685.
- McClellan, C. y Chang, C. 2008. The role of protein turnover in ethylene biosynthesis and response. *Plant Science*. 175(1–2):24-31.
- Mori, K., Sugaya, S. y Gemma, H. 2005. Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Scientia Horticulturae*. 105(3):319-330.
- Nath, P., Sane, A. P., Trivedi, P. K., Sane, V. A. y Asif, M. H. 2007. Role of transcription factors in regulating ripening, senescence and organ abscission in plants. *Stewart Postharvest Review*. 3(2):1-14.
- Nishiyama, K., Guis, M., Rose, J. K., Kubo, Y., Bennett, K. A., Wangjin, L., Kato, K., Koichiro, U., Nakano, R., Inaba, A., Bouzayen, M., Latché, A., Pech, J. C. y Bennett, A. B. 2007. Ethylene regulation of fruit softening and cell wall

- disassembly in *Charentais melon*. *Journal of Experimental Botany*. 58(6):1281-1290.
- O'Neill, S. D. 1997. Pollination regulation of flower development. *Annual Review of Plant Physiology*. 48:547-574.
- Obando-Ulloa, J. M., Moreno, E., García-Mas, J., Nicolai, B., Lammertyn, J., Monforte, A. J. y Fernández-Trujillo, J. P. 2008. Climacteric or non-climacteric behavior in melon fruit: 1. Aroma volatiles. *Postharvest Biology and Technology*. 49(1): 27-37.
- Omboki, R. B., Wu, W., Xie, X. y Mamadou, G. 2015. Ripening Genetics of the Tomato Fruit. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*. 8(4):567-572.
- Oms-Oliu G., Hertog M., Poel, B.V.d., Ampofo-Asiama J., Geeraerd A. y Nicolai B. 2011. Metabolic characterization of tomato fruit during preharvest development, ripening, and postharvest shelf-life. *Postharvest Biology and Technology*. 62(1):7-16.
- Owino, W., Manabe, Y., Mathooko, F., Kubo, Y. y Inaba, A. 2006. Regulatory mechanisms of ethylene biosynthesis in response to various stimuli during maturation and ripening in fig fruit (*Ficus carica* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*. 44(5-6):335-342.
- Payasi, A., Mishra, N. N., Chaves, A. L. S. y Singh, R. 2009. Biochemistry of fruit softening: an overview. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 15(2):103-113.
- Pech, J.C., Latché, A. y van der Rest, B. 2008. Genes involved in the biosynthesis of aroma volatiles in fruit and vegetables and biotechnological applications. En: *Fruit and vegetable flavour: recent advances and future prospects*. Brückner, B. y Wyllie, S.G. (eds). 1a ed. Woodhead Publishing. Cambridge, England. 254-271 pp.
- Pech, J.C., Purgatto, E., Girardi, C.L., Rombaldi, C. V. y Latché, A. 2013. Current challenges in postharvest biology of fruit ripening. *Current Agricultural Science and Technology*. 19(1-18).

- Pegoraro, C., Zanuzo, M. R., Chaves, F. C., Brackmann, A., Girardi, C. L., Lucchetta, L., Nora, L., Silva, J. A. y Rombaldi, C. V. 2010. Physiological and molecular changes associated with prevention of woolliness in peach following pre-harvest application of gibberellic acid. *Postharvest Biology and Technology*. 57(1):19-26
- Saltveit, M. 1999. Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables. *Postharvest biology and technology*. 15(3):279-292.
- Sato, T. y Theologis, A. 1989. Cloning the mRNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, the key enzyme for ethylene biosynthesis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 86(17):6621-6625.
- Schaffer, R. J., Friel, E. N., Souleyre, E. J., Bolitho, K., Thodey, K., Ledger, S., Bowen, J.H., Ma, J.H., Nain, B., Cohen, D., Gleave, A. P., Crowhurst, R.N., Janssen, B.J., Yao, J.L. y Newcomb, R.D. 2007. A genomics approach reveals that aroma production in apple is controlled by ethylene predominantly at the final step in each biosynthetic pathway. *Plant Physiology*. 144(4):1899-1912.
- Seymour, G. B., Ostergaard, L., Chapman, N. H., Knapp, S. y Martin, C. 2013. Fruit development and ripening. *Annual Review of Plant Biology*. 64:219-241.
- Spayd, S. E., Tarara, J. M., Mee, D. L. y Ferguson, J. C. 2002. Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries. *American Journal of Enology and Viticulture*. 53(3):171-182.
- Tyas, J. A., Hofman, P. J., Underhill, S. J. y Bell, K. L. 1998. Fruit canopy position and panicle bagging affects yield and quality of Tai So'lychee. *Scientia Horticulturae*. 72(3):203-213.
- Wang, A., Tan, D., Takahashi, A., Zhong Li, T., y Harada, T. 2007. MdERFs, two ethylene-response factors involved in apple fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*. 58(13):3743-3748.
- Wang, H., Schauer, N., Usadel, B., Frasse, P., Zouine, M., Hernould, M., Latché, A., Pech, J. C., Fernie, A. R. y Bouzayen, M. 2009. Regulatory features underlying pollination-dependent and -independent tomato fruit set revealed by transcript and primary metabolite profiling. *Plant Cell*. 21:1428-1452.

- Watada, A. E., Herner, R. C., Kader, A. A., Romani, R. J. y Staby, G. L. 1984. Terminology for the description of developmental stages of horticultural crops. *HortScience*. 19(1):20-21.
- Watkins, C. B. 2006. The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. *Biotechnology Advances*. 24(4):389-409.
- Yahyaoui, E. F., Wongs-Aree, C., Latché, A., Hackett, R., Grierson, D. y Pech, J. C. 2002. Molecular and biochemical characteristics of a gene encoding an alcohol acyl-transferase involved in the generation of aroma volatile esters during melon ripening. *European Journal of Biochemistry*. 269:2359–2366.
- Yang, S. F. y Hoffman, N. E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*. 35(1):155-189.
- Zheng, Q., Song, J., Campbell-Palmer, L., Thompson, K., Li, L., Walker, B., Cui, Y. y Li, X. 2013. A proteomic investigation of apple fruit during ripening and in response to ethylene treatment. *Journal of Proteomics*. 93(0): 276–294.
- Zhengke, Z., Donald, J. H., Brandon, M. H. y JingPing, R. 2009. Delay of tomato fruit ripening in response to 1-methylcyclopropene is influenced by internal ethylene levels. *Postharvest Biology and Technology*. 54(1):1-8.
- Zhong, S., Fei, Z., Chen, Y.R., Zheng, Y., Huang, M., Vrebalov, J., Mcquinn, R., Gapper, N., Liu, B., Xiang, J., Shao, Y. y Giovannoni, J. J. 2013 Single-base resolution methylomes of tomato fruit development reveal epigenome modifications associated with ripening. *Nature Biotechnology*. 31(2):154-159.
- Zhu, S. y Zhou, J. 2007. Effect of nitric oxide on ethylene production in strawberry fruit during storage. *Food Chemistry*. 100(4):1517-1522.

**CAPÍTULO II**

**POSTCOSECHA DE FRUTOS MADURACIÓN, ABLANDAMIENTO Y**

**CONTROL TRANSCRIPCIONAL**

**FRUIT POSTHARVEST: MATURATION, SOFTENING AND**

**TRANSCRIPTIONAL CONTROL**

Mónica Elizabeth Martínez-González<sup>1</sup>, Rosendo Balois-Morales<sup>2\*</sup>, Irán Alia-Tejascal<sup>3</sup>, Moises Alberto Cortés-Cruz<sup>4</sup>, Yolotzin Apatzingan Palomino-Hermosillo<sup>2</sup>, Graciela Guadalupe López-Gúzman<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias, Universidad Autónoma de Nayarit. Ciudad de la cultura “Amado Nervo”. C.P. 63155. Tepic, Nayarit, México (mc.monica.martínez@gmail.com). <sup>2</sup>Universidad Autónoma de Nayarit, Unidad de Tecnología de Alimentos. Ciudad de la cultura “Amado Nervo” s/n. C.P. 63155. Tepic, Nayarit, México. (balois\_uanayar@hotmail.com\*, pasingan@gmail.com, lguzman2303@hotmail.com). <sup>3</sup>Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad Núm. 1001, Col. Chamilpa. C.P. 62209. Cuernavaca, Morelos, México. (iran.alia@uaem.mx). <sup>4</sup>Centro Nacional de Recursos Genéticos. INIFAP. Blvd. de la Biodiversidad No. 400. C.P. 47600. Tepatitlán, Jalisco, México. (cortes.moises@inifap.gob.mx).

### **2.1. Resumen**

El proceso de formación de un fruto requiere una serie compleja de interacción de genes y rutas de señalización para la conversión de un ovario de la flor en un fruto. En frutos carnosos involucra el crecimiento, el desarrollo y la maduración del fruto. El objetivo de esta revisión se enfoca en la recopilación de la información sobre investigaciones relevantes relacionadas con la maduración, ablandamiento y regulación transcripcional de los frutos durante el manejo postcosecha de éstos. Para realizar esta búsqueda de

estudios se hizo uso de múltiples bases de datos (Scielo, Redalyc, Elsevier, Scopus, Wiley Online Library, ScienceDirect, Springer). La importancia de la maduración de los frutos y su análisis a nivel molecular ha sido de gran interés en la investigación, ya que es un proceso fisiológico y bioquímico complejo que conduce a cambios en la apariencia, la textura, el sabor y el aroma. Los factores de transcripción han mostrado tener una gran importancia, no sólo durante el desarrollo temprano, sino también en el control regulatorio de la maduración y la senescencia; aunque hay avances en la identificación de estos reguladores, aún queda mucho por investigar. En un futuro próximo, será posible controlar la maduración de los frutos y alargar su vida de anaquel manipulando la producción de etileno utilizando un enfoque transgénico.

*Palabras clave:* postcosecha, ablandamiento, maduración, etileno, control transcripcional, regulación génica

## **2.2. Abstract**

The process of fruit formation requires a complex series of gene interaction and signaling pathways for the developing of an ovary from a flower into a fruit. In fleshy fruits involves the growth, development and maturation of the fruit. The aim of this review is to compile the information on relevant research related to the ripening, softening and transcriptional regulation of fruits during postharvest management. In order to find information multiple databases were used (Scielo, Redalyc, Elsevier, Scopus, Wiley Online Library, ScienceDirect, Springer).

The importance of fruit maturation and its analysis at molecular level has been of great interest in research, as it is a complex physiological and biochemical process leading to changes in appearance, texture, taste, and aroma. Transcription factors have been shown to be of great importance, not only during early development, but also in the regulatory

control of maturation and senescence; although there is progress identifying these regulators, much remains to be investigated. In the near future, it will be possible to control the maturation of fruits and extend their shelf life by manipulating ethylene production using a transgenic approach.

*Key words:* postharvest, softening, ripening, ethylene, transcriptional control, genetic regulation

### **2.3. Introducción**

Las semillas representan el germoplasma de la planta, por lo que la estrategia para su dispersión es fundamental para asegurar la supervivencia de la siguiente generación. Los frutos han desarrollado mecanismos complejos para maximizar la eficacia de este proceso (Karlova *et al.*, 2014). Desde un punto de vista ecológico, los frutos que inmaduros representan un órgano que debe ser protegido, por lo que no debe ser atractivo y su color verde le permite camuflajearse con las hojas (Iqbal *et al.*, 2017). La maduración es un evento coordinado de diferentes rutas bioquímicas reguladas por el etileno que produce cambios en el tejido que rodea a las semillas, volviendo al fruto más atractivo y así ayudar a la dispersión de las mismas. Estos cambios afectan el color, el olor, la textura y el contenido de azúcares, lo que ha sido explotado por los seres humanos para la domesticación de los cultivos (Klee y Giovannoni, 2011; Seymour *et al.*, 2013).

Por ello, se han realizado estudios para una mejor comprensión del órgano floral el desarrollo del fruto (Bao *et al.*, 2010; Seymour *et al.*, 2013) el papel de las hormonas y los genes relacionados con el desarrollo y la maduración de los frutos (Alexander y Grierson, 2002; Cara y Giovannoni, 2008; Kumar *et al.*, 2014), así como los desórdenes fisiológicos (Pegoraro *et al.*, 2010) y las alteraciones epigenéticas asociadas a la maduración (Manning *et al.*, 2006; Zhong *et al.*, 2013).

En este sentido, la biología molecular ha contribuido significativamente a elucidar como ocurren el crecimiento y el desarrollo del fruto (Gapper *et al.*, 2013; McAtee *et al.*, 2013; Pech *et al.*, 2013; Seymour *et al.*, 2013; Gapper *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2014; Dos Santos *et al.*, 2015).

Estudios realizados por Bouzayen *et al.*, (2010) revelaron a través de herramientas genómicas y post-genómicas avanzadas, los mecanismos por los cuales la calidad nutricional y sensorial se desarrollan durante las etapas de madurez fisiológica y de consumo del fruto utilizando.

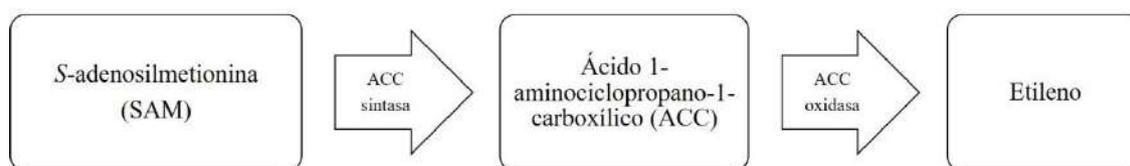
Uno de los fenómenos más estudiados es el ablandamiento de los frutos, que es una serie de eventos genéticamente programados, caracterizados por procesos bioquímicos y fisiológicos que alteran su firmeza, color, sabor y textura (Nishiyama *et al.*, 2007). Dado que la mayor parte de los atributos de calidad se generan durante el proceso de maduración, se ha considerado esencial el comprender mejor los mecanismos involucrados en esta última etapa de desarrollo (Bouzayen *et al.*, 2010). El objetivo de esta revisión se enfoca en la recopilación de la información sobre investigaciones relevantes relacionadas con la maduración, ablandamiento y regulación transcripcional de los frutos durante el manejo postcosecha de éstos.

#### **2.4. Biosíntesis de etileno y clasificación de frutos**

Los frutos pueden clasificarse como climatéricos y no climatéricos en función de su patrón de aumento en la producción de etileno y bióxido de carbono durante la maduración, aunque existen variaciones importantes en la sincronía y tasa de incremento, técnicamente representa una categorización muy útil para el manejo de la cosecha y manejo postcosecha de los frutos (Lelièvre *et al.*, 1997). Aquellos que presentan un climaterio respiratorio y un aumento en la producción de etileno, se conocen como frutos climatéricos e incluyen a frutos como el tomate, plátano, manzana, pera, mango y papaya (Omboki *et al.*, 2015). En contraste, en frutos no climatéricos como la fresa, uva y los cítricos, el aumento en la respiración no manifiesta un clímax y la producción de etileno es baja o ausente (Dos Santos *et al.*, 2015).

Los principales pasos en la biosíntesis de etileno (Fig. 2.1) involucran la conversión de *S*-adenosilmetionina (SAM) a ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) por la ACC sintasa (ACS) y luego por la ACC oxidasa (ACO) a etileno (Alexander y Grierson, 2002). En el tejido de frutos climatéricos, la biosíntesis de etileno inicia a un nivel bajo durante el desarrollo (Sistema 1), pero al inicio de la maduración se vuelve autoctalítico (Sistema 2) (Karlova *et al.*, 2014), debido a que la presencia de etileno activa la

acción del gen que codifica a la enzima ACO que convierte el ACC a etileno (Liu *et al.*, 2015).



**Figura 2.1.** Principales pasos en la biosíntesis de etileno.

Diversos estudios genéticos han sugerido que el proceso de la maduración está programado en la célula y que requiere de la expresión diferencial de genes, lo que resulta en la transcripción de ARNm específicos y en la síntesis de proteínas *de novo* (Lincoln y Fischer, 1988; Darley *et al.*, 2001).

En este sentido, una tendencia en las investigaciones ha sido el uso de técnicas de biología molecular, dirigidas al aislamiento, reconocimiento y expresión de los genes de las principales enzimas que actúan durante el ablandamiento ocurrido en la maduración de los frutos (Brummell y Harpster, 2001). Sin embargo, las diferencias moleculares entre la maduración climatérica y la no climatérica aún son poco conocidas, por lo que se ha propuesto que el etileno juega un papel como coordinador de la maduración en especies climatéricas para facilitar la maduración rápida y coordinada (Giovannoni, 2004).

## 2.5. Regulación molecular de la biosíntesis de etileno

La comprensión del modo de acción del etileno ha progresado con la identificación y el uso de factores de transcripción capaces de unirse a la región promotora de genes relacionados a la biosíntesis y acción del etileno, como los reguladores transcripcionales que pertenecen al tipo APETALA2 (AP2)/ETHYLENE RESPONSE FACTOR (ERF) (Klee y Giovannoni, 2011; Pech, *et al.*, 2012; Grierson, 2013; Pech *et al.*, 2013).

Anteriormente, las bases moleculares de la síntesis y regulación del etileno fueron un punto focal del análisis de la maduración. Sin embargo, en estudios más recientes se ha hecho énfasis en la caracterización de la transducción de señales del etileno (Giovannoni,

2004). No obstante, el etileno por sí mismo no es suficiente para la maduración y para que haya una respuesta al etileno debe existir un desarrollo adecuado (Lelièvre *et al.*, 1997; Giovannoni, 2001). Por consecuencia, los frutos inmaduros normalmente no maduran en respuesta a la aplicación de etileno exógeno. Bauchot *et al.*, (1998) observaron que en melones transgénicos con síntesis de etileno silenciada, algunos aspectos de la maduración climatérica, como la producción de los compuestos volátiles de aroma, son regulados por factores del desarrollo que deben ser coordinados adecuadamente con la síntesis de etileno.

Se han identificado al menos seis diferentes receptores de etileno putativos en el genoma del tomate, LeETR1, LeETR2 (Zhou *et al.*, 1996; Lashbrook *et al.*, 1998), NR (Wilkinson *et al.*, 1995; Payton *et al.*, 1996), LeERT4, LeETR5 (Tieman y Klee, 1999), y LeETR6 (Ciardi y Klee, 2001), los cuales se expresan diferencialmente en varios tejidos como hojas, semillas y flor (Alexander y Grierson, 2002).

Los transcritos que codifican para dos receptores de etileno (NR Y LeTR4) se acumulan en altos niveles en frutos de tomate que están madurando, lo que sugiere que estos dos receptores podrían funcionar en la maduración inducida con etileno (Wilkinson *et al.*, 1995; Yen *et al.*, 1995; Alba *et al.*, 2005).

Alba *et al.* (2005) demostraron que el etileno regula la bioquímica, la morfología, y la actividad transcriptómica en todo el desarrollo del fruto. La comparación de los patrones de expresión de genes que codifican enzimas en rutas de desarrollo del fruto a los productos medidos de dichas rutas (etileno, carotenoides y ascorbato) sugieren nuevos puntos reguladores del desarrollo del fruto influenciados por el etileno.

La actividad de la enzima ACC sintasa se ve afectada por la fosforilación de proteínas. Esta evidencia refuerza la idea de que la síntesis de etileno está regulada desde la transcripción hasta su actividad (Argueso *et al.*, 2007); por ejemplo, los perfiles contrastantes de los genes E4 y E8. La transcripción del gen E4 es estimulada tanto por el sistema 1 como por el sistema 2 de biosíntesis de etileno. Mientras que la transcripción del gen E8 es inducido sólo en frutos maduros; es decir, por el sistema 2, un fuerte indicador de que ambos son regulados en el desarrollo y son específicos para ciertos tejidos (Omboki *et al.*, 2015).

Muchos genes están involucrados en la biosíntesis de etileno, pero los genes que codifican las enzimas ACO y ACS son los más caracterizados (Liu *et al.*, 2015). Barry *et al.* (2000)

reportaron que nueve genes codifican a la enzima ACS, LeACS1A, LeACS1AB y LeACS2 a 8, de los cuales 4 se expresan durante la maduración del fruto: LeACS1A, LeACS2, LeACS4 y LeACS6. LeACS6 es el principal gen de ACS involucrado en la síntesis de etileno en frutos verdes, aunque LeACS1A también se expresó en los mismos tejidos (plántulas de tomate de 10 días). La expresión de LeACS1 y LeACS4 es inducida durante el paso a la maduración que depende del factor de transcripción RIN-MADS (Vrebalov *et al.*, 2002). Por otro lado, la enzima ACO es codificada por cinco genes en tomate donde tres de ellos, LeACO1, 3 y 4 se expresan diferencialmente (Van-der-Hoeven *et al.*, 2002). Los niveles de LeACO1 y 4 aumentan de forma masiva en la etapa verde inmadura de un fruto y son altamente expresados durante la maduración climática, mientras que sus niveles se mantuvieron durante el período de maduración (Omboki, *et al.*, 2015), mientras que la expresión de LeACO3 es altamente dependiente de etileno (Llop-Tous *et al.*, 2000). Los genes que codifican a ACO y ACS también se han caracterizado en durazno (Tatsuki *et al.*, 2006), melón (Yamamoto *et al.*, 1995) y manzana (Dandekari *et al.*, 2004; Omboki *et al.*, 2015).

En fresa, un fruto modelo de maduración no climática, se ha encontrado que la concentración de etileno es relativamente alta en frutos verdes, disminuye en frutos blancos y finalmente aumenta de nuevo en la etapa roja de la maduración (Perkins-Veazie *et al.*, 1996; Iannetta *et al.*, 2006). Además, éste último aumento está acompañado por una mayor tasa de respiración que se asemeja a la que se produce en frutos climáticos al inicio de la maduración (Iannetta *et al.*, 2006).

Evidencia reciente de la regulación de los genes MADS-box de la maduración, tanto en tomate (climático) como en fresa (no climático), sugiere mecanismos reguladores comunes operando en ambas especies, climáticas y no climáticas (Vrebalov *et al.*, 2002).

## **2.6. Control transcripcional de la maduración**

El estudio de la regulación transcripcional del desarrollo temprano de frutos carnosos en especies distintas al tomate se ve obstaculizado por la falta de o dificultad de los protocolos de transformación para los estudios funcionales y/o la falta de mutantes disponibles. Por tanto, la información sobre la función génica de estas especies es a

menudo incompleta y se deriva de estudios de expresión o de expresión heteróloga en otras especies (Karlova *et al.*, 2014).

Recientemente, se ha hecho un avance significativo en la comprensión del control transcripcional de la maduración utilizando al tomate (*Solanum lycopersicum*) como sistema modelo. Los factores de transcripción RIPENING-INHIBITOR (RIN) (Vrebalov *et al.*, 2002), NONRIPENING (NOR) (Giovannoni, 2007) y COLORLESS NONRIPENING (CNR) (Manning *et al.*, 2006) funcionan como reguladores globales de la maduración y actúan de forma contraria al etileno, mientras que factores de transcripción adicionales que son requeridos para una maduración normal incluyen TOMATO AGAMOUS-LIKE1 (TAGL1) (Itkin *et al.*, 2009; Vrebalov *et al.*, 2009), HD-ZIP HOMEODOMAIN PROTEIN-1 (HB-1) (Lin *et al.*, 2008), APETALA2a (AP2a) (Chung *et al.*, 2010; Karlova *et al.*, 2011), ETHYLENE RESPONSE FACTOR6 (ERF6) (Lee *et al.*, 2012), ARABIDOPSIS PSEUDO RESPONSE REGULATOR2-LIKE (APRR2-Like) (Pan *et al.*, 2013) y FRUITFULL (TDR4/FUL1 y MBP7/FUL2) (Bemer *et al.*, 2012).

La mayoría de los reguladores transcripcionales positivos, como AGAMOUS, SHATTERPROOF, MADS-box, FRUITFULL que afectan las rutas de maduración han sido descritos (Omboki *et al.*, 2015). Muchos de estos factores de transcripción de MADS-box influyen en la síntesis de etileno por unión directa de los promotores de los genes ACS2 y ACS4 como en el caso de RIN y TAGL1 (Cherian *et al.*, 2014). TAGL1 está involucrado en la maduración normal del tomate y contribuye a su “carnosidad” (Itkin *et al.*, 2009; Vrebalov *et al.*, 2009).

El mecanismo molecular preciso mediante el cual los productos génicos codificados por RIN, NOR, CNR, TAGL1 y HB-1 operan en la red regulatoria sigue siendo desconocido (Seymour *et al.*, 2013); sin embargo, es probable que las proteínas de MADS-box actúen como heterodímeros o multímeros (Giovannoni, 2007).

Adicionalmente, otros componentes de la red regulatoria, incluyendo a los factores de transcripción que actúan como reguladores negativos, tales como AP2 y SIAP2a (que pertenece a la familia APETALA2/ERF de factores de transcripción y actúa en forma opuesta a RIN, NOR y CNR), han sido reportados como reguladores principales de la maduración (Chung *et al.*, 2010; Karlova *et al.*, 2011). Además, el efector negativo SIAP2a es inducido durante la maduración, pero su represión lleva a una aceleración en

la maduración, niveles elevados de producción de etileno y gran acumulación de carotenoides (Chung *et al.*, 2010; Karlova *et al.*, 2011).

## **2.7. Pérdida de la firmeza**

El ablandamiento es un proceso de maduración programado en muchos frutos, que les proporciona diferentes características como lo jugoso, lo crujiente y la firmeza (Seymour *et al.*, 2002).

Durante este proceso se producen enzimas que modifican la pared celular causando cambios de textura en el fruto; haciéndolo más apetecible a los animales que dispersan las semillas, y/o más susceptibles a patógenos que liberan las semillas (Gapper *et al.*, 2013). La química de la pared celular es el principal contribuyente, junto con los cambios en la turgencia celular, de la textura del fruto y los genes que codifican a las enzimas responsables de estos cambios. Estos últimos han sido objeto de manipulación genética en el fruto, con el objetivo de extender la vida de anaquel (Vicente *et al.*, 2007; Goulao y Oliveira, 2007; Matas *et al.*, 2009). El metabolismo de la pared celular durante la maduración del fruto es un proceso muy complejo, que incluye más de 50 genes relacionados con la estructura de la pared celular (Tomato Genome Consortium, 2012).

El ablandamiento de la fruta es un cambio importante en la textura de frutos climatéricos debido a la hemicelulosa de la pared celular y a la solubilización y despolimerización de la pectina por varias hidrolasas (Rose *et al.*, 2004).

La enzima poligalacturonasa (PG) sólo se expresa en tejidos del fruto maduro y su transcripción se activa únicamente durante la maduración (Omboki *et al.*, 2015). Diferentes regiones de la región del promotor PG interactúan positiva y negativamente con los elementos que median la expresión del gen que la codifica (Omboki *et al.*, 2015). Se cree que la PG desempeña un papel clave en el ablandamiento del fruto, aunque estudios transgénicos han indicado que la PG no es la única enzima responsable (Giovannoni *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1990).

Además de la PG, que elimina los residuos de galactosil de la pectina (Atkinson *et al.*, 1998), un conjunto de enzimas modificadoras de la pared celular también participan en la maduración y los genes que las codifican se han aislado a partir de algunas especies, pero principalmente del tomate: la  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa elimina el arabinosil y algunos otros residuos de la pectina (Sozzi *et al.*, 2002; Itai *et al.*, 2003); la ramnogalacturonasa

(RG) A hidroliza los enlaces  $\alpha$ -1,2 entre los residuos de galacturonosil y ramnosil en la pectina (Wong, 2008); la xiloglucano /endotransglucosilasa/hidrolasa hidroliza o transglicosolata xiloglucano (Saladié *et al.*, 2007); las glicosidasas ( $\beta$ -galactosidasa) eliminan los residuos de galactosilo de la pectina y el xiloglucano (Smith *et al.*, 2002); las mananasas hidrolizan al azar el enlace  $\beta$  de las cadenas principales de manano que constituyen parte de los glicanos de hemicelulosa (Rodríguez-Gacio *et al.*, 2012); las pectato liasas (PL) catalizan la escisión eliminadora de pectina desesterificada (Marín-Rodríguez *et al.*, 2002); las pectinmetilesterasas (PME) degradan poliurónidos metilesterificados (Wakabayashi *et al.*, 2003) y las expansinas interrumpen los enlaces de hidrógeno entre las microfibrillas de celulosa y glicanos entrecruzados (Rose *et al.*, 1997; Brummell *et al.*, 1999b). La contribución exacta que cada enzima presta para el ablandamiento del fruto sigue siendo poco clara debido al hecho de que los mecanismos debajo de la pared celular mediados por los cambios de textura son complejos.

Tomando al tomate como modelo, se han aislado algunos genes potencialmente relacionados con la degradación de la pared celular (Bouzayen *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha mostrado que la supresión de los genes candidatos, como aquellos que codifican para PG, PME y  $\beta$ -glucanasa, no tienen gran impacto en la evolución de la firmeza del fruto (Giovannoni *et al.*, 1989; Tieman *et al.*, 1992; Brummell *et al.*, 1999a).

Dentro de la familia de genes que degradan la pared celular de frutos climatéricos, algunos miembros son regulados por el etileno, mientras que otros no, lo que confirma la coexistencia de procesos dependientes e independientes de etileno (Flores *et al.*, 2001; Nishiyama *et al.*, 2007). En general, parece que el ablandamiento del fruto involucra a muchos genes que codifican una variedad de enzimas que degradan la pared celular y proteínas no enzimáticas. Cada proteína podría jugar un papel específico en el ablandamiento y en los cambios de textura (Bouzayen *et al.*, 2010).

El desmontaje de la matriz de polisacáridos de la pared celular relacionado con la maduración, es generalmente el único factor que se menciona al describir la base estructural del ablandamiento del fruto y la pérdida asociada con la vida útil y la calidad del fruto, aunque hay otros (Matas *et al.*, 2009). Sin embargo, estudios recientes han comenzado a examinar la implicación potencial y la importancia relativa de otras estructuras y procesos fisiológicos. Por ejemplo, se ha propuesto que las diferencias en la estructura y la composición de la cutícula del fruto de tomate pueden estar asociados con la variación sustancial de la vida de anaquel del fruto que se ha reportado en diferentes

genotipos (Saladié *et al.*, 2007). La cutícula cumple funciones biológicas de impacto en la calidad y la vida de anaquel de frutos, incluyendo la capacidad de mantener la integridad de la piel (Hovav *et al.*, 2007), controlar la transpiración cuticular (Leide *et al.*, 2007) y limitar la infección microbiana. Además, juega un papel en la interacción planta-insecto como componente de la traducción de señales para la activación de genes específicos, controlando los cambios de temperatura y proporcionando soporte mecánico (Tafolla-Arellano *et al.*, 2013). Otros reportes han resaltado los procesos relacionados con la maduración que probablemente contribuyen a la firmeza del fruto, como la presión de turgencia (Saladié *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2008).

## **2.8. Conclusiones y perspectivas**

A pesar del avance en el estudio de los mecanismos de la maduración de los frutos, aún quedan sin responder un gran número de interrogantes, como la relación entre la síntesis de etileno y la expresión diferencial de genes relacionados con la producción de compuestos volátiles, con el cambio de color, pero más aún, con los que codifican a las enzimas relacionadas con el ablandamiento.

Los factores de transcripción han mostrado tener una gran importancia, no sólo durante el desarrollo temprano, sino también en el control regulatorio de la maduración y la senescencia; aunque hay avances en la identificación de estos reguladores, aún queda mucho por investigar.

El ablandamiento del fruto es el proceso que se da como resultado de la hidrólisis de los diversos componentes de la pared celular que incluyen celulosa, hemicelulosa, pectina y proteínas. La hidrólisis de estos componentes se produce por la acción de PG, PME, PL, RG, endo-1,4- $\beta$ -D-glucanasa (EGasa) y  $\beta$ -galactosidasa. El papel de estas enzimas ha sido ampliamente confirmado mediante la aplicación de técnicas moleculares que implican sobreexpresar y disminuir la actividad enzimática conocida; es decir, alteración en el proceso de hidrólisis.

En un futuro próximo, será posible controlar la maduración de los frutos y alargar su vida de anaquel manipulando la producción de etileno utilizando un enfoque transgénico.

## 2.9. Literatura Citada

- Alba, R., Payton, P., Fei, Z., McQuinn, R., Debbie, P., Martin, G. B. y Giovannoni, J. J. 2005. Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. *The Plant Cell*. 17(11):2954-2965.
- Alexander, L. y Grierson, D. 2002. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*. 53:2039-2055.
- Argueso, C. T., Hansen, M. y Kieber, J. J. 2007. Regulation of ethylene biosynthesis. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2(26):92-105.
- Atkinson, R. G., Bolitho, K. M., Wright, M. A., Iturriagagoitia-Bueno, T., Reid, S. J. y Ross, G. S. 1998. Apple ACC-oxidase and polygalacturonase: ripening-specific gene expression and promoter analysis in transgenic tomato. *Plant Molecular Biology*. 38:449-460.
- Bao, F., Azhakanandam, S. y Franks, R. G. 2010. SEUSS and SEUSS-LIKE transcriptional adaptors regulate floral and embryonic development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 152:821-836.
- Barry, C. S., Llop-Tous, M. I. y Grierson, D. 2000. The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato. *Plant Physiology*. 123:979-986.
- Bauchot, A. D., Mottram, D. S., Dodson, A. T., y John, P. 1998. Effect of aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase antisense gene on the formation of volatile esters in cantaloupe *Charentais melon* (cv. Vedrandais). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46(11):4787-4792.
- Bemer, M., Karlova, R., Ballester, A. R., Tikunov, Y. M., Bovy, A. G., Wolters-Arts, M., Rossetto, P de B., Angenent, G. C. y de Maagd, R. A. 2012. The tomato FRUITFULL homologs TDR4/FUL1 and MBP7/FUL2 regulate ethylene-independent aspects of fruit ripening. *The Plant Cell*. 24(11):4437-4451.

- Bouzayen, M.; Latché, A.; Nath, P. y Pech, J. C. 2010. Mechanism of fruit ripening. En: *Plant Developmental Biology-Biotechnological Perspectives*, vol. 1. Pua, E.C. y Davey, M.R. (eds.). Springer-Verlag. Berlin, Germany. 319-339 pp.
- Brummell, D. A., Hall, B. D. y Bennett, A. B. 1999a. Antisense suppression of tomato endo-1, 4- $\beta$ -glucanase Cel2 mRNA accumulation increases the force required to break fruit abscission zones but does not affect fruit softening. *Plant Molecular Biology*. 40(4):615-622.
- Brummell, D. A., Harpster, M. H., Civello, P. M., Palys, J. M., Bennett, A. B. y Dunsmuir, P. 1999b. Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *The Plant Cell*. 11(11):2203-2216.
- Brummell, D. A. y Harpster, M. H. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. En: *Plant Cell Walls*. Carpita, N. C., Campbell, M. y Tierney, M. (eds.). 1a ed. Springer Science. Netherlands. 311-340 pp.
- Cara, B. y Giovannoni, J. J. 2008 Molecular biology of ethylene during tomato fruit development and maturation. *Plant Science*. 175:106-113.
- Cherian, S., Figueroa, C. R. y Nair, H. 2014. 'Movers and shakers' in the regulation of fruit ripening: a cross-dissection of climacteric versus non-climacteric fruit. *Journal of Experimental Botany*. eru280.
- Chung, M. Y., Vrebalov, J., Alba, R., Lee, J., McQuinn, R., Chung, J. D. y Giovannoni, J. 2010. A tomato (*Solanum lycopersicum*) APETALA2/ERF gene, SlAP2a, is a negative regulator of fruit ripening. *The Plant Journal*. 64(6):936-947.
- Ciardi, J. y Klee, H. 2001. Regulation of ethylene-mediated responses at the level of the receptor. *Annals of Botany*. 88(5):813-822.
- Dandekari, A. M., Teo, G., Defilippi, B. G., Uratsu, S. L., Passey, A. J., Kader, A. A., Stow, J.R., Colgan, R.J. y James, D. J. 2004. Effect of down-regulation of ethylene biosynthesis on fruit flavor complex in apple fruit. *Transgenic Research*. 13(4):373-384.

- Darley, C. P., Forrester, A. M. y McQueen-Mason, S. J. 2001. The molecular basis of plant cell wall extension. *In: Plant Cell Walls*. Carpita, N. C., Campbell, M. y Tierney, M. (eds.). 1a ed. Springer Science. Netherlands. 179-195 pp.
- Dos Santos, R. S., Arge, L. W. P., Costa, S. I., Machado, N. D., de Mello-Farias, P. C., Rombaldi, C. V. y de Oliveira, A. C. 2015. Genetic regulation and the impact of omics in fruit ripening. *Plant Omics*. 8(2):78-88.
- Flores, F., Ben Amor, M., Jones, B., Pech, J. C., Bouzayen, M., Latché, A. y Romojaro, F. 2001. The use of ethylene-suppressed lines to assess differential sensitivity to ethylene of the various ripening pathways in Cantaloupe melons. *Physiologia Plantarum*. 113:128–133.
- Gapper, N. E., Giovannoni, J. J. y Watkins, C. B. 2014. Understanding development and ripening of fruit crops in an ‘omics’ era. *Horticulture Research*. 1.
- Gapper, N. E., McQuinn, R. P. y Giovannoni, J. J. 2013. Molecular and genetic regulation of fruit ripening. *Plant Molecular Biology*. 82(6):575-591.
- Giovannoni J. J. 2001. Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annual Review of Plant Physiology*. 52:725-749.
- Giovannoni, J. J. 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell*. 16(suppl 1):S170-S180.
- Giovannoni, J. J. 2007. Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Current Opinion in Plant Biology*. 10(3):283-289.
- Giovannoni, J. J., DellaPenna, D., Bennett, A. B. y Fischer, R. L. 1989. Expression of a chimeric polygalacturonase gene in transgenic rin (ripening inhibitor) tomato fruit results in polyuronide degradation but not fruit softening. *The Plant Cell*. 1(1):53-63.
- Goulao, L. F., Santos, J., de Sousa, I. y Oliveira, C. M. 2007. Patterns of enzymatic activity of cell wall-modifying enzymes during growth and ripening of apples. *Postharvest Biology and Technology*. 43(3):307-318.
- Grierson, D. 2013. Ethylene and the control of fruit ripening. *In: Seymour, G. B., Poole, M., Giovannoni, J. J. y Tucker, G. A. (eds).* 1a ed. *The Molecular Biology and Biochemistry of Fruit Ripening*. Blackwell Publishing Ltd. Ames, IA, USA. 43-73 pp.

- Hovav, R., Chehanovsky, N., Moy, M., Jetter, R. y Schaffer, A. A. 2007. The identification of a gene (Cwp1), silenced during *Solanum* evolution, which causes cuticle microfissuring and dehydration when expressed in tomato fruit. *The Plant Journal*. 52(4):627-639.
- Iannetta, P. P., Laarhoven, L. J., Medina-Escobar, N., James, E. K., McManus, M. T., Davies, H. V. y Harren, F. J. 2006. Ethylene and carbon dioxide production by developing strawberries show a correlative pattern that is indicative of ripening climacteric fruit. *Physiologia Plantarum*. 127(2):247-259.
- Iqbal, N., Khan, N. A., Ferrante, A., Trivellini, A., Francini, A. y Khan, M. I. R. 2017. Ethylene Role in Plant Growth, Development and Senescence: Interaction with Other Phytohormones. *Frontiers in Plant Science*. 8.
- Itai, A., Ishihara, K. y Bewley, J. D. 2003. Characterization of expression, and cloning, of beta-D-xylosidase and alpha-L-arabinofuranosidase in developing and ripening tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit. *Journal of Experimental Botany*. 54:2615–2622.
- Itkin, M., Seybold, H., Breitel, D., Rogachev, I., Meir, S. y Aharoni, A. 2009. TOMATO AGAMOUS-LIKE 1 is a component of the fruit ripening regulatory network. *The Plant Journal*. 60(6):1081-1095.
- Jiménez-Bermúdez, S., Redondo-Nevado, J., Muñoz-Blanco, J., Caballero, J. L., López-Aranda, J. M., Valpuesta, V., Pliego-Alfaro, F., Quesada, M. A. y Mercado, J. A. 2002. Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. *Plant Physiology*. 128:751–759.
- Karlova, R., Chapman, N., David, K., Angenent, G. C., Seymour, G. B. y de Maagd, R. A. 2014. Transcriptional control of fleshy fruit development and ripening. *Journal of Experimental Botany*. 65(16):4527-4541.
- Karlova, R., Rosin, F. M., Busscher-Lange, J., Parapunova, V., Do, P. T., Fernie, A. R., Fraser, P.D., Baxter, C., Angenent, G. C. y de Maagd, R. A. 2011. Transcriptome and metabolite profiling show that APETALA2a is a major regulator of tomato fruit ripening. *The Plant Cell Online*. 23(3):923-941.
- Klee, H. J. y Giovannoni, J. J. 2011. Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. *Annual Review of Genetics*. 45:41-59.

- Kumar, R., Khurana, A., y Sharma, A. K. 2014 Role of plant hormones and their interplay in development and ripening of fleshy fruits. *Journal of Experimental Botany*. 65:4561-4575.
- Lashbrook, C., Tieman, D. y Klee, H. 1998. Differential regulation of the tomato ETR gene family throughout plant development. *Plant Journal*. 15:243–252.
- Lee, J. M., Joung, J. G., McQuinn, R., Chung, M. Y., Fei, Z., Tieman, D., Klee, H. y Giovannoni, J. 2012. Combined transcriptome, genetic diversity and metabolite profiling in tomato fruit reveals that the ethylene response factor SIERF6 plays an important role in ripening and carotenoid accumulation. *The Plant Journal*. 70(2):191-204.
- Leide, J., Hildebrandt, U., Reussing, K., Riederer, M., y Vogg, G. 2007. The developmental pattern of tomato fruit wax accumulation and its impact on cuticular transpiration barrier properties: effects of a deficiency in a  $\beta$ -ketoacyl-coenzyme A synthase (LeCER6). *Plant Physiology*. 144(3):1667-1679.
- Lelièvre, J. M., Latché, A., Jones, B., Bouzayen, M. y Pech, J.C. 1997. Ethylene and fruit ripening. *Physiologia Plantarum*. 101:727–739.
- Lin, Z., Hong, Y., Yin, M., Li, C., Zhang, K. y Grierson, D. 2008. A tomato HD-Zip homeobox protein, LeHB-1, plays an important role in floral organogenesis and ripening. *The Plant Journal*. 55(2):301-310.
- Lincoln, J. E. y Fischer, R. L. 1988. Diverse mechanisms for the regulation of ethylene-inducible gene expression. *Molecular and General Genetics MGG*. 212(1):71-75.
- Liu, C., Zhao, A., Zhu, P., Li, J., Han, L., Wang, X., Fan, W., Lü, R., Wang, C., Li, Z., Lu, C. y Lu, C. 2015. Characterization and expression of genes involved in the ethylene biosynthesis and signal transduction during ripening of mulberry fruit. *PloS one*, 10(3), e0122081.
- Llop-Tous, I., Barry, C. S. y Grierson, D. 2000. Regulation of ethylene biosynthesis in response to pollination in tomato flowers. *Plant Physiology*. 123(3):971-978.
- Manning, K., Tor, M., Poole, M., Hong, Y., Thompson, A. J., King, G. J., Giovannoni, J. J. y Seymour, G. B. 2006. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene

- encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nature Genetics*. 38(8):948-952.
- Marín-Rodríguez, M. C., Orchard, J. y Seymour, G. B. 2002. Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *Journal of Experimental Botany*. 53:2115–2119.
- Matas, A. J., Gapper, N. E., Chung, M. Y., Giovannoni, J. J. y Rose, J. K. 2009. Biology and genetic engineering of fruit maturation for enhanced quality and shelf-life. *Current Opinion in Biotechnology*. 20(2):197-203.
- McAtee, P., Karim, S., Schaffer, R. y David, K. 2013. A dynamic interplay between phytohormones is required for fruit development, maturation, and ripening. *Frontiers in Plant Science*. 4:79.
- Nishiyama, K., Guis, M., Rose, J. K., Kubo, Y., Bennett, K. A., Wangjin, L., Kato, K., Koichiro, U., Nakano, R., Inaba, A., Bouzayen, M., Latché, A., Pech, J. C. y Bennett, A. B. 2007. Ethylene regulation of fruit softening and cell wall disassembly in Charentais melon. *Journal of Experimental Botany*. 58(6):1281-1290.
- Omboki, R. B.; Wu, W.; Xie, X. y Mamadou, G. 2015. Ripening Genetics of the Tomato Fruit. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*. 8(4):567-572.
- Pan, Y., Bradley, G., Pyke, K., Ball, G., Lu, C., Fray, R., Marshall, A., Jayasuta, S., Baxter, C., van Wijk, R., Boyden, L., Cade, R., Chapman, N. H., Fraser, P. D., Hodgman, C. y Seymour, G. B. 2013. Network inference analysis identifies an APRR2-like gene linked to pigment accumulation in tomato and pepper fruits. *Plant Physiology*. 161(3):1476-1485.
- Payton, S., Fray, R. G., Brown, S. y Grierson, D. 1996. Ethylene receptor expression is regulated during fruit ripening, flower senescence and abscission. *Plant Molecular Biology*. 31(6):1227-1231.
- Pech, J. C., Purgatto, E., Girardi, C. L., Rombaldi, C. V. y Latché, A. 2013. Current challenges in postharvest biology of fruit ripening. *Current Agricultural Science and Technology*, 19(1-18).

- Pech, J. C., Purgatto, E., Latché, A. y Bouzayen, M. 2012. Ethylene and fruit ripening. *In: The Plant Hormone Ethylene, Annual Plant Reviews*. McManus, M. T. (Ed.). 1a ed. Blackwell Publishing. Oxford, UK. 44:275-304.
- Pegoraro, C., Zanuzo, M. R., Chaves, F. C., Brackmann, A., Girardi, C. L., Lucchetta, L., Nora, L., Silva, J. A. y Rombaldi, C. V. 2010. Physiological and molecular changes associated with prevention of woolliness in peach following pre-harvest application of gibberellic acid. *Postharvest Biology and Technology*. 57(1):19-26.
- Perkins-Veazie, P. M., Huber, D. J. y Brecht, J. K. 1996. In vitro growth and ripening of strawberry fruit in the presence of ACC, STS or propylene. *Annals of Applied Biology*. 128(1):105-116.
- Rodríguez-Gacio, M. C., Iglesias-Fernández, R., Carbonero, P. y Matilla, A. J. 2012. Softening-upmannan-rich cellwalls. *Journal of Experimental Botany*. 63:3976–3988.
- Rose, J. K., Lee, H. H. y Bennett, A. B. 1997. Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 94:5955–5960.
- Saladié, M., Matas, A. J., Isaacson, T., Jenks, M. A., Goodwin, S. M., Niklas, K. J., Xiaolin, R., Labavitch, J. M., Shackel, K. A., Fernie, A. R., Lytovchenko, A., O'Neill, M. A., Watkins, C. B. y Rose, J. K. 2007. A reevaluation of the key factors that influence tomato fruit softening and integrity. *Plant Physiology*. 144:1012–1028.
- Seymour, G. B., Manning, K., Eriksson, E. M., Popovich, A. H. y King, G. J. 2002. Genetic identification and genomic organization of factors affecting fruit texture. *Journal of Experimental Botany*. 53:2065-2071.
- Seymour, G. B., Ostergaard, L., Chapman, N. H., Knapp, S. y Martin, C. 2013. Fruit development and ripening. *Annual Review of Plant Biology*. 64:219-241.
- Smith, C. J. S., Watson, C. F., Bird, C. R., Ray, J., Schuch, W., y Grierson, D. (1990). Expression of a truncated tomato polygalacturonase gene inhibits expression of the endogenous gene in transgenic plants. *Molecular and General Genetics MGG*, 224(3), 477-481.

- Smith, D. L., Abbott, J. A. y Gross, K. C. 2002. Down-regulation of tomato beta-galactosidase 4 results in decreased fruit softening. *Plant Physiology*. 129:1755–1762.
- Sozzi, G. O., Greve, L. C., Prody, G. A. y Labavitch, J. M. 2002. Gibberellic acid, synthetic auxins, and ethylene differentially modulate alpha-L-arabinofuranosidase activities in antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase tomato pericarp discs. *Plant Physiology*. 129:1330–1340.
- Tafolla-Arellano, J. C., González-León, A., Tiznado-Hernández, M. E., Zacarías García, L. y Báez-Sañudo, R. 2013. Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en plantas. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 36(1):3-12.
- Tatsuki, M., Haji, T. y Yamaguchi, M. 2006. The involvement of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase isogene, Pp-ACS1, in peach fruit softening. *Journal of Experimental Botany*. 57:1281-1289.
- Tieman, D. M., Harriman, R. W., Ramamohan, G. y Handa, A. K. 1992. An antisense pectin methylesterase gene alters pectin chemistry and soluble solids in tomato fruit. *Plant Cell*. 4:667–669.
- Tieman, D. M. y Klee, H. J. 1999. Differential expression of two novel members of the tomato ethylene-receptor family. *Plant Physiology*. 120(1):165-172.
- Thomas, T. R., Shackel, K. A. y Matthews, M. A. 2008. Mesocarp cell turgor in *Vitis vinifera* L. berries throughout development and its relation to firmness, growth, and the onset of ripening. *Planta*. 228(6):1067-1076.
- Van-der-Hoeven, R., Ronning, C., Giovannoni, J., Martin, G. y Tanksley, S. 2002. Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. *Plant Cell*. 14:1441-1456.
- Vicente, A. R., Saladié, M., Rose, J., Labavitch, K. C. y John, M. 2007. The linkage between cell wall metabolism and fruit softening: looking to the future. *Journal of the Science Food Agriculture*. 87:1435-1448.
- Vrebalov, J., Ruezinsky, D., Padmanabhan, V., White, R., Medrano, D., Drake, R., Schuch, W., y Giovannoni, J. 2002. A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (*rin*) locus. *Science*. 296:343–346.

- Wakabayashi, K., Hoson, T. y Huber, D. J. 2003. Methyl de-esterification as a major factor regulating the extent of pectin depolymerization during fruit ripening: a comparison of the action of avocado (*Persea americana*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) polygalacturonases. *Journal of Plant Physiology*. 160(6):667-673.
- Wilkinson, J., Lanahan, M., Yen, H.-C., Giovannoni, J. y Klee, H. 1995. An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by Never-ripe. *Science*. 270:1807–1809.
- Wong, D. 2008. Enzymatic deconstruction of backbone structures of the ramified regions in pectins. *Protein Journal*. 27:30–42.
- Yamamoto, M., Miki, T., Ishiki, Y., Fujinami, K., Yanagisawa, Y., Nakagawa, H., Ogura, N., Hirabayashi, T. y Sato, T. 1995. The synthesis of ethylene in melon fruit during the early stage of ripening. *Plant and Cell Physiology*. 36(4):591-596.
- Yen, H. C., Lee, S., Tanksley, S., Lanahan, M., Klee, H. y Giovannoni, J. 1995. The tomato never-ripe locus regulates ethylene-inducible gene expression and is linked to a homolog of the Arabidopsis ETR1 gene. *Plant Physiology*. 107:1343–1353.
- Zhong, S., Fei, Z., Chen, Y. R., Zheng, Y., Huang, M., Vrebalov, J., Mcquinn, R., Gapper, N., Liu, B., Xiang, J., Shao y Giovannoni, J. J. 2013. Single-base resolution methylomes of tomato fruit development reveal epigenome modifications associated with ripening. *Nature Biotechnology*. 31(2):154-159.
- Zhou, D., Kalaitzis, P., Mattoo, A. K. y Tucker, M. L. 1996. The mRNA for an ETR1 homologue in tomato is constitutively expressed in vegetative and reproductive tissues. *Plant Molecular Biology*. 30(6):1331-1338.

## CAPÍTULO III

### CONSTRUCCIÓN DE GENOTECAS DE cDNA DE GUANÁBANA (*Annona muricata* L.) PARA ESTUDIAR EL PROCESO DE MADURACIÓN BAJO DOS TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO POR RNA-SEQ

Mónica Elizabeth Martínez-González<sup>1</sup>, Rosendo Balois-Morales<sup>2\*</sup>, Moisés Cortés-Cruz<sup>3</sup>, Yolotzin Apatzingan Palomino-Hermosillo<sup>2</sup>,

<sup>1</sup>Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias, Universidad Autónoma de Nayarit. Ciudad de la cultura “Amado Nervo”. C.P. 63155. Tepic, Nayarit, México (mc.monica.martínez@gmail.com). <sup>2</sup>Universidad Autónoma de Nayarit, Unidad de Tecnología de Alimentos. Ciudad de la cultura “Amado Nervo” s/n. C.P. 63155. Tepic, Nayarit, México. (balois\_uanayar@hotmail.com\*, pasingan@gmail.com). <sup>3</sup>Centro Nacional de Recursos Genéticos. INIFAP. Blvd. de la Biodiversidad No. 400. C.P. 47600. Tepatitlán, Jalisco, México. (cortes.moises@inifap.gob.mx).

#### 3.1. Resumen

La guanábana (*Annona muricata* L.) es un fruto con gran importancia económica en el estado de Nayarit. Se caracteriza por presentar un aumento significativo de acidez total titulable (ATT), de sólidos solubles totales (STT) durante su maduración, así como por su rápido ablandamiento. La refrigeración es el proceso de conservación más importante utilizado para mantener la calidad postcosecha de los frutos y retardar el ablandamiento; sin embargo, los frutos de guanábana son altamente susceptibles a daños por frío debido a las bajas temperaturas. Actualmente no existe un genoma de referencia para el fruto de guanábana, sin embargo, recientemente se ha publicado el transcriptoma de hoja de guanábana, pero sus secuencias aún no han sido anotadas. En el presente estudio, se realizaron genotecas de cDNA de frutos almacenados tanto a temperatura ambiente (TA) como a 15 °C (T15) para que, en una etapa posterior, se pueda realizar el análisis transcriptómico comparativo de tres estados de madurez (0, 3 y 6 días después de la cosecha bajo ambos tratamientos). En el presente capítulo se describe la metodología para la generación de las genotecas. Primeramente, se estandarizó la técnica de extracción de RNA de la cual se obtuvo un buen rendimiento. La pureza fue verificada mediante espectrofotometría y visualizando las bandas ribosomales por electroforesis. Estos

parámetros indicaron que el RNA obtenido fue de buena calidad y libre de los efectos de RNAsas. Además, se evaluó la integridad calculando el RIN (RNA Integrity Number); los valores de RIN obtenidos en las 24 genotecas fueron superiores a 7.0, lo que confirmó que las genotecas cumplieron los requerimientos para ser empeladas en el proceso de desarrollo de genotecas y su eventual secuenciación. De las genotecas realizadas, se seleccionaron 18, las cuales se enviaron a secuenciar en una plataforma NextSeq. Los resultados a obtenerse con estas genotecas serán analizados en un trabajo posterior para identificar los genes candidatos involucrados en el proceso de maduración del fruto de guanábana y su posterior validación.

**Palabras clave:** transcriptoma, guanábana, maduración, ablandamiento, RNA-Seq

### **3.2 .Abstract**

Soursop (*Annona muricata* L.) is an economically important fruit in the state of Nayarit. A significant increase in total soluble solids (TSS) and total titratable acidity (TTA) as well as rapid softening during ripening are the main characteristics of soursop. Refrigeration is the most important conservation process used to preserve the postharvest fruit quality and delay softening, however, soursop fruits are highly susceptible to damage due to low temperatures (chill injury). The soursop genome sequence is not available yet; however, recently the leaf transcriptome was published but is not annotated yet. In the present study, cDNA libraries from fruits stored at room temperature (RT) and at 15 °C (T15) were generated to perform the comparative transcriptomic analysis of three maturity stages in a later phase (0, 3 and 6 days after harvest under both treatments). In this chapter, we describe the First, we standardized a RNA extraction method from which we obtained a high yield. To assess RNA purity, the ratios of absorbance at 260/280 and 260/230 were calculated and the ribosomal bands were visualized by electrophoresis. These parameters showed that RNA was pure and was not degraded. Additionally, RNA integrity was evaluated by calculating the RNA Integrity Number (RIN); RIN values of the 24 libraries were greater than 7.0, confirming that libraries fulfilled the requirements to perform sequencing. From all the libraries, 18 were selected and sent for sequencing on a NextSeq platform. Results obtained will be analyzed in a further study to perform the transcriptomic analysis by bioinformatics and the subsequent validation of the candidate genes.

**Key words:** transcriptome, soursop, fruit ripening, softening, RNA-Seq

### 3.3 Introducción

La guanábana (*Annona muricata* L.) pertenece al género *Annona* y a la familia Annonaceae. En México se cultiva extensivamente, aproximadamente 76 % de la producción se encuentra en el estado de Nayarit (SIAP, 2017). El sabor del fruto de guanábana es el resultado de la combinación de azúcares y ácidos orgánicos (del 0.65 al 0.85 %) (Jiménez-Zurita *et al.*, 2017) Los frutos de guanábana cuando son cosechados y madurados a temperatura ambiente pueden alcanzar la madurez de consumo de 2 a 3 o hasta 7 días, dependiendo de la etapa de maduración en que son cosechados (Paull, 1998; Lima *et al.*, 2003b). En Nayarit, se ha reportado que la vida útil es de entre 4 y 8 días cuando son madurados a TA (Espinosa *et al.*, 2013; Montalvo *et al.*, 2014). Bajo esta condición son altamente perecederos, susceptibles a la pérdida de agua, de nutrientes y al oscurecimiento, lo que afecta significativamente su calidad y valor comercial. Para alargar su vida de anaquel, se utiliza la refrigeración, que es una tecnología importante para mantener la calidad postcosecha y reducir su velocidad de deterioro. Existe poca información acerca de las temperaturas adecuadas de refrigeración en el fruto de guanábana, sin embargo, se ha reportado que frutos almacenados a 15 °C alcanzaron la madurez de consumo a los 9 días después de la cosecha (Lima *et al.*, 2011). A temperaturas menores de 15 °C se presentan daños por frío (Castillo-Ánimas *et al.*, 2005).

Hasta el momento, no existe información sobre la secuencia del genoma de la guanábana, sin embargo, basándose en el análisis de la cantidad de DNA (valores C) de seis especies de *Annona* spp., se estima que el genoma de la guanábana tiene un tamaño aproximado de 665-1320 Mbp y de 14 a 28 cromosomas (Bennett y Leitch, 2002; Berumen-Varela *et al.*, 2019). En plantas no modelo, de las que la información genómica es limitada, los marcadores de secuencia expresada (ESTs, Expressed Sequence Tags) son una herramienta útil para el descubrimiento de genes, (Asif *et al.*, 2014). La generación a profundidad de conjuntos de datos de ESTs y su comparación, proporcionan información sobre todas las regiones expresadas de un genoma y estos datos pueden ser utilizados para caracterizar patrones de la expresión génica durante la maduración del fruto. Utilizando la tecnología de secuenciación de siguiente generación (NGS, *Next Generation Sequencing*) dichas bases de datos han sido desarrolladas y utilizadas para el descubrimiento y la predicción de genes involucrados en el desarrollo y la maduración de los frutos (Asif *et al.*, 2014). La NGS permite un análisis del RNA a través de la

secuenciación de DNA complementario (cDNA) (Wang *et al.*, 2009). Este método, denominado RNA sequencing (RNA-Seq) proporciona una vista más detallada y cuantitativa de diversos procesos como la expresión génica y el *splicing* alternativo, entre otros. Los avances de la RNA-Seq han permitido un análisis profundo del transcriptoma y la oportunidad de dilucidar diferentes condiciones fisiológicas y patológicas (Kukurba y Montgomery, 2015). En plantas, el análisis de los patrones de expresión de su conjunto de genes (transcriptómica de la planta) ha contribuido al conocimiento en áreas clave como el desarrollo y la maduración del fruto, así como en la respuesta a diferentes tipos de estrés en plantas con interés agronómico (Rai y Shekhawat, 2015; Simsek *et al.*, 2017). En años recientes se formó un consorcio internacional multidisciplinario que generó el transcriptoma de 1000 especies de plantas (Matasci *et al.*, 2014). Dentro de este proyecto, el transcriptoma de hoja de *A. muricata* fue secuenciado. El ensamble del transcriptoma *de novo* reveló 92,924 transcritos con una longitud total del ensamblaje de 51.12 Mbp (Matasci *et al.*, 2014). Aunque este trabajo representa las primeras secuencias de transcritos generadas en guanábana, las secuencias aún no han sido anotadas (Berumen-Varela *et al.*, 2019). Sin embargo, este esfuerzo es un avance importante en la investigación de este cultivo, que junto con los transcriptomas de *A. squamosa* (Gupta *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016, 2017) representan los únicos datos transcriptómicos disponibles en especies del género *Annona*, (Berumen-Varela *et al.*, 2019).

Existen pocos estudios genómicos en *A. muricata* L. por ello existe una urgente necesidad de generar información que permita comprender los procesos que ocurren durante la maduración en el fruto de guanábana y permitan diseñar nuevas estrategias de manejo postcosecha del fruto. En este trabajo, esperamos observar a nivel molecular que el almacenamiento en frío retarda el ablandamiento sin afectar los parámetros de madurez de consumo. Por ello, el objetivo de esta investigación fue identificar el efecto de la temperatura sobre la expresión de genes vinculados con procesos característicos de la maduración postcosecha en frutos de guanábana, por lo que el presente trabajo proporciona las bases para la comprensión del proceso de maduración de guanábana a nivel molecular.

### **3.4. Materiales y Métodos**

#### **3.4.1. Sitio experimental y material vegetal**

Se cosecharon 50 frutos en madurez fisiológica en Las Varas, municipio de Compostela, Nayarit en octubre de 2016. Los frutos cosechados fueron trasladados inmediatamente al Laboratorio de Análisis Especiales de la Unidad de Tecnología de Alimentos en la Universidad Autónoma de Nayarit; éstos se seleccionaron descartando aquellos con daños mecánicos, físicos y fitopatológicos. Se almacenaron 30 frutos en refrigeración (15 °C, T15) y 20 frutos a temperatura ambiente (28 °C, TA). Los estados de madurez se denominaron D0, D3, D6 y D9 (0, 3, 6 y 9 días después del corte, respectivamente). De ambos tratamientos se tomaron muestras de mesocarpio de 5 frutos al azar cada tres días hasta llegar a la madurez de consumo. El mesocarpio se tomó con un sacabocados de 1 cm de diámetro, haciendo una penetración transversal en la parte central del fruto, atravesándolo por completo. El cilindro obtenido se fraccionó en pequeños discos de aproximadamente 1 cm de altura, los que fueron depositados en tubos cónicos para centrífuga Falcon de 15 ml, estériles y libres de DNAsas y RNAsas. Se agregaron 5 ml de RNAlater (Sigma), inmediatamente se congeló cada tubo en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

#### **3.4.2 Extracción de RNA total**

El RNA total fue extraído de frutos en madurez fisiológica (D0), intermedia (D3) y de consumo (D6 y D9) con el Spectrum Plant Total RNA kit (SIGMA) a partir de 75 mg de tejido, siguiendo las instrucciones del fabricante.

El RNA total fue cuantificado en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo-Fisher Scientific) y un fluorómetro Qubit 2.0. Se verificó su calidad espectrofotométricamente calculando los ratios de absorbancia 260/280 y 260/230. La pureza se inspeccionó visualizando las bandas ribosomales por electroforesis geles de agarosa al 1.5% con 1X TBE teñidos con SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain (Thermo Fisher Scientific). La integridad del RNA se evaluó utilizando el Agilent RNA 6000 Pico Kit en un sistema Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies).

#### **3.4.3 Preparación de genotecas para la secuenciación del transcriptoma**

Las genotecas se prepararon a partir de 1000 ng de RNA total por muestra utilizando el kit NEBNext Ultra RNA Library Prep for Illumina (New England Biolabs) siguiendo las instrucciones del fabricante lo que incluye la adición de índices para otorgar mayor

especificidad de identificación a cada muestra. La construcción de las genotecas es un proceso complejo que incluye las siguientes etapas:

- Obtención de RNA mensajero (mRNA)

Primeramente, se hicieron dos lavados a las perlas magnéticas NEBNext oligo (dT) (5 mg/ml; NebNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module, New England Biolabs) con el 2X RNA Binding buffer incluido en el kit (1M LiCl; 40 mM Tris-HCl pH 7.5; 2mM EDTA; 0.1% Triton X-100). Una vez que las perlas magnéticas se lavaron y resuspendieron en 50  $\mu$ L del mismo buffer, se agregaron los 1000 ng de RNA total resuspendidos en un volumen final de 50  $\mu$ L y esta mezcla se incubó a 65 °C por 5 minutos para desnaturalizar el RNA y facilitar la unión del mRNA poli(A) a las perlas. Después de enfriar y mantener otros 5 minutos a temperatura ambiente, se recuperaron las perlas unidas al mRNA con ayuda del rack magnético y se desechó el sobrenadante, para posteriormente hacer dos lavados con 200  $\mu$ L de 1X Wash buffer (150 mM LiCl; 20 mM Tris-HCl pH 7.5; 1.0 mM EDTA; 0.01% Triton X-100) para remover RNA no unido. Posteriormente, el RNA se eluyó en 50  $\mu$ L de 1X Elution buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5) mezclando vigorosamente con la micropipeta. Las muestras se calentaron a 80 °C por 2 minutos y después se mantuvieron a 25 °C para eluir el mRNA de las perlas. Nuevamente se agregaron 50  $\mu$ L de 2X RNA Binding buffer para permitir que el mRNA se vuelva a unir a las perlas incubando a temperatura ambiente por 5 minutos. Se recuperaron las perlas con ayuda del rack magnético y se hicieron dos lavados con 200  $\mu$ L de 1X Wash buffer. El mRNA se eluyó de las perlas con 15  $\mu$ L de 5X First Strand Synthesis Reaction Buffer y 2X Random Primer mix incubando a 94 °C por 15 minutos para fragmentar el mRNA. Finalmente, el mRNA se recuperó utilizando el rack magnético para atrapar las perlas y transferir 10  $\mu$ L del sobrenadante a un nuevo tubo.

- Obtención y purificación del cDNA de doble cadena

La primera hebra de cDNA se sintetizó agregando 200 U de la transcriptasa inversa M-MuLV ProtoScript® II Reverse Transcriptase, 20 U de la enzima inhibidora de RNasas Murine y agua libre de nucleasas (para un volumen final de 20  $\mu$ L) al mRNA. Se incubó por 10 minutos a 25 °C; 30 minutos a 42 °C; 15 minutos a 72 °C y posteriormente se enfrió a 4 °C.

La segunda cadena de cDNA se sintetizó agregando el 10X Second Strand Synthesis Reaction buffer, el Second Strand Synthesis Enzyme Mix (concentraciones finales 24 U

de DNA Polimerasa I, 20 U RNasa H, 96 U DNA ligasa) en un volumen final de 80  $\mu$ L e incubando por 60 minutos a 16 °C.

El cDNA de doble cadena se purificó utilizando el sistema de perlas AMPure XP (Beckman Coulter), haciendo dos lavados con etanol 80% frío en el rack magnético. Finalmente, se eluyó el cDNA con 60  $\mu$ L de agua libre de nucleasas, se centrifugó por 3 minutos, se colocó el tubo en el rack magnético y se recuperaron 55.5  $\mu$ L del sobrenadante.

- Reparación de los extremos y la cola dA de las genotecas

Los extremos de la doble cadena sintetizada se convirtieron en extremos romos utilizando el End Prep Enzyme Mix que contiene las enzimas T4 polinucleótido quinasa y T4 DNA polimerasa (30 U y 9 U, respectivamente) con el 10X End Repair Reaction Buffer para un volumen final de 65  $\mu$ L. Esta mezcla se incubó por 30 minutos a 20 °C, seguido por otros 30 minutos a 65 °C. En el tiempo de incubación se preparó el adaptador a partir del 10X NEBNext Adaptor para agregarlo inmediatamente después de la adenilación de los extremos 3' de los fragmentos de cDNA. Se ligó el adaptador con Blunt/TA Ligasa (2700 U) con una estructura de bucle en forma de horquilla para preparar la hibridación, incubando por 15 minutos a 20 °C. Luego, se utilizaron 3 U de la enzima USER (New England Biolabs) con el cDNA ligado al adaptador y se incubó a 37 °C durante 15 minutos. La reacción de ligación se purificó con 1X perlas AMPure XP (Beckman Coulter) para seleccionar fragmentos de cDNA de una longitud aproximada de 300 pb primeramente, se realizó una purificación con 1X perlas AMPure XP haciendo lavados con etanol 80% y eluyendo en un volumen final de 23  $\mu$ L.

Finalmente, se realizó una PCR de enriquecimiento con la enzima Q5™ High-Fidelity DNA Polimerasa con la adición de los índices correspondientes asignados a cada muestra, lo cual además de permitir su diferenciación, minimiza la formación de dímeros del adaptador, lo que podría interferir en la secuenciación. Las condiciones de la PCR fueron: desnaturalización inicial a 98 °C por 30 s, 12 ciclos de desnaturalización a 98 °C por 10 s, alineación a 65 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 30 s y una extensión final a 72 °C por 5 minutos. Nuevamente, los productos de PCR se purificaron con 1X perlas AMPure XP. Se evaluó la calidad de las genotecas, así como la distribución por tamaño de los fragmentos obtenidos con un sistema Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante (Agilent High Sensitivity DNA kit guide). Se

hizo una mezcla de las genotecas y se conservaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la secuenciación.

### 3.5. Resultados

#### 3.5.1. Obtención de genotecas de genes expresados diferencialmente (GED)

La calidad del RNA se obtuvo mediante el empleo del equipo Bioanalyzer, el cual genera un valor denominado RNA Integrity Number (RIN) entre 1 y 10, siendo las muestras con mayor valor las de mejor calidad y las que muestran menor degradación. El RIN estima la integridad de la muestra utilizando la electroforesis en gel y un análisis de los radios de las bandas ribosomales 28S a 18S (25S en el caso de plantas). Un RNA de baja calidad (RIN  $<6$ ) puede afectar substancialmente los resultados de la secuenciación lo que llevaría a conclusiones biológicas erróneas (Kukurba y Montgomery, 2015). Por lo tanto, un RNA de alta calidad es esencial para obtener resultados confiables y una RNA-Seq exitosa. Se recomienda que el RIN de las muestras para un análisis RNA-Seq sea  $\geq 7.0$  (Chaitankar *et al.*, 2016).

En la Figura 3.1 se observa la integridad de las bandas de interés correspondientes a 25s y 18s. La definición de estas bandas indicó que las muestras de RNA no presentaron degradación. El análisis de los resultados nos indicó que todas las muestras analizadas tuvieron valores de RIN  $>7$ , lo que demostró que las genotecas cumplieron con los requerimientos para ser secuenciadas.

La concentración y el valor de las lecturas de RIN de las muestras se reportan en el Cuadro 3.1. Además, en el mismo cuadro se presentan la concentración de las librerías obtenidas y el tamaño de los fragmentos. Así mismo, en la Figura 3.2, se observa que el tamaño de los fragmentos obtenidos es cercano a los 300 pb, que era el tamaño esperado.

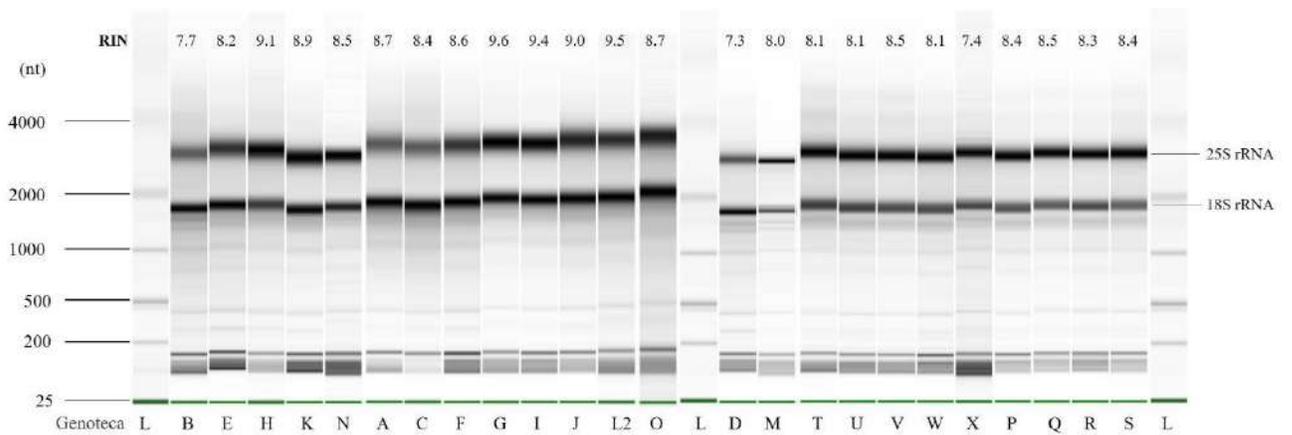
**Cuadro 3.1.** Concentración e integridad de los RNA utilizados para la construcción de genotecas; rendimiento de las genotecas generadas; tamaño de los fragmentos obtenidos y su abundancia.

CONDICIÓN- REPETICIÓN	GENOTECA	RNA RIN	RNA conc (ng/uL)	DNA conc (ng/uL)	Tamaño de fragmento promedio (pb)
<b>D0-1</b>	A	8.7	70.0	2.06	381
<b>D0-2</b>	B	7.7	54.6	3.68	382
<b>D0-3</b>	C	8.4	58.0	3.30	378
<b>D3-1 TA</b>	D	7.3	114.0	0.76	398
<b>D3-2 TA</b>	E	8.2	98.0	1.33	387
<b>D3-4 TA</b>	U	8.1	91.2	0.81	373
<b>D3-1 T15</b>	G	9.6	81.0	6.64	405
<b>D3-2 T15</b>	H	9.1	87.6	6.62	396
<b>D3-3 T15</b>	I	9.4	90.4	6.74	398
<b>D6-1 TA</b>	J	9.0	82.4	3.42	425
<b>D6-2 TA</b>	K	8.9	89.6	1.89	415
<b>D6-3 TA</b>	L2	9.5	90.0	1.83	368
<b>D6-1 T15</b>	M	8.0	50.4	1.23	388
<b>D6-2 T15</b>	N	8.5	37.0	1.46	380
<b>D6-4 T15</b>	X	7.4	75.8	2.52	385
<b>D9-1 T15</b>	P	8.4	116.0	4.48	376
<b>D9-2 T15</b>	Q	8.5	99.8	4.06	410
<b>D9-3 T15</b>	R	8.3	186.0	4.46	383

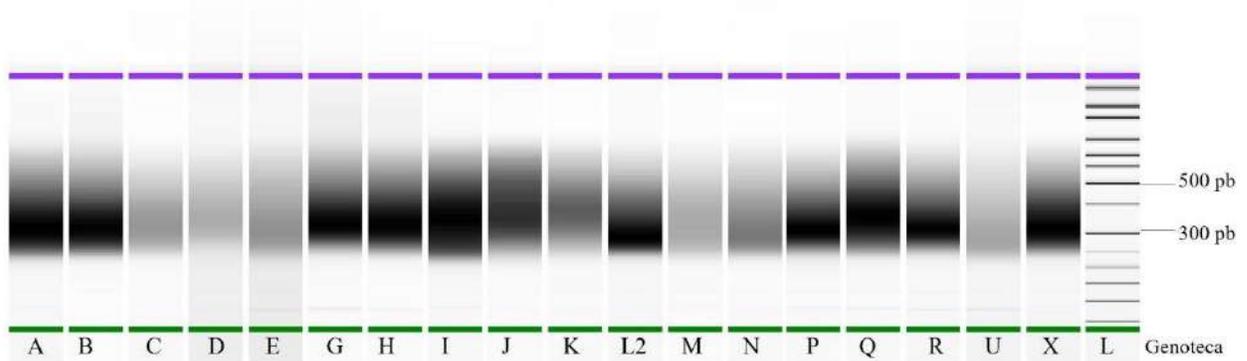
T15= tratamiento a 15 °C

TA= tratamiento a temperatura ambiente

D0, D3, D6, D9 = 0, 3, 6 o 9 días después de la cosecha



**Figura 3.1.** Análisis de integridad de los RNA de mesocarpio de guanábana. En la parte superior se muestra el RIN de cada muestra y en la parte inferior la literal correspondiente a la librería asignada a esa muestra. Las bandas 25S y 18S presentan una clara resolución, lo que indica ausencia o poca degradación. (L=ladder, nt=nucleótidos). Genotecas por tratamiento: D0 (A, B, C); D3-TA (D, E, U); D3-T15 (G, H, I); D6-TA (J, K, L2); D6-T15 (M, N, X); D9-T15 (P, Q, R). T15= tratamiento a 15 °C; TA= tratamiento a temperatura ambiente; D0, D3, D6, D9 = 0, 3, 6 o 9 días después de la cosecha.



**Figura 3.2.** Revisión del tamaño de los fragmentos obtenidos de las genotecas. Los fragmentos de interés tienen un tamaño de entre 300 y 500 pb. (L=ladder). Genotecas por tratamiento: D0 (A, B, C); D3-TA (D, E, U); D3-T15 (G, H, I); D6-TA (J, K, L2); D6-T15 (M, N, X); D9-T15 (P, Q, R). T15= tratamiento a 15 °C; TA= tratamiento a temperatura ambiente; D0, D3, D6, D9 = 0, 3, 6 o 9 días después de la cosecha.

### 3.6. Conclusiones y Perspectivas

Las rutas reguladoras y hormonales durante la maduración del fruto de guanábana no se han estudiado anteriormente, por lo que este estudio proporcionará una primera perspectiva global de las rutas que intervienen en este proceso.

El transcriptoma de la maduración del fruto de guanábana generará información base para la realización de estudios de expresión diferencial de los genes involucrados en este proceso, podrá expandir los recursos genómicos y abrir la oportunidad de identificar genes claves que están asociados a las características de calidad del fruto.

El contar con los datos transcriptómicos del proceso de maduración permitiría estudiar procesos como el metabolismo de la pared celular y la identificación de genes asociados con su degradación, lo que conduce al ablandamiento por la acción de enzimas como las poligalacturonasas, pectatoliasas, expansinas, por mencionar algunas. Asimismo, se tendrá información de los genes que están relacionados a la degradación de clorofila, la acumulación de compuestos aromáticos volátiles relacionados con el olor, y con la síntesis de compuestos relacionados con el sabor, como los ácidos orgánicos. También será posible dilucidar la vía de transducción de señales del etileno durante el proceso de maduración, que permitirá encontrar los genes clave en la cascada de señalización. Otros cambios importantes durante la maduración del fruto son los que ocurren en las rutas del metabolismo del almidón y de la síntesis de azúcares, cambios que podrán ser identificados durante el estudio del transcriptoma.

El análisis transcriptómico de la maduración de los frutos almacenados a T15 podría permitir la identificación de factores de transcripción en respuesta a estrés abiótico, como el estrés por frío y los genes expresados cuando ocurren daños por frío, lo que permitiría desarrollar nuevas herramientas, tratamientos y estrategias para mejorar la tolerancia y prolongar el almacenamiento en frío de los frutos de guanábana. Existen otras oportunidades adicionales, como alargar la vida de anaquel de los frutos, así como mejorar la guanábana como un alimento funcional, por ejemplo, identificando los genes que intervienen en el aumento de los niveles vitamina C durante la maduración a TA. Finalmente, aquellas secuencias que no se alineen con las bases de datos existentes permitirán realizar la anotación funcional de *novel*

*genes*, datos que serán útiles para estudios posteriores y establecer las bases de la maduración del fruto de guanábana.

Hasta donde sabemos, este sería el primer análisis de transcriptoma de la maduración del fruto de guanábana, y nuestros datos serán útiles para poder realizar manipulaciones en este proceso, lo que ayudará a reducir las pérdidas postcosecha. Esto podría impactar en la producción regional al implementar estrategias de manejo postcosecha para aumentar la vida de anaquel y mantener la calidad de los frutos.

### **3.7. Agradecimientos**

Al Laboratorio de ADN y Genómicas del Centro Nacional de Recursos Genéticos del INIFAP, en Tepatitlán, Jalisco, México por facilitar la infraestructura para la construcción de las genotecas. Al Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología/UNAM en Cuernavaca, Morelos, México, por su apoyo con la secuenciación del transcriptoma.

### **3.8. Literatura Citada**

- Asif, M. H., Lakhwani, D., Pathak, S., Gupta, P., Bag, S. K., Nath, P., y Trivedi, P. K. 2014. Transcriptome analysis of ripe and unripe fruit tissue of banana identifies major metabolic networks involved in fruit ripening process. *BMC plant biology*, 14(1), 316.
- Bennett, M., y Leitch, I., 2012. Plant DNA C-Values Database (Release 6.0, Dec. 2012). [www Document]. URL. (Consultado por última vez el 16 de abril de 2019). <http://data.kew.org/cvalues/>.
- Berumen-Varela, G., Hernández-Oñate, M. A., y Tiznado-Hernández, M. E. 2019. Utilization of biotechnological tools in soursop (*Annona muricata* L.). *Scientia Horticulturae*. 245, 269-273.
- Castillo-Ánimas, D., Varela-Hernández, G., Pérez-Salvador, B. R., y Pelayo-Zaldívar, C. 2005. Daños por frío en guanábana. Índice de corte y tratamientos postcosecha. *Revista Chapingo serie Horticultura*. 11: 51-57.

- Chaitankar, V., Karakulah, G., Ratnapriya, R., Giuste, F. O., Brooks, M. J., y Swaroop, A. 2016. Next generation sequencing technology and genomewide data analysis: Perspectives for retinal research. *Progress in retinal and eye research*. 55, 1-31.
- Dautt-Castro, M., Ochoa-Leyva, A., Contreras-Vergara, C. A., Pacheco-Sanchez, M. A., Casas-Flores, S., Sanchez-Flores, A., Kuhn, D. N., e Islas-Osuna, M. A. 2015. Mango (*Mangifera indica* L.) cv. Kent fruit mesocarp *de novo* transcriptome assembly identifies gene families important for ripening. *Frontiers in plant science*. 6, 62.
- Espinosa, I., Ortiz, R. I., Tovar, B., Mata, M. y Montalvo, E. 2013. Physiological and physicochemical behavior of soursop fruits refrigerated with 1-methylcyclopropene. *Journal of Food Quality* 36: 10-20.
- Giovannoni, J. J. Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 2001, 52, 725–749.
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., di Palma, F., Birren, B. W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., Friedman, N., y Chen, Z. 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature biotechnology*. 29(7), 644-652.
- Gupta, Y., Pathak, A. K., Singh, K., Mantri, S. S., Singh, S. P., y Tuli, R. 2015. *De novo* assembly and characterization of transcriptomes of early-stage fruit from two genotypes of *Annona squamosa* L. with contrast in seed number. *BMC genomics*. 16(1), 86.
- Jiménez-Zurita, J. O., Balois-Morales, R., Alia-Tejacal, I., Juárez-López, P., Sumaya-Martínez, M. T., y Bello-Lara, J. E. 2016. Caracterización de frutos de guanabana (*Annona muricata* L.) en Tepic, Nayarit, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(6). 1261-1270
- Jiménez-Zurita, J. O., Balois-Morales, R., Alia-Tejacal, I., Sánchez Herrera, L. M., Jiménez-Ruiz, E. I., Bello-Lara, J. E., García-Paredes, J. D. y Juárez-López, P. 2017.

- Cold Storage of Two Selections of Soursop (*Annona muricata* L.) in Nayarit, Mexico. *Journal of Food Quality*, 2017.
- Kader, A. A. Flavor quality of fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2008, 88, 1863–1868.
- Kukurba, K. R., y Montgomery, S. B. 2015. RNA sequencing and analysis. Cold Spring Harbor protocols.
- Lima, M. A. C., Alves, R. E., y Filgueiras, H. A. C. 2003. Avaliação da Qualidade e da Suscetibilidade ao Escurecimento Oxidativo de Graviola (*Annona muricata* L.) Durante a Maturação Pós-Colheita. In: *Proceeding of the Interamerican Society for Tropical Horticulture*. (Vol. 46, pp. 23-26).
- Lima, M. C. y Alves, R. E. 2011. Soursop (*Annona muricata* L.). In: *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits: Mangosteen to White Sapote* (pp. 363-392e). Woodhead Publishing Limited.
- Liu, K., Feng, S., Pan, Y., Zhong, J., Chen, Y., Yuan, C., y Li, H. 2016. Transcriptome analysis and identification of genes associated with floral transition and flower development in sugar apple (*Annona squamosa* L.). *Frontiers in Plant Science*. 7, 1695.
- Liu, K., Li, H., Li, W., Zhong, J., Chen, Y., Shen, C., y Yuan, C. 2017. Comparative transcriptomic analyses of normal and malformed flowers in sugar apple (*Annona squamosa* L.) to identify the differential expressed genes between normal and malformed flowers. *BMC Plant Biol*. 17, 170.
- Márquez Cardozo, C. J., Villacorta Lozano, V., Yepes Betancur, D. P., Velásquez, C., y Cartagena Valenzuela, J. R. 2012. Physiological and Physico-Chemical Characterization of the Soursop Fruit (*Annona muricata* L. cv. Elita). *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*. 65(1), 6477-6486.
- Matasci, N., Hung, L. H., Yan, Z., Carpenter, E. J., Wickett, N. J., Mirarab, S., Nguyen, N., Warnow, T., Ayyampalayam, S., y Barker, M., 2014. Data access for the 1,000 Plants (1KP) project. *Gigascience* 3, 17.

- Montalvo, E. G., León, A. E., Rea, H., Mata M. de O., M., y Tovar Gómez, B. 2014. Uso combinado de 1-metilciclopropeno y emulsiones de cera en la conservación de guanábana (*Annona muricata*). Revista Brasileira de Fruticultura. 36 (1): 296-306.
- Palma, T., Aguilera, J. M. y Stanley, D. W. 1993. A Review of postharvest events in cherimoya. Postharvest Biology and Technology. 2: 187-208.
- Paull, R. E. 1982. Postharvest variation in composition of soursop (*Annona muricata* L.) fruit in relation to respiration and ethylene production. Journal American Society for Horticultural Science. 107:582-585.
- Paull, R. E. 1998. Soursop. In: Tropical and Subtropical Fruits. Shaw, P. E., H. T Chan, S. Nagy (eds.). AgScience. Auburndale, Florida, USA. pp: 386-400.
- Rai, M. K. y Shekhawat, N., 2015. Genomic resources in fruit plants: an assessment of current status. Critical Reviews in Biotechnology. 35, 438-447.
- Servicio de Información Agrícola y Pesquera (SIAP). 2017. Cierre de la Producción Agrícola. Consultado el 3 de octubre de 2018. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>.
- Simsek, O., Donmez, D., Kacar, Y. A., 2017. RNA-Seq analysis in fruit science: a review. American Journal of Plant Biology. 2, 1-7.
- Wills, R. B. H., Poi, A. y Greenfield, H. 1984. Postharvest changes in fruit composition of *Annona atemoya* during ripening and effects of storage temperature on ripening. HortScience 19(1): 96-97.

## CAPÍTULO IV

### ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA ACIDEZ Y EL ABLANDAMIENTO DE FRUTOS DE GUANABANA (*Annona muricata* L.)

#### ALMACENADOS A DOS TEMPERATURAS POR qPCR

### EXPRESSION ANALYSIS OF ORGANIC ACIDS AND SOFTENING RELATED

#### GENES IN SOURSOP (*Annona muricata* L.) FRUITS STORED UNDER TWO

#### TEMPERATURES USING qPCR

Mónica Elizabeth Martínez-González<sup>1</sup>, Guillermo Berumen-Varela<sup>2</sup>, Rosendo Balois-Morales<sup>2\*</sup>, Yolotzin Apatzingan Palomino-Hermosillo<sup>2</sup>, Gabriela Rosario Peña-Sandoval<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias, Universidad Autónoma de Nayarit. Ciudad de la cultura “Amado Nervo”. C.P. 63155. Tepic, Nayarit, México (mc.monica.martínez@gmail.com). <sup>2</sup>Universidad Autónoma de Nayarit, Unidad de Tecnología de Alimentos. Ciudad de la cultura “Amado Nervo” s/n. C.P. 63155. Tepic, Nayarit, México. (balois\_uanayar@hotmail.com\*, pasingan@gmail.com). <sup>3</sup>Universidad Autónoma de Nayarit, Unidad Académica de Agricultura. Carretera Tepic-Compostela Km. 9. C.P. 63155. Xalisco, Nayarit, México.

#### 4.1. Resumen

La guanábana (*Annona muricata* L.) es un fruto con gran importancia económica en el estado de Nayarit. Se caracteriza por presentar un aumento significativo de ácidos orgánicos durante su maduración, así como por su rápido ablandamiento. Por esta razón, el objetivo de este estudio fue evaluar las diferencias en la expresión de genes involucrados en estos procesos bajo diferentes condiciones de almacenamiento. En frutos de guanábana cosechados en madurez fisiológica en el municipio de Compostela, Nayarit se evaluó el efecto de la temperatura cuando los frutos fueron almacenados a 28 °C o temperatura ambiente (TA) y bajo temperatura de refrigeración a 15 °C (T15) hasta alcanzar la madurez de consumo. Los tres genes evaluados fueron *expansina* (*EXP*), relacionado con el ablandamiento y dos relacionados con el metabolismo de los ácidos málico y cítrico (*malato deshidrogenasa dependiente de NAD* (*NAD-MH*) y *citrato sintasa mitocondrial* (*CSM*), respectivamente).

Asimismo, se evaluaron varios índices de madurez, como firmeza, sólidos solubles totales (SST), acidez total titulable (ATT) y pH, cada tres días después de la cosecha. Los resultados mostraron que los frutos almacenados a ambas temperaturas disminuyeron por lo menos 6 veces su firmeza y el pH disminuyó a menos de 4.0. Además, los SST aumentaron a más de 15 °Brix bajo ambas condiciones de temperatura; y la ATT alcanzó valores de hasta 0.92% (TA) y 0.71% (T15). Por otro lado, el análisis de expresión diferencial mostró que a TA *EXP* se aumenta su expresión continuamente hasta la madurez de consumo y que a T15 la expresión disminuye a la mitad (frutos más firmes a T15, consistente con los valores de firmeza). Los niveles de expresión de *NAD-MH* se elevan a más del doble en ambos tratamientos, observándose a TA mayor nivel de expresión (más ácidos a TA, se correlaciona con los valores de ATT). Sin embargo, *CSM* muestra una disminución de su expresión hasta finales de la maduración bajo ambos tratamientos.

**Palabras clave:** refrigeración, maduración, poscosecha, acidez, expresión diferencial.

#### 4.2. Abstract

Soursop (*Annona muricata* L.) is an economically important fruit in Nayarit. It is characterized by a significant increase in organic acid levels during ripening as well as by rapid softening. For this reason, the aim of our study was to assess differences in the expression of genes involved in these processes under different storage conditions. In soursop fruits harvested at physiological maturation in the municipality of Compostela, Nayarit the effect of temperature was evaluated when the fruits were stored at 28 °C or room temperature (RT) and refrigeration temperature at 15 °C (T15) until ripen stage. The three evaluated genes were one softening-related *expansin* (*EXP*) and two related to malic and citric acid metabolism (*NAD-dependent malate dehydrogenase* (*NAD-MDH*) and *mitochondrial citrate synthase* (*CSM*), respectively). Likewise, different maturity indices such as firmness, total soluble solids (TSS), total titratable acidity (TTA) and pH were evaluated to every three days after harvest. Our results showed that fruits stored at both temperatures showed a 6-fold decrease in firmness and the pH declined to less than 4.0. In addition, TSS increased up to 15° Brix under both temperature conditions; while TTA raised up to 0.92% (RT) and 0.71% (T15). On the other hand, the differential expression analysis showed that the expression of *EXP* was up-regulated under RT and down-regulated to half under T15 conditions (firmer

fruits at T15, consistent with firmness values). The expression levels of *NAD-MH* were up-regulated by 2-fold under both treatments, with a higher level of expression observed at RT (more acid fruits at RT, correlates with TTA values). However, *CSM* was down-regulated throughout ripening under both treatments.

**Key words:** refrigeration, ripening, postharvest, acidity, differential expression.

### 4.3. Introducción

Los eventos relacionados con la maduración en frutos climatéricos como la guanábana, conduce a cambios irreversibles en el desarrollo y fisiológicamente regulados en la expresión génica que a la larga traen cambios coordinados en el color, textura, sabor y aroma de la fruta (Martínez-González *et al.*, 2017). Hay un aumento en las evidencias de que estas alteraciones están regidas por la expresión espacial y temporal de genes que controlan la etapa de maduración de los frutos (Brady, 1987; Brady, 1992; Moore *et al.*, 2002; Giovannoni, 2004; Giovannoni, 2007; Paull *et al.*, 2008; Bapat *et al.*, 2010).

La guanábana tiene una corta vida de anaquel. El método más empleado para retardar su maduración y aumentar su vida postcosecha es el almacenamiento en frío usando temperaturas de los 14° a los 16 °C (Lima y Alves, 2011; Espinosa *et al.*, 2013; Jiménez-Zurita *et al.*, 2017). Hay estudios donde se ha reportado el efecto de la temperatura sobre la maduración (Castillo-Ánimas *et al.*, 2005; Espinosa *et al.*, 2013; Jiménez-Zurita *et al.*, 2017) sin embargo solo abordan las características fisicoquímicas, a nivel molecular no existen estudios al respecto.

Las características organolépticas de los frutos como la firmeza, el color, el aroma, la dulzura y la acidez se ven afectadas por las condiciones de almacenamiento ya que están asociadas con rutas metabólicas específicas que están coordinadas durante el desarrollo y la madurez del fruto (Giovannoni, 2001). El sabor es una de las características más importantes que afectan la calidad del fruto y está mayormente controlado por el nivel y radio de diferentes azúcares y ácidos orgánicos (Kader, 2008); se miden como sólidos solubles totales (SST) y acidez total titulable (ATT) respectivamente. La relación entre SST y ATT determina si el sabor es aceptable para el consumidor (Kader, 2008; González-Agüero *et al.*, 2016). La acidez se ha considerado uno de los atributos de calidad más importantes en especies frutales como manzana, uva, tomate (Sweetman *et al.*, 2009; Etienne *et al.*, 2013), cítricos (Albertini

*et al.*, 2006) y en chirimoya (Muñoz *et al.*, 2004; González-Agüero *et al.*, 2016). La guanábana se caracteriza por aumentar su concentración de ácidos orgánicos durante la maduración, lo que lo hace un modelo de interés para estudiar la relación entre la acidez y el sabor del fruto.

Son varios los ácidos orgánicos que se encuentran en el fruto de guanábana, de ellos el ácido málico es el que más se acumula durante la maduración (Paull *et al.*, 1983; Omoifo, 2004), que es un metabolito central en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos en la célula de los frutos (Wu y Chen, 2016). Los ácidos orgánicos usualmente se acumulan en las etapas iniciales del desarrollo del fruto y se utilizan como sustratos de la respiración durante la maduración del fruto (Diakou *et al.*, 2000; Moing *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2009). Los ácidos proporcionan un poder reductor y suministran metabolitos que son fundamentales para el equilibrio azúcar-ácido de los frutos maduros y que también contribuyen a la biosíntesis de los aminoácidos, que son otro componente importante del sabor en frutos maduros (Ianneta *et al.*, 2004). Durante la maduración, los procesos de síntesis y catabolismo del ácido málico son de interés para la comprensión metabólica, así como para la potencial mejora de los cultivos a través de prácticas agrícolas o moleculares. El objetivo del presente estudio fue examinar genes tentativamente involucrados en el control de los ácidos málico y cítrico que se acumulan en el fruto de guanábana. Para este propósito, se determinaron las variaciones en la expresión durante la maduración del fruto en relación con la acumulación de los ácidos. Aquí presentamos por primera vez evidencia de la relación entre el aumento de la acidez y la expresión de genes relacionados con las rutas de los ácidos málico y cítrico en frutos de guanábana.

Otro de los cambios que ocurren durante la maduración de los frutos, es el cambio de textura que ocurre por la degradación de la pared celular, lo que es el principal problema en el fruto de guanábana, presentando un exceso de ablandamiento conforme avanza la maduración, lo que limita su exportación y el tiempo de almacenamiento (Jiménez-Zurita *et al.*, 2017). Las proteínas de la pared celular conocidas como expansinas debilitan las paredes celulares mediante la ruptura reversible de los enlaces de hidrógeno desarrollados entre las microfibrillas de celulosa y los polisacáridos de la matriz (McQueen-Mason y Cosgrove, 1994). En el fruto de chirimoya ya existen reportes sobre la expresión de genes relacionados

con la pared celular (Shen *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2016), sin embargo, en guanábana no se han reportado este tipo de estudios.

Para realizar un análisis de expresión génica se utilizó la transcripción reversa en tiempo real o reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-qPCR o qPCR) que se ha vuelto ampliamente utilizada en especies vegetales no modelo. Dada la alta sensibilidad de este método, es necesaria la normalización utilizando genes de referencia. En este estudio se seleccionó el gen *ubiquitina* como gen de referencia (Berumen-Varela *et al.*, 2019 datos sin publicar) y los genes que se estudiaron en el proceso de maduración fueron *expansina (EXP)*, *malato deshidrogenasa dependiente de NAD (NAD-MH)* y *citrato sintasa mitocondrial (CSM)*, se examinó la tendencia en su expresión durante tres fases de maduración usando qPCR la cual se comparó con los cambios en la ATT y en la firmeza. Los resultados obtenidos nos permitieron inferir que las enzimas NAD-MH y CSM juegan papeles importantes en el aumento de acidez en frutos maduros y que EXP influye en el ablandamiento de los frutos maduros.

#### **4.4. Materiales y Métodos**

##### **4.4.1. Sitio experimental, material vegetal y tratamientos**

En Compostela, Nayarit, se cosecharon frutos en madurez fisiológica y se transportaron a la Unidad de Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma de Nayarit. Se seleccionaron descartando aquellos con daños mecánicos, físicos y fitopatológicos. Se almacenaron 30 frutos en refrigeración (15 °C, T15) y 20 frutos a temperatura ambiente (28 °C, TA) donde se dejaron madurar hasta alcanzar la madurez de consumo. Se tomaron muestras de pulpa de 5 frutos al azar cada tres días hasta antes de la senescencia. La pulpa se tomó con un sacabocados de 1 cm de diámetro, se cortó en discos de 1 cm de altura que fueron depositados en un tubo cónico para centrífuga Falcon de 15 ml estéril y se agregaron 5 ml de RNAlater (Sigma). Inmediatamente se congeló cada tubo en nitrógeno líquido y se almacenó a -80 °C hasta su uso. Los estados de madurez se denominaron madurez fisiológica o D0, (día del corte); madurez intermedia o D3 (3 días después del corte) y madurez de consumo o D6 y D9 (6 y 9 días después del corte, respectivamente).

#### **4.4.2. Parámetros de madurez de los frutos**

Se pesaron 40 g de pulpa de 5 frutos elegidos al azar que se incorporaron hasta formar una mezcla homogénea. De esta mezcla se obtuvo un jugo utilizado para determinar SST, ATT y pH. Los SST se midieron con un refractómetro digital (Hanna Instruments, HI96801). La ATT se midió titulando 10 ml del jugo con NaOH 0.1N en presencia de fenolftaleína y el contenido de ácido málico se calculó por 100 ml de jugo (AOAC, 2005). El pH se midió con un potenciómetro HI2210 (Hanna Instruments). La firmeza se evaluó con un penetrometro digital (SSEYL GY-4 Digital Fruit penetrometer) midiendo la fuerza necesaria para penetrar la cáscara; la cuantificación se realizó midiendo dos puntos opuestos de la parte ecuatorial del fruto y en un punto cercano al pedúnculo.

#### **4.4.3. Extracción de RNA total**

El RNA total se extrajo a partir de 75 mg de tejido de mesocarpio congelado y pulverizado con nitrógeno líquido en mortero, de las muestras en D0 (madurez fisiológica), D3 (madurez intermedia), D6 y D9 (madurez de consumo) utilizando dos réplicas biológicas de cada estado de madurez para cada condición de almacenamiento (TA y T15). Para la extracción se utilizó el kit Spectrum Plant Total RNA (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA total fue cuantificado en un espectrofotómetro Synergy HT/Take3 (BioTek Instrument Inc.). Se verificó su calidad calculando los ratios de absorbancia 260/280 y 260/230. La pureza se inspeccionó visualizando bajo luz UV las bandas ribosomales por electroforesis de geles de agarosa al 1.5% con 1X TBE teñidos con SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain (Thermo Fisher Scientific).

#### **4.4.4. Selección de genes y diseño de primers**

Actualmente no existe un genoma de referencia para el fruto de guanábana. Sin embargo, existen secuencias ya publicadas y de libre acceso (<https://sites.google.com/a/ualberta.ca/onekp/>) de hoja de guanábana (Matasci *et al.*, 2014). Dichas secuencias fueron descargadas y convertidas a base de datos mediante el comando makeblastdb, esto con el fin de encontrar secuencias de los genes de interés (pared celular y metabolismo secundario).

Se diseñaron primers de acuerdo a regiones conservadas de otras especies climatéricas, como chirimoya (González-Agüero *et al.*, 2016), mango y tomate (Genbank NCBI y Sol Genomics

Network). Los genes seleccionados fueron *expansina* (EXP) relacionado con el ablandamiento de la pared celular (Li *et al.*, 2009, Shen *et al.*, 2009), *malato deshidrogenasa dependiente de NAD* (MDH-NAD) que interviene en la ruta del ácido málico y *citrato sintasa mitocondrial* (CSM), enzima de la ruta del ácido cítrico (González-Agüero *et al.*, 2016). Con las secuencias de guanábana que presentaron alta homología se realizó un BLAST en GenBank para confirmar que estos genes tienen un alto porcentaje de homología y diseñar los primers con las regiones más conservadas. Se empleó la misma estrategia para la selección del gen de referencia *ubiquitina* (UBC) que se utilizó como gen normalizador. Los primers fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT, Tucson, AZ). Las secuencias forward y reverse de los primers, la temperatura de fusión ( $T_m$ ) y el tamaño del amplicón se muestran en el Cuadro 4.1.

#### **4.4.5. Síntesis de DNA complementario (cDNA)**

La primera hebra de cDNA se obtuvo por transcripción reversa del RNA total utilizando el SuperScript® III First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para cada muestra y su réplica, el master mix se preparó en microtubos libres de nucleasas, conteniendo 400 ng de RNA, 50 ng de hexámeros aleatorios, 10 mM dNTPs mix y agua MilliQ para llegar a un volumen final de 10  $\mu$ L. Se incubó a 65 °C por 5 min para desnaturalizar el RNA y el microtubo se enfrió en hielo por 1-2 min. En el siguiente paso se agregaron 200 U de la enzima SuperScript® III RT, 1X RT buffer, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 U de RNaseOUT y 0.2 M DTT a cada tubo, para un volumen final de 20  $\mu$ L. Cada microtubo se agitó en vórtex para mezclar bien y se centrifugó brevemente para llevar todo el contenido al fondo del tubo. Posteriormente se incubó a 25 °C por 10 min seguido de 50 min a 50 °C. La terminación de la reacción se llevó a cabo a 85 °C por 5 min y posterior enfriamiento sobre hielo. La reacción se centrifugó brevemente y se realizó digestión de RNA residual con 2 U de RNase H por 20 min a 37 °C. Se almacenó a -20 °C hasta su uso.

**Cuadro 4.1.** Lista de primers diseñados para el análisis del nivel de expresión mediante PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR).

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>T<sub>m</sub> (°C)</b>	<b>Amplicón (pb)</b>
Exp1Gua-Fw	CTCAGTACAGGGCTGGAATC	55	107
Exp1Gua-Rv	CACTCCTACTTCAACCTGGTC	55	
NAD-MHGua-Fw	GTTGATGCTGCATTTCTCTTC	55	100
NAD-MHGua-Rv	TGTTATGGTTGGTGGGTTCC	55	
Citra-sinGua-Fw	TGACCATGAGGGTGGAAATG	55	117
Citra-sinGua-Rv	TTTAGCTGGTCCACTTCATGG	55	
UBC-cheri-Fw	AACCTCTATCCAGTCTCTCCTC	55	128
UBC-cheri-Rv	TGAGATAGTGGAGCAGAGCT	55	

#### 4.4.6. Amplificación del cDNA

Las librerías de cDNA se utilizaron posteriormente en ensayos de PCR para comprobar una amplificación consistente con los primers diseñados. Para esto se utilizó el REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix with MgCl<sub>2</sub> (Sigma). El master mix se preparó a un volumen final de 10 µL, conteniendo 1.3 µL de cDNA de la reacción anterior (aproximadamente 200 ng), 0.4 µM de los primers forward y reverse de cada gen candidato, 1X RedTaq ReadyMix y agua PCR. Los programas de PCR incluyeron un paso inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido por 40 ciclos de 94 °C por 45 s, 55-56 °C (dependiendo de la temperatura de alineamiento del primer) por 30 s, y 72 °C por 30 s, y un paso final de extensión a 72 °C por 10 min. Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador T100 (Bio-Rad). Los productos de PCR se verificaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% con 1X TBE, teñidos con SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain (Thermo Fisher Scientific).

#### **4.4.7. Análisis de expresión diferencial por qPCR**

Para el análisis de la expresión de los genes relacionados al metabolismo de los ácidos orgánicos y el ablandamiento en guanábana, se realizaron ensayos de qPCR utilizando el cDNA sintetizado y los primers diseñados anteriormente. Se analizaron los genes que codifican para las enzimas NAD-MH, CSM y EXP en el equipo Rotor-Gene Q (QIAGEN). Las reacciones de PCR se hicieron por triplicado usando el Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific) bajo las siguientes condiciones: 20 ng de cDNA molde, 1X SYBR Green Master Mix, 0.5  $\mu$ M de primer forward y reverse, y agua grado PCR hasta un volumen final de 20  $\mu$ L. Para cuantificar los transcritos amplificados se utilizó el programa por default Rotor-Gene Q Series Software (QIAGEN) ver. 2.3.1 a través de la interpolación de una curva de calibración generada a partir de diluciones de concentración conocida del respectivo gen de estudio. Se incluyeron controles sin presencia de cDNA y los resultados se normalizaron con los niveles de expresión de UBC. El cambio en la expresión se calculó por el método de Pfaffl ( $2^{\Delta C_t}$ ) (Pfaffl, 2007).

#### **4.4.8. Análisis estadístico**

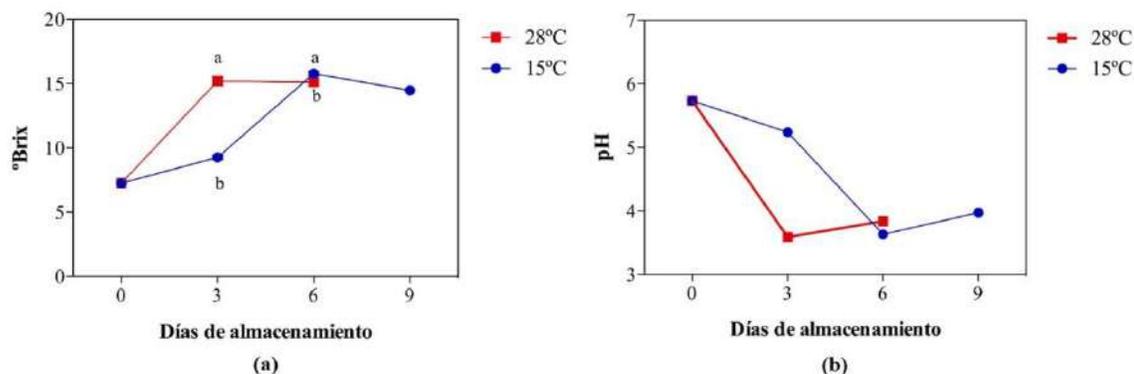
Los valores de SST, ATT, pH, firmeza y el perfil de expresión de los transcritos se compararon mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con un  $p \leq 0.05$ , utilizando el programa GraphPad Prism 6 Software. Se utilizó un diseño completamente al azar y se determinó si existían diferencias significativas mediante una prueba de comparación múltiple de LSD (Least Significant Difference).

## 4.5. Resultados y Discusión

### 4.5.1. Atributos de calidad postcosecha de frutos de guanábana

Con el fin de determinar la maduración de los frutos de guanábana se evaluaron los parámetros pH, firmeza, acidez total titulable (ATT) y sólidos solubles totales (SST). En conjunto, estos parámetros ayudan a determinar el estado de madurez de los frutos.

**pH.** De acuerdo con la Norma Colombiana Icontec (2003) la guanábana se clasifica como un fruto ácido y para considerar que el fruto ha alcanzado la madurez de consumo debe tener un valor mínimo de pH de 3.38. En aquellos frutos almacenados a TA el pH disminuyó desde 5.73 (D0) hasta 3.84 (D6), valor similar a los reportados Jiménez-Zurita *et al.* (2016) y León Méndez *et al.* (2016) en frutos que alcanzaron la madurez de consumo. Por otro lado, en aquellos frutos que se almacenaron a T15, el pH bajó, hasta 3.63 (D6). Aunque se han realizado estudios probando la temperatura de refrigeración (Espinosa *et al.*, 2013; Jiménez-Zurita *et al.*, 2017) ninguno de estos reporta valores de pH en madurez de consumo. En la Figura 4.1b se observa que en los primeros 3 días, la disminución de pH es más notoria en los frutos a TA, a diferencia de los frutos T15, en los que la disminución ocurre entre los 3 y 6 días después de la cosecha. Esto nos indica que la temperatura de almacenamiento no afectó la acidez final en madurez de consumo y los frutos, además de aumentar su vida de anaquel, llegaron a los valores de pH esperados. Jiménez-Zurita *et al.*, (2017) reportaron resultados similares y concluyeron que T15 aumenta por tres días la vida de anaquel. La disminución de pH coincidió con el aumento en la ATT. La disminución de pH se ha atribuido a la acumulación de iones H<sup>+</sup> debido a la gran cantidad de ácidos orgánicos suplementarios que se pueden encontrar en forma no ionizada, y cuando son liberados de la vacuola, permanecen en el citoplasma y se miden como iones H<sup>+</sup> libres en la pulpa del fruto (Gutierrez *et al.*, 1994).



**Figura 4.1.** (a). Comportamiento de los sólidos solubles totales durante la vida postcosecha de los frutos de guanábana almacenados a 15 y 28 °C. Las barras verticales indican la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos en el mismo día después de la cosecha. (b) comportamiento del pH durante la vida postcosecha de los frutos de guanábana almacenados a 15 y 28 °C.

**Sólidos solubles totales (SST).** El patrón observado en el comportamiento del pH se repite en el comportamiento de los SST. Es decir que, se observó un aumento de SST en los frutos sometidos a ambos tratamientos. El aumento es más marcado entre los días 0 a 3 a TA y en aquellos a T15 es entre los días 3 y 6, donde se acentúa la acumulación de SST y se mantiene hasta 9 días después de la cosecha. Se considera que los frutos de guanábana en madurez de consumo tienen un mínimo de SST de 13.5 °Brix (NTC Icontec, 2003). Los frutos que fueron almacenados a TA alcanzaron los 15.1 °Brix, valores entre los reportados por Jiménez-Zurita *et al.* (2016) y León Méndez *et al.* (2016) (16.6 y 14.10 °Brix, respectivamente); y en aquellos almacenados a T15 se llegó a los 15.8 °Brix, valor similar al reportado por Jiménez-Zurita *et al.* (2017) en frutos almacenados por 4 días a 15 °C y 4 días posteriores a 22 °C. Con estos resultados podemos inferir que manteniendo los frutos a 15 °C continúa la acumulación de azúcares, lo que indica que la temperatura en frío no afectaría las rutas de síntesis de azúcares, que se producen principalmente a partir de la hidrólisis de almidón durante el pico respiratorio (principalmente sacarosa, glucosa y fructosa) (Badrie y Schauss, 2010; Márquez-Cardozo *et al.*, 2012). Por otro lado, el decremento de los SST a partir del día 6 podría ser el resultado de la utilización de estos azúcares como sustratos respiratorios (DeMan, 1999; Kader, 2002). En nuestro estudio, los frutos almacenados a T15 resultaron ser más dulces que aquellos almacenados a TA. Sin embargo, trabajos previos de Espinosa *et al.*, 2013 y

Jímenez-Zurita *et al.*, 2017 reportan el comportamiento contrario. Así mismo, Vishnu Prasanna *et al.*, (2000) reportaron que los valores de SST de frutos de anona fueron más altos en aquellos almacenados a 25 °C que en aquellos almacenados a 15 °C. La acumulación de azúcares está relacionada con la acumulación de ácidos orgánicos cuando los frutos están alcanzando la maduración. En esta etapa los azúcares abandonan el papel de ser la principal fuente de carbono para el metabolismo energético. El malato liberado de la vacuola durante la maduración tiene el potencial de cumplir esta función, y puede hacerlo a través de la participación en la gluconeogénesis, la respiración y biosíntesis de compuestos secundarios (Sweetman *et al.*, 2009). De acuerdo con otros autores, es probable que la función de la gluconeogénesis no sea aportar la acumulación de azúcares, sino otros papeles metabólicos (Famiani *et al.*, 2016).

**Acidez total titulable (ATT).** Los frutos presentaron un aumento de ATT durante su maduración. Los frutos almacenados a TA mostraron niveles mayores de acidez que aquellos almacenados a T15 (de 0.13% a 0.92 y 0.71%, respectivamente) a los 6 días después de la cosecha, observándose una ligera disminución en el día 9 (Figura 4.2). Estos valores son superiores a los reportados por otros autores. En frutos almacenados a TA, Espinosa *et al.* (2013) reportaron un aumento de 0.09% a 0.85%; León Méndez *et al.* (2016) reportaron un aumento de hasta 0.87%; y Jímenez-Zurita *et al.* (2017) un aumento de hasta 0.96%. En frutos almacenados a T15 Espinosa *et al.* (2013) reportaron un aumento hasta 0.67%; y Jímenez-Zurita *et al.* (2017) hasta 0.68% a los 10 y 8 días después de la cosecha, respectivamente. El aumento en la acidez se puede atribuir a la producción de ácidos orgánicos como lo han reportado Paull *et al.* (1983) y Omoifo (2004) vía la carboxilación del ácido pirúvico y la síntesis de ácido málico (Paull, 1982).

Paull *et al.* (1983) identificaron un aumento de 7X en el contenido de ácido málico, mientras que el contenido de ácido cítrico solo aumentó 3X. Por lo tanto, concluyeron que es el aumento de ácido málico el que contribuye significativamente al sabor ácido del fruto. Ambos ácidos mostraron el mayor pico de concentración a 3 y 4 días después de la cosecha y después disminuyeron (Pareek *et al.*, 2011). De igual manera, Omoifo (2004) encontró que los ácidos presentes en mayor cantidad en jugo de guanábana son el ácido málico y el ácido cítrico. A pesar de que en este trabajo no se identificó la presencia de los ácidos orgánicos, con la

evidencia presentada en los estudios mencionados, podemos establecer que el ácido málico es el que confiere el aumento en la acidez en los frutos de guanábana de este trabajo.

Los ácidos orgánicos se acumulan durante el desarrollo del fruto. Paull (1998) reportó que el contenido de ácido málico comienza a aumentar a los 2 días después de la cosecha y aumenta 3x durante la maduración. Los ácidos orgánicos y son consumidos como sustratos de la respiración en la glicólisis y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) mayormente durante el pico climatérico; estos ácidos también sirven como sustratos de la gluconeogénesis durante la maduración (Etienne *et al.*, 2013), por lo que después del pico climatérico se presenta una disminución en la ATT (Etienne *et al.*, 2013).

Se ha reportado que en los frutos almacenados en refrigeración la acidez aumenta en menor medida que en aquellos almacenados a temperatura ambiente (Espinosa *et al.*, 2013; Jiménez-Zurita *et al.*, 2017). Esto coincide con nuestros resultados. Los frutos almacenados a TA aumentaron 8X los niveles de ATT entre D0 y D3, con una ligera disminución entre D3 y D6; al final de su vida postcosecha tuvieron un aumento neto de 7X. Por otra parte, los frutos almacenados a T15 aumentaron solo 2X la ATT entre D0 y D3 y el máximo aumento, de 5.5X, ocurrió al D6, seguido de una ligera disminución de D6 a D9, por lo que al final de su vida de anaquel presentaron un aumento total de 4X. La disminución de pH está correlacionada con el aumento de ATT (Paull *et al.*, 1983). Como se observa en las Figuras 4.1b y 4.2, el cambio de pH y ATT es inversamente proporcional. Esta relación fue consistente en cada día de la medición.

**Firmeza.** Otro de los mayores cambios observados durante la maduración fue la continua disminución en la firmeza de los frutos, cambio que ocurrió rápido en los frutos madurados a TA y fue gradual en los frutos a T15 (Figura 4.4). En D0 el valor promedio de la firmeza fue de 240.23N y 6 días después, los frutos a TA disminuyeron un 91.1% de su firmeza (hasta 21.3N) y los de T15, un 85.6% (hasta 34.4N). En los frutos a TA el cambio más drástico y estadísticamente significativo ocurrió entre D0 y D3, pues en este periodo disminuyeron un 85.7% (a 34.4N) su firmeza, a diferencia de los almacenados a T15, que en este periodo su firmeza disminuyó solo el 8.3% (a 220.0N); dicho en otras palabras, la firmeza de los frutos a TA disminuyó 10X más rápido en los primeros tres días después de la cosecha que los almacenados a T15. Esto indicaría que el proceso de madurez fue retardado cuando los frutos

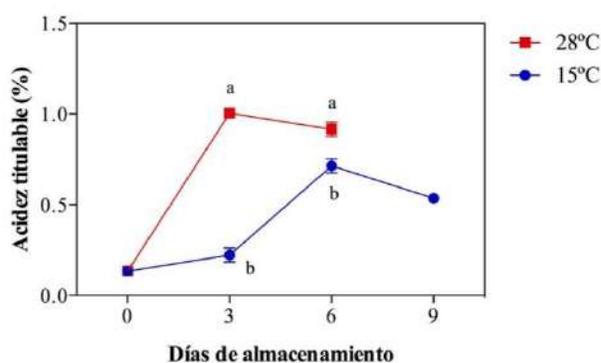
se almacenaron a T15. Por otro lado, en el periodo entre D3 y D6, los frutos a T15 presentaron una notable pérdida de firmeza de 84.4% (Figura 4.4), mientras que los frutos a TA perdieron solo el 6%. En D6 los frutos de ambos tratamientos alcanzaron su punto más bajo de firmeza sin diferencia significativa entre ellos (21.3N TA y 34.4N T15,  $p < 0.05$ ). La pérdida de la firmeza ha sido atribuida a la degradación de la celulosa, las pectinas y otros carbohidratos de la estructura de la pared celular (Gutierrez *et al.*, 2007). Lima *et al.* (2006) reportaron que el ablandamiento en frutos de guanábana almacenados a 26 °C ocurrió significativamente de los días 2 al 4 de almacenamiento coincidiendo con el aumento de actividad de las enzimas amilasa, pectin metilesterasa, poligalacturonasa y  $\beta$ -glucosidasa. En 2009, Shen *et al.*, revelaron la presencia de expansinas con diferentes niveles de expresión durante la maduración y el ablandamiento de frutos de chirimoya almacenados a diferentes temperaturas.

Después de 6 días de almacenamiento a T15, los frutos no presentaron daños por frío ni oscurecimiento, se volvieron ligeramente más firmes sin diferencia significativa (de 34.4N a 39.9N,  $p < 0.05$ ), se volvieron menos dulces y menos ácidos. Vishnu Prasanna *et al.* (2000) reportaron un patrón similar en el proceso de maduración en frutos de saramuyo (*Annona squamosa*) almacenados a bajas temperaturas (10° y 15 °C). Espinosa *et al.* (2013) reportaron que los frutos mantenidos en refrigeración redujeron la tasa de pérdida de la firmeza y en D9 a 16 °C los valores bajaron hasta 5.1N e indicaron que la refrigeración reduce la actividad enzimática ya que la pérdida de la firmeza fue gradual en los primeros 6 días. Resultados similares se reportaron en saramuyo, chirimoya y guanábana (Bolívar-Fernández *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2009; Jiménez-Zurita *et al.*, 2017).

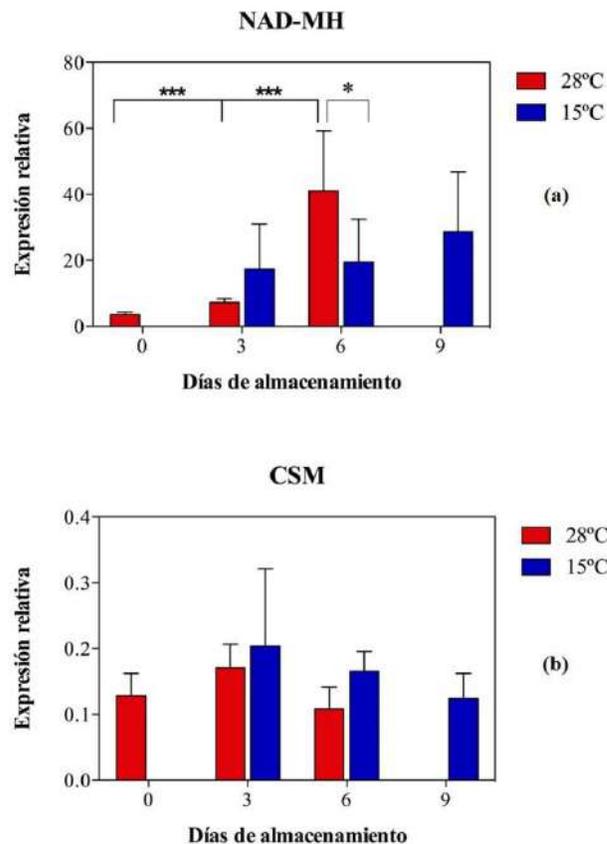
La maduración en frutos de guanábana se caracteriza por la presencia de picos respiratorios y de producción de etileno, acompañados de un aumento en la concentración de SST y en la ATT, así como de la disminución en el pH, el peso y la firmeza (Márquez-Cardozo *et al.*, 2012; Jiménez-Zurita *et al.*, 2017). Los resultados de las variables evaluadas en este trabajo (pH, SST, ATT y firmeza) mostraron que los frutos evaluados presentaron este patrón característico de aumento en SST y ATT y disminución de pH y firmeza. En base a estos resultados, se utilizó el material vegetal obtenido para la evaluación de expresión de genes vinculados a la síntesis de ácidos orgánicos y el ablandamiento.

#### 4.5.2. Análisis de la expresión de genes relacionados con el ácido cítrico y el ácido málico

La expresión relativa de *NAD-MH* y *CSM* durante el proceso de maduración se detectaron por PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) usando ubiquitina como gen de referencia. Se observó un aumento en la expresión del gen *NAD-MH*. La enzima NAD-MH es la responsable de la síntesis del ácido málico a partir de oxalacetato en el citoplasma de la célula, relacionándose así con el aumento observado del ácido málico (Famiani *et al.*, 2015). En los frutos almacenados a TA, los niveles de *NAD-MH* mostraron un aumento progresivo a lo largo del proceso de maduración (Figura 4.2a). Entre D0 y D3 presentó un aumento de 2X en el nivel de expresión, seguido por un drástico aumento hasta sobreexpresarse 10.6X con respecto a los niveles de expresión iniciales. Por otro lado, en los frutos almacenados a T15 se observó un aumento paulatino en la expresión de este gen. El aumento en los niveles de expresión entre D3 y D6 (1.6X) y entre D6 y D9 (1.48X) no mostraron ser significativamente diferentes entre ellos; sin embargo, hay diferencia significativa en los niveles de expresión de D6 entre tratamientos, lo que coincide con los resultados de González-Agüero *et al.* (2016) en frutos de chirimoya. En este punto, los frutos de guanábana estaban en madurez de consumo con buenos atributos de calidad. En los siguientes 3 días, los frutos a T15 continuaron con la maduración y mantuvieron estos atributos.



**Figura 4.2.** Comportamiento de la acidez titulable en frutos de guanábana después de la cosecha almacenados a 15° y 28 °C. Las barras verticales indican la desviación estándar. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos en el mismo día después de la cosecha.



**Figura 4.3.** (a). Expresión relativa de *NAD-MH* y (b) expresión relativa de *CSM*, durante la maduración poscosecha de frutos de guanábana. Los datos representan la media de tres réplicas. Las bandas verticales corresponden a la desviación estándar. Niveles de significancia: \*\*\*=  $P \leq 0.001$ , \*\*=  $P \leq 0.01$ , \*=  $P \leq 0.05$ . Ausencia de \* indica que no hay diferencia significativa por ningún medio.

Algunos estudios han vinculado el aumento en la síntesis de ácido málico con el aumento de la tasa de respiración; sin embargo, este patrón no puede explicarse por la clasificación de los frutos en climatéricos y no climatéricos (Sweetman *et al.*, 2009). Frutos climatéricos como ciruela y tomate parecen utilizar el ácido málico durante el pico respiratorio (Goodenough *et al.*, 1985; Kortstee *et al.*, 2007; Singh y Singh, 2008), mientras que otros como el mango y el plátano continúan acumulándolo durante la maduración, incluso en la etapa climatérica (Selvaraj y Kumar, 1989; Agravante *et al.*, 1991). González-Agüero *et al.* (2016) reportaron un aumento de ATT coincidente con el pico respiratorio en frutos de chirimoya. Además, indicaron que hay una correlación directa entre la acumulación de los transcritos del gen *AcNAD-MDH*, la actividad enzimática de NAD-MDH y el aumento del

ácido málico durante la maduración. Estos resultados son consistentes con el aumento en la expresión de *NAD-MH* de este estudio (Figura 4.3a). Sin embargo, la ligera disminución en la ATT (Figura 2) al final de la maduración no es consistente con los niveles de expresión de *NAD-MH*, que codifica la enzima encargada de sintetizar malato a partir de oxalacetato (OAA). González-Agüero *et al.* (2016) reportaron que el gen *AcNADP-ME* aumentó su expresión en los primeros 5 días después de la cosecha, seguido de una ligera disminución en el día 8 y volvió a aumentar a los 10 días después de la cosecha en frutos de chirimoya y que el mismo patrón se presentó en la concentración del ácido málico. Chen *et al.* (2009) reportaron que NADP-ME podría jugar un papel importante en la disminución de la concentración en ácido málico durante la maduración de níspero, lo que difiere de las observaciones de Saradhulhat y Paull (2007), quienes describieron que no hay correlación de esta enzima con el ácido málico en frutos de piña. Para la regulación del metabolismo del ácido málico y, por consiguiente, para la regulación del pH citoplasmático, la velocidad a la que se produce el ácido málico a través de las enzimas citosólicas fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y malato deshidrogenasa (MDH) debe coincidir estrechamente con la tasa de descarboxilación de malato por la enzima málica citosólica dependiente de NADP (NADP-ME) que cataliza la reducción de oxaloacetato a malato. Esta reacción es importante para mantener estable el metabolismo celular (Muñoz *et al.*, 2004). Otras posibles explicaciones al patrón observado en nuestro estudio sería 1) que el aumento en la expresión de *NAD-MH* no se ve reflejado en la ATT (que disminuye) al final de la maduración porque el ácido málico que se acumuló en la vacuola durante el pico climatérico, está siendo degradado por la enzima NADP-ME (lo que aumentaría la expresión del gen *NADP-ME*) y al final de la maduración, al tratar de regular los niveles de ácido málico almacenados en la vacuola el gen *NAD-MH* aumentaría su expresión; o 2) porque pudiera existir alguna regulación post-transcripcional de *NADP-ME*. Esta teoría también se postula en manzana, en donde se sugiere que existen una relación entre el almacenamiento, la degradación y la síntesis (Yao *et al.*, 2009). Además, variedades de manzana con alta acidez, muestran una acumulación vacuolar de ácido málico; en cambio variedades con baja acidez presentaban una alta degradación del ácido málico al no ser almacenado (Berüter, 2004). Etienne *et al.* (2002) reportaron que *Mdh1* tendió a expresarse mayormente en frutos maduros de durazno de acidez normal (Fantasia) que en frutos de baja acidez (Jalousia) y que la concentración de

ácidos orgánicos disminuyó debido a la síntesis reducida y/o catabolismo aumentado de los ácidos orgánicos (Tucker, 1993).

Los genes involucrados en el metabolismo de los ácidos orgánicos muestran una expresión más marcada en la maduración que en las etapas tempranas del desarrollo, pero sus patrones de expresión no necesariamente se correlacionan con los cambios en el contenido de ácidos orgánicos (Etienne *et al.*, 2002).

Respecto al metabolismo del ácido cítrico, el primer paso del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) es catalizado por la enzima citrato sintasa mitocondrial (CSM). Nuestros resultados mostraron que durante la maduración de los frutos a TA se observó un ligero aumento del nivel de expresión de *CSM* (1.3x) entre D0 y D3, seguido de una disminución entre D3 y D6 (Figura 4.3b). Estos datos no fueron significativamente diferentes. Por otra parte, en los frutos madurados a T15 se observó una disminución gradual de la expresión de *CSM*, sin embargo, este cambio tampoco presenta diferencia significativa en sus niveles de expresión. En otras palabras, la expresión de *CSM*, que codifica la enzima encargada de la síntesis de ácido cítrico, mantiene constante su expresión desde el inicio hasta el final de la vida poscosecha de frutos de guanábana. Etienne *et al.* (2002) reportaron que la abundancia de los transcritos de *CS* en frutos maduros de durazno de acidez normal (Fantasia) alcanzó su punto máximo 20 días después del pico de ácido cítrico. De manera similar, el nivel de ácido cítrico no se correlacionó con la expresión de *CS* en frutos de toronja (Canel *et al.*, 1996). En frutos de guanábana no se ha encontrado información relacionada con el metabolismo del ácido cítrico. Sin embargo, en chirimoya se ha reportado que el aumento en la concentración de ácido cítrico (hasta 5X durante la maduración; mientras que el ácido málico solo aumenta 2X) está acompañado por una elevada actividad de citrato sintasa (CS) y la expresión del gen *Ac-mCS* (González-Agüero *et al.*, 2016). Con esos resultados concluyeron que *mCS* tiene un papel importante en la biosíntesis del ácido cítrico. Sin embargo, aunque en nuestro trabajo no medimos las concentraciones de los ácidos málico y cítrico, con nuestros hallazgos podríamos proponer que el ácido cítrico no influyó de manera determinante en la acidez de los frutos de guanábana, lo cual coincide con lo reportado por Paull *et al.* (1983) quienes determinaron que el ácido málico aumentó 7X, en cambio el contenido de ácido cítrico solo aumentó 3x; y concluyeron que el ácido málico contribuye significativamente al sabor ácido del fruto.

Así mismo, González-Agüero *et al.* (2016) reportaron que los genes *AcACON* y *AcATP-CS* involucrados en la degradación del ácido cítrico, aumentan su expresión en las etapas finales de la maduración (D8). Morgan *et al.* (2013) indicaron que el aumento en ácido cítrico y la disminución de aconitasa (ACO) son proporcionales en líneas de tomate transgénicas, lo que sugiere que la actividad de ACO es determinante, ya que no solo afectó los niveles de ácido cítrico, sino que llevó a un aumento sustancial de ácido málico y una disminución de ácidos succínico y fumárico en frutos maduros. Respecto al gen *AcATP-CS*, que también participa en la degradación del ácido cítrico, González-Agüero *et al.* (2016) reportaron que su expresión se incrementó mientras que el contenido de ácido cítrico disminuyó. Ellos proponen que el aumento en la expresión de *AcATP-CS* se relaciona con la actividad enzimática de ATP-CS que se ha reportado previamente en la maduración de mango (Mattoo y Modi, 1970). Es decir, que el aumento de la actividad enzimática de ATP-CS podría desviar el metabolismo del citrato del CAT hacia el suministro de acetyl-CoA y OAA para otras vías metabólicamente activas durante la maduración de los frutos (Giovannoni, 2004). Estudios previos en durazno (Etienne *et al.*, 2002) y melón (Tang *et al.*, 2010) han demostrado que los patrones de expresión de los genes involucrados en el metabolismo de los ácidos orgánicos no están necesariamente correlacionados con los cambios en el contenido de ácidos orgánicos.

La relación expresión – síntesis – acumulación nos puede ayudar a explicar que al no haber diferencias en la expresión de *CSM* en la maduración de frutos de guanábana, ya que al no haber un aumento en la expresión de *CSM*, no aumenta la actividad enzimática de *CSM*, por lo tanto, no se acumula ácido cítrico y hay una disminución de AAT, ya que el ácido málico sintetizado en esta etapa está siendo almacenado en la vacuola. Si bien la acumulación de ácido málico estaría relacionada con el almacenaje vacuolar, otros estudios demuestran que la concentración de ácido cítrico estaría siendo determinada principalmente por la respiración del fruto, siendo su síntesis la principal vía de acumulación en frutos (Etienne *et al.*, 2013) vía CAT. Aun así, las tasas de síntesis y degradación de los ácidos orgánicos no se atribuyen a las tasas globales de respiración celular (Perotti *et al.*, 2014). Además, durante el desarrollo de los frutos, el mecanismo de síntesis, degradación y el proceso de acumulación de los ácidos orgánicos en la célula no solo está regulado por un solo gen o vía, sino por una red reguladora compleja. En el futuro, las técnicas de transcriptómica, proteómica y metabolómica se podrían utilizar para ahondar en la red regulada de los genes centrales,

analizar los factores relacionados y la modificación del DNA para el transporte y la acumulación de ácidos orgánicos en las células de los frutos (Li *et al.*, 2016)

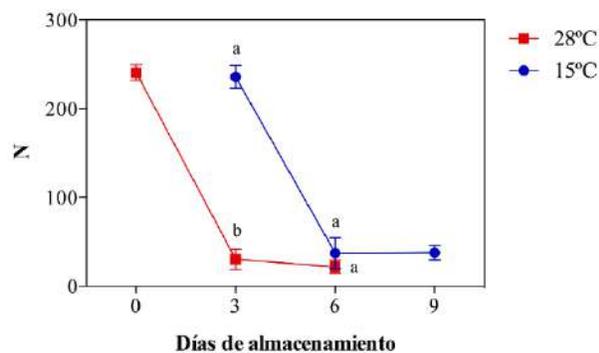
*Efecto de la temperatura.* Las modificaciones en el metabolismo de los ácidos orgánicos en respuesta a la temperatura probablemente se deben al impacto de la temperatura en las velocidades de reacción de la glucólisis y del CAT (Araujo *et al.*, 2012) al modificar las actividades enzimáticas (Lakso y Kliewer, 1975) y también las propiedades cinéticas de los sistemas de transporte mitocondrial involucrados (Halestrap, 1975). En este estudio se observó que en los frutos almacenados a T15 presumiblemente se retardó el pico respiratorio y la serie de eventos que ocurren simultáneamente, ya que a esta temperatura los cambios característicos de la maduración ocurrieron 3 días después que en aquellos mantenidos TA. Reportes previos realizados en frutos de guanábana almacenados a temperaturas de refrigeración permitieron observar que T15 retrasa 3 días la maduración (Jiménez-Zurita, *et al.*, 2017).

El aumento de la temperatura de los frutos durante la maduración disminuye su contenido de ácidos del ciclo de Krebs mediante el incremento de la tasa de varios procesos metabólicos. En los frutos, el aumento en la temperatura incrementa la tasa de su metabolismo, y por lo tanto, el consumo de compuestos, tales como los azúcares y ácidos del ciclo de Krebs almacenados que sirven como sustratos metabólicos (Famiani *et al.*, 2015). La temperatura afecta diversas rutas, por ejemplo, la respiración y la síntesis de metabolitos secundarios (Ruffner, 1982; Pereira *et al.*, 2006). Asimismo, se ha propuesto que el incremento en la temperatura podría alterar el transporte de malato y citrato en el tonoplasto, resultando en la disminución en su contenido vacuolar y más malato/citrato estaría disponible en el citosol para usarse en el metabolismo (Etienne *et al.*, 2013). Los niveles de transcripción de varios transportadores de dicarboxilato/tricarboxilato incrementaron con temperaturas altas (Rienth *et al.*, 2014), sugiriendo y respaldando importación incrementada de malato al interior de la mitocondria para la respiración (Famiani *et al.*, 2015).

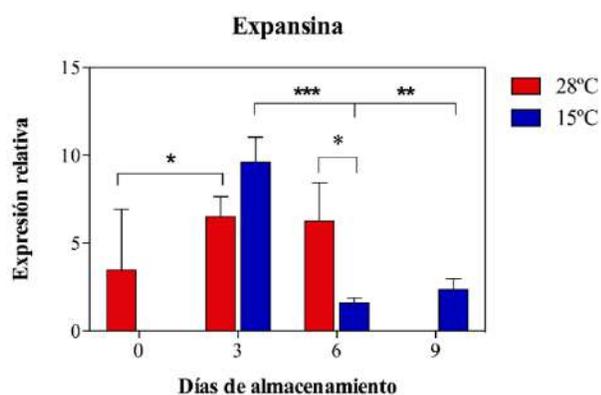
#### **4.5.3. Análisis de la expresión de genes relacionados con el ablandamiento**

La acumulación de ácidos orgánicos en los frutos difiere de otros procesos de desarrollo del fruto bien conocidos, como la síntesis de etileno asociada a la maduración y la degradación de la pared celular, que involucran genes específicos de la fruta altamente expresados

(Callahan *et al.*, 1993). Las expansinas (EXPs) son proteínas de la pared celular sin actividad hidrolítica que contribuyen al ablandamiento del fruto (Li *et al.*, 2009). Se ha encontrado que las EXPs están involucradas en el ablandamiento de frutos de tomate (Rose *et al.*, 1997; Brummell *et al.*, 1998; Cantu *et al.*, 2008), fresa (Harrison *et al.*, 2001), durazno (Hayama *et al.*, 2003), pera (Hiwasa *et al.*, 2003), plátano (Sane *et al.*, 2007) y mango (Sane *et al.*, 2005). Sin embargo, no se ha confirmado si estas enzimas están involucradas en la pérdida de la firmeza durante la maduración de frutos de guanábana. Para identificar si la expresión de *EXP* está correlacionada con la pérdida de la firmeza se midió la expresión a TA y T15 y se comparó con la pérdida de la firmeza. En este estudio se midió la expresión de los transcritos de *EXP*. En los frutos almacenados a TA, *EXP* presentó un incremento de 2X entre D0 y D3 (Figura 4.5), lo que coincide con la disminución drástica de la firmeza en este periodo (Figura 4.4). Sin embargo, aunque hubo un aumento en la expresión de *EXP* entre D3 y D6, no se observó diferencia significativa entre ellos, mismo patrón que se observó en el comportamiento de la firmeza en frutos de este tratamiento respecto a la disminución de la firmeza. Por otro lado, la expresión de *EXP* mostró una tendencia a la disminución en frutos a T15, los que presentaron una diferencia extremadamente significativa entre D3 y D6, y muy significativa entre D3 y D9, sin embargo, no se observó diferencia significativa entre D6 y D9.



**Figura 4.4.** Comportamiento de la firmeza durante la vida postcosecha de los frutos de guanábana almacenados a 15 y 28 °C. Cada punto representa la media de 5 observaciones y las barras verticales su error estándar.



**Figura 4.5.** Expresión relativa de *EXP*, durante la maduración poscosecha de frutos de guanábana. Los datos representan la media de tres réplicas. Las bandas verticales corresponden a la desviación estándar. Niveles de significancia: \*\*\*=  $P \leq 0.001$ , \*\*=  $P \leq 0.01$ , \*=  $P \leq 0.05$ . Ausencia de \* indica que no hay diferencia significativa por ningún medio.

Estos resultados nos indicarían que la expresión de *EXP* está directamente relacionada con el ablandamiento y el aumento en la acumulación y en la actividad de las enzimas hidrolíticas. Se ha demostrado que un aumento en la acumulación de mRNA de *EXP* está relacionada con la pérdida de la firmeza en muchos frutos. Shen *et al.* (2009) revelaron la presencia de múltiples miembros de la familia del gen de la *EXP* con patrones diferenciales de expresión durante la maduración y el ablandamiento de frutos. Detectaron que la acumulación de mRNA de *AcExp1* en frutos almacenados a 15° y 20 °C estuvo presente desde D0 hasta D8, tuvo un aumento directamente proporcional al aumento de temperatura y estaba correlacionada con cambios en la firmeza. Por otro lado, bajo ambas condiciones la expresión de *AcExp2* se expresó a partir de D5 que indica que puede estar involucrada en una etapa posterior del ablandamiento de la fruta. Y finalmente, la expresión de *AcExp3* estuvo estrechamente relacionada con el inicio del ablandamiento de la fruta (a partir de D3 a 15 °C y del D4 a 20 °C) y hasta D8 en ambos tratamientos. Se ha propuesto que las *EXP* asociadas a la maduración podrían contribuir a la degradación de la pared celular al permitir la accesibilidad de otras proteínas modificadoras de la pared celular, como las hidrolasas, poligalacturonasas y endopoligalacturonasas, a polímeros de la pared celular estructuralmente importantes (Rose y Bennett, 1999). Esta hipótesis fue respaldada por la observación de que las líneas de tomate transgénicas con niveles de expresión suprimidos o

elevados de *LeExp1*, un gen de maduración de los frutos específico para *EXP*, mostraron tasas alteradas de ablandamiento y despolimerización de diferentes clases de polisacáridos de la pared (Brummell *et al.*, 1999; 2002).

En general, las bajas temperaturas inhiben la maduración y senescencia de los frutos y retardan el ablandamiento (Li *et al.*, 2010). Vishnu Prasanna *et al.* (2000) reportaron que la firmeza de frutos de saramuyo (*Annona squamosa*) fue menor en aquellos almacenados a 20° y 25 °C que en aquellos almacenados a 10° y 15 °C. Este fenómeno lo atribuyeron a que la actividad de enzimas responsables de la degradación de la celulosa y otras sustancias pécticas disminuye a temperaturas reducidas, como lo habían postulado Tsay y Wu (1990) en la misma especie. Brummell *et al.* (2004) reportaron que la firmeza de frutos de durazno disminuye lentamente durante el amacenaje en frío, por lo tanto, la baja temperatura afecta la actividad de numerosas enzimas modificadoras de la pared celular, con importantes consecuencias para el metabolismo de las pectinas. Pavez *et al.* (2013) propusieron que la lanosidad en duraznos sería causada por alteraciones en la actividad de las enzimas de la pared celular durante el almacenamiento en frío, lo que afectaría el metabolismo de los polisacáridos de la pared celular y llevaría a un desequilibrio en la degradación de las pectinas. Además, reportaron que las expansinas y las endopoligalacturonasas son detectadas al inicio de la maduración y alcanzan su punto máximo en la etapa final. Lo anterior coincide con nuestros resultados en los frutos de T15 en los que se observó que fue en la fase final donde alcanzaron los valores más bajos de firmeza, a diferencia de los frutos de TA que desde la etapa temprana presentaron ablandamiento (Figura 4.4). Brummell *et al.* (2004) plantearon que un ligero aumento en la polidispersidad de los glicanos de matriz con maduración, en lugar de la disminución normal, puede ser una consecuencia del efecto inhibitorio del almacenamiento en frío en ciertas actividades enzimáticas. Por otro lado, Li *et al.* (2009) reportaron que el retraso de la maduración en frutos de chirimoya (por la aplicación de 1-MCP) retardó o suprimió la expresión de *AcEXPs*.

#### **4.6. Conclusiones**

Hasta donde tenemos entendido, este es el primer estudio que evalúa la expresión de genes relacionados con las rutas de los ácidos orgánicos y el ablandamiento en frutos de guanábana

ya que existe poca información respecto a su metabolismo durante la maduración. Se encontraron diferentes niveles de expresión de los transcritos a lo largo de la maduración poscosecha de frutos de guanábana. El aumento en la expresión de *NAD-MH* se pudo correlacionar con el aumento en la acidez titulable. En cambio, la expresión de *CSM* se mantuvo estable durante el proceso de maduración, lo que permitiría proponer que *NAD-MH* regula la síntesis de ácido málico y que el mismo es el ácido predominante durante la maduración de los frutos. Así mismo, se pudo correlacionar el aumento en la expresión de *EXP* con la disminución de la firmeza. Nuestros resultados también mostraron que la temperatura regula la expresión de los genes *NAD-MH* y *EXP*, en los cuales se ve disminuida su transcripción a T15. Los cambios en la expresión génica bajo los diferentes tratamientos explican el aumento en la acidez titulable durante la maduración de guanábana. Los datos obtenidos de los cambios en la textura de los frutos estudiados sugieren que la expresión de *EXP* está directamente relacionada con el ablandamiento en frutos de guanábana y que la aplicación de bajas temperaturas disminuye o suprime su expresión y por lo tanto, retarda el ablandamiento. El hallazgo más relevante de este estudio es la evidencia de que, a nivel transcripcional, T15 retarda la maduración y el ablandamiento en hasta 3 días sin afectar las características de calidad fisicoquímicas y organolépticas.

#### **4.7. Agradecimientos**

Este trabajo fue financiado por el FONDO SECTORIAL DE INVESTIGACIÓN PARA LA EDUCACIÓN a través del por el proyecto “Caracterización morfológica, bioquímica y genética de guanábana (*Annona muricata* L.)” CB-2014-01/242718.

Al Centro Nayarita de de Innovación y Transferencia de Tecnología (CENIT2) por facilitar la infraestructura y equipos para realizar la qPCR.

#### **4.8. Literatura citada**

Agravante, J. U., Matsui, T., y Kitagawa, H., 1991. Sugars and organic acids in ethanol treated and ethylene-treated banana fruits. The Japanese Society for Food Science and Technology. 38, 441–444.

- Albertini, M. V., Carcouet, E., Pailly, O., Gambotti, C., Luro, F., y Berti, L. 2006. Changes in organic acids and sugars during early stages of development of acidic and acidless citrus fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(21), 8335-8339.
- Araujo, W. L., Nunes-Nesi, A., Nikoloski, Z., Sweetlove, L. J., y Fernie, A. R. 2012. Metabolic control and regulation of the tricarboxylic acid cycle in photosynthetic and heterotrophic plant tissues. *Plant, Cell and Environment*. 35, 1–21.
- Badrie, N., y Schauss, A. G. 2010. Soursop (*Annona muricata* L.): composition, nutritional value, medicinal uses, and toxicology. In: *Bioactive foods in promoting health* (pp. 621-643).
- Bapat, V. A., Trivedi, P. K., Ghosh, A., Sane, V. A., Ganapathi, T. R., y Nath, P. 2010. Ripening of fleshy fruit: molecular insight and the role of ethylene. *Biotechnology advances*, 28(1), 94-107.
- Berüter J. 2004. Carbohydrate metabolism in two apple genotypes that differ in malate accumulation. *Journal of Plant Physiology*. 161,1011–1029.
- Bolívar-Fernández, N., Saucedo-Veloz, C., Solís-Pereira, S., y Sauri-Duch, E. 2009. Maduración de frutos de saramuyo (*Annona squamosa* L.) desarrollados en Yucatán, México. *Agrociencia*, 43(2), 133-141.
- Brady, C. 1987. Fruit ripening. *Annual Review of Plant Physiology* 38:155-178.
- Brady, C. 1992. Molecular approaches to understanding fruit ripening. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 20(2), 107-117.
- Brummell, D. A., Dal Cin, V., Lurie, S., Crisosto, C. H., y Labavitch, J. M. 2004. Cell wall metabolism during the development of chilling injury in cold-stored peach fruit: association of mealiness with arrested disassembly of cell wall pectins. *Journal of Experimental Botany*. 55(405), 2041-2052.
- Brummell, D. A., Harpster, M. H., Civello, P. M., Palys, J. M., Bennett, A. B., y Dunsmuir, P. 1999. Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *Plant Physiology*. 11, 2203–2216.

- Brummell, D. A., Howie, W. J., Ma, C., y Dunsmuir, P. 2002. Postharvest fruit quality of transgenic tomatoes suppressed in expression of a ripening-related expansin. *Postharvest Biology and Technology*. 25(2), 209-220.
- Callahan, A. M., Morgens, P. H., y Cohen R. A. 1993. Isolation and initial characterization of cDNAs for messenger RNAs regulated during peach fruit development. *Journal of the American Society Horticultural Science*. 118: 531–537.
- Canel, C., Bailey-Serres, J. N., y Roose, M. L. 1996. Molecular characterization of the mitochondrial citrate synthase gene of an acidless pummelo (*Citrus maxima*). *Plant Molecular Biology*. 31(1), 143-147.
- Cantu, D., Vicente, A. R., Greve, L. C., Dewey, F. M., Bennett, A.B., Labavitch, J.M., Powell, A.L.T., 2008. The intersection between cell wall disassembly, ripening, and fruit susceptibility to *Botrytis cinerea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.* 105, 859–864.
- Castillo-Ánimas, D., Varela-Hernández, G., Pérez-Salvador, B. R., y Pelayo-Zaldívar, C. 2005. Daños por frío en guanábana. Índice de corte y tratamientos postcosecha. *Revista Chapingo serie Horticultura*. 11: 51-57.
- Chen, F. X., Liu, X. H., Chen, L. S. 2009. Developmental changes in pulp organic acid concentration and activities of acid-metabolising enzymes during the fruit development of two loquat (*Eriobotrya japonica* L.) cultivars differing in fruit acidity. *Food Chemistry*. 114, 657–664.
- DeMan, M. J. 1999. *Principles of food chemistry*. Third edition. Aspen Publishers, Guelph, Ontario. 520 p.
- Diakou, P., Svanella, L., Raymond, P., Gaudillère, J. P., y Moing, A. 2000. Phosphoenolpyruvate carboxylase during grape berry development: protein level, enzyme activity and regulation. *Functional Plant Biology* 27, 221–229.
- Espinosa, I., Ortiz, R. I., Tovar, B., Mata, M., y Montalvo, E. 2013. Physiological and physicochemical behavior of soursop fruits refrigerated with 1-methylcyclopropene. *Journal of Food Quality* 36: 10-20.

- Etienne, A., Génard, M., Lobit, P., Mbeguié-A-Mbéguié, D., y Bugaud, C. 2013. What controls fleshy fruit acidity? A review of malate and citrate accumulation in fruit cells. *Journal of Experimental Botany*. 64, 1451–1469.
- Etienne, C., Moing, A., Dirlwanger, E., Raymond, P., Monet, R., y Rothan, C. 2002. Isolation and characterization of six peach cDNAs encoding key proteins in organic acid metabolism and solute accumulation: Involvement in regulating peach fruit acidity. *Physiologia Plantarum*. 114, 259–270.
- Famiani, F., Battistelli, A., Moscatello, S., Cruz-Castillo, J. G., y Walker, R. P. 2015. The organic acids that are accumulated in the flesh of fruits: occurrence, metabolism and factors affecting their contents-a review. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 21(2), 97-128.
- Famiani, F., Farinelli, D., Moscatello, S., Battistelli, A., Leegood, R. C., y Walker, R. P. 2016. The contribution of stored malate and citrate to the substrate requirements of metabolism of ripening peach (*Prunus persica* L. Batsch) flesh is negligible. Implications for the occurrence of phosphoenolpyruvate carboxykinase and gluconeogenesis. *Plant physiology and biochemistry*. 101, 33-42.
- Giovannoni J. J. 2001. Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annual Review of Plant Physiology*. 52:725-749.
- Giovannoni, J. J. 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell*. 16, S170–S180.
- Giovannoni, J. J. 2007. Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Current opinion in plant biology*. 10(3), 283-289.
- González-Agüero, M., Tejerina Pardo, L., Zamudio, M. S., Contreras, C., Undurraga, P., y Defilippi, B. G. 2016. The unusual acid-accumulating behavior during ripening of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) is linked to changes in transcription and enzyme activity related to citric and malic acid metabolism. *Molecules*, 21(5), 398.
- Goodenough, P. W., Prosser, I. M., Young, K., 1985. NADP-linked malic enzyme and malate metabolism in ageing tomato fruit. *Phytochemistry* 24, 1157–1162.

- Gutierrez, A., Burgos, J. A., y Molto, E. 2007. Pre-commercial sorting line for peaches firmness assessment. *Journal of Food Engineering*. 81, 721–727.
- Gutierrez, M., La Hoz, J. M., Sola, M. M., Pascual, L., y Vargas, A. M. 1994. Postharvest changes in total soluble solids and tissue pH of cherimoya fruit stored at chilling and non-chilling temperatures. *Journal of Horticultural Science*. 69, 459–463.
- Halestrap, A. P. 1975. The mitochondrial pyruvate carrier. Kinetics and specificity for substrates and inhibitors. *Biochemical Journal* 148, 85.
- Harrison, E. P., McQueen-Mason, S. J., y Manning, K., 2001. Expression of six expansin genes in relation to extension activity in developing strawberry fruit. *Journal of Experimental Botany*. 52, 1437–1446.
- Hayama, H., Ito, A., Takaya, M., y Kashimura, Y. 2003. Identification of a new expansin gene closely associated with peach fruit softening. *Postharvest Biology Technology*. 29, 1–10.
- Hiwasa, K., Rose, J. K. C., Nakano, R., Inaba, A., Kubo, Y. 2003. Differential expression of seven expansin genes during growth and ripening of pear fruit. *Physiologia Plantarum*. 117, 564–572.
- Iannetta, P. P., Escobar, N. M., Ross, H. A., Souleyre, E. J., Hancock, R. D., Witte, C. P., y Davies, H. V. 2004. Identification, cloning and expression analysis of strawberry (*Fragaria × ananassa*) mitochondrial citrate synthase and mitochondrial malate dehydrogenase. *Physiologia Plantarum*. 121(1), 15-26.
- Jiménez-Zurita, J. O., Balois-Morales, R., Alia-Tejacal, I., Juárez-López, P., Sumaya-Martínez, M. T., y Bello-Lara, J. E. 2016. Caracterización de frutos de guanabana (*Annona muricata* L.) en Tepic, Nayarit, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(6). 1261-1270
- Jiménez-Zurita, J. O., Balois-Morales, R., Alia-Tejacal, I., Sánchez Herrera, L. M., Jiménez-Ruiz, E. I., Bello-Lara, J. E., García-Paredes, J.D.y Juárez-López, P. 2017. Cold Storage of Two Selections of Soursop (*Annona muricata* L.) in Nayarit, Mexico. *Journal of Food Quality*.

- Kader, A. A. 2002. Postharvest technology of horticultural crops. Agriculture and Natural Resources. Third edition. University of California, Davis, CA. 535 p.
- Kader, A. A. 2008. Flavor quality of fruits and vegetables. Journal of the Science of Food and Agriculture. 88, 1863–1868.
- Kortstee, A. J., Appeldoorn, N. J. G., Oortwijn, M. E. P., y Visser, R. G. F., 2007. Differences in regulation of carbohydrate metabolism during early fruit development between domesticated tomato and two wild relatives. Planta 226, 929–939
- Lakso, A. N., Kliewer, W. M. 1975. The influence of temperature on malic acid metabolism in grape berries: I. Enzyme responses 1. Plant Physiology. 56, 370.
- León Méndez, G., Granados Conde, C., Fortich, O., y del Rosario, M. 2016. Caracterización de la pulpa de *Annona muricata* L. cultivada en el Norte del Departamento de Bolívar-Colombia. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 21(4), 1-9.
- Li, C. R., Shen, W. B., Lu, W. J., Jiang, Y. M., Xie, J. H., y Chen, J. Y. 2009. 1-MCP delayed softening and affected expression of XET and EXP genes in harvested cherimoya fruit. Postharvest biology and technology, 52(3), 254-259.
- Li, M., Li, D., Feng, F., Zhang, S., Ma, F., y Cheng, L. 2016. Proteomic analysis reveals dynamic regulation of fruit development and sugar and acid accumulation in apple. Journal of Experimental Botany. 67(17), 5145-5157.
- Li, X., Xu, C., Korban, S. S., y Chen, K. 2010. Regulatory mechanisms of textural changes in ripening fruits. Critical Reviews in Plant Sciences. 29(4), 222-243.
- Lima, M. A. C. D., Alves, R. E., y Filgueiras, H. A. C. 2006. Changes related to softening of soursop during postharvest maturation. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 41(12), 1707-1713.
- Lima, M. C., y Alves, R. E. 2011. Soursop (*Annona muricata* L.). In: Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits: Mangosteen to White Sapote (pp. 363-392e).

- Márquez Cardozo, C. J., Villacorta Lozano, V., Yepes Betancur, D. P., Velásquez, C., y Cartagena Valenzuela, J. R. 2012. Physiological and Physico-Chemical Characterization of the Soursop Fruit (*Annona muricata* L. cv. Elita). *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*. 65(1), 6477-6486.
- Martínez-González, M. E., Balois-Morales, R., Alia-Tejacal, I., Cortes-Cruz, M. A., Palomino-Hermosillo, Y. A., y López-Gúzman, G. G. 2017. Postcosecha de frutos: maduración y cambios bioquímicos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, (19), 4075-4087.
- Matasci, N., Hung, L. H., Yan, Z., Carpenter, E. J., Wickett, N. J., Mirarab, S., Nguyen, N., Warnow, T., Ayyampalayam, S., Barker, M., Burleigh, J. G., Gitzendanner, M. A., Wafula, E., Der, J. P., ... y Burleigh, J. G. 2014. Data access for the 1,000 Plants (1KP) project. *Gigascience*. 3(1), 17.
- Mattoo, A., y Modi, V. Citrate cleavage enzyme in mango fruit. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1970, 39, 895–904.
- McQueen-Mason, S., y Cosgrove, D. J. 1994. Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91(14), 6574-6578.
- Moing, A., Renaud, C., Gaudillère, M., Raymond, P., Roudeillac, P., y Denoyes-Rothan, B. 2001. Biochemical changes during fruit development of four strawberry cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126(4), 394-403.
- Moore, S., Vrebalov, J., Payton, P., y Giovannoni, J. 2002. Use of genomics tools to isolate key ripening genes and analyse fruit maturation in tomato. *Journal of experimental botany*, 53(377), 2023-2030.
- Morgan, M. J., Osorio, S., Gehl, B., Baxter, C. J., Kruger, N. J., Ratcliffe, R. G., Fernie, A. R., y Sweetlove, L. J. 2013. Metabolic engineering of tomato fruit organic acid content guided by biochemical analysis of an introgression line. *Plant Physiology*. 161, 397–407.

- Muñoz, T., Sanchez-Ballesta, M. T., Ruiz-Cabello, J., Escribano, M. I., y Merodio, C. 2004. The acid metabolism of *Annona* fruit during ripening. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 79(3), 472-478.
- Omoifo, C. O. 2004. Biochemical composition of soursop fruit, *Annona muricata* L., as affected by two harvest seasons. *Tropical Agricultural Research and Extension*. 7, 1-8.
- Pareek, S., Yahia, E. M., Pareek, O. P., y Kaushik, R. A. 2011. Postharvest physiology and technology of *Annona* fruits. *Food Research International*. 44(7), 1741-1751.
- Paull, R. E. 1982. Postharvest variation in composition of soursop (*Annona muricata* L.) fruit in relation to respiration and ethylene production. *Journal American Society for Horticultural Science*. 107:582-585.
- Paull, R. E. 1998. Soursop. In P. E. Shaw, H. T. Chan, Jr. y S. Nagy, (Eds.), *Tropical and Subtropical Fruits* (pp. 386–400). Auburndale, FL:
- Paull, R. E., Deputy, J. C., y Chen, N. J. 1983. Changes in organic acids, sugars and headspace volatiles during fruit ripening of soursop (*Annona muricata* L.). *Journal of American Society Horticulture Science*, 108, 931–934.
- Paull, R. E., Irikura, B., Wu, P., Turano, H., Chen, N. J., Blas, A., Fellman, J. K., Gschwend, A. R., Wai, C. M., Yu, Q., Presting, G., Alam, M., y Ming, R. 2008. Fruit development, ripening and quality related genes in the papaya genome. *Tropical Plant Biology*, 1(3-4), 246-277.
- Pavez, L., Hödar, C., Olivares, F., González, M., y Cambiazo, V. 2013. Effects of postharvest treatments on gene expression in *Prunus persica* fruit: normal and altered ripening. *Postharvest biology and technology*. 75, 125-134.
- Pereira, G. E., Gaudillere, J. P., Pieri, P., Hilbert, G., Maucourt, M., Deborde, C., Moing, A., y Rolin, D. 2006. Microclimate influence on mineral and metabolic profiles of grape berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 6765–6775.
- Perotti, V., Moreno, A., y Podestá, F. 2014. Physiological aspects of fruit ripening: The mitochondrial connection. *Mitochondrion*. 17, 1–6.

- Pfaffl, M. W. 2007. Relative quantification. In Real-time PCR (pp. 89-108). Taylor & Francis.
- Rienth, M., Torregrosa, L., Luchaire, N., Chatbanyong, R., Lecourieux, D., Kelly, M. T., y Romieu, C. 2014. Day and night heat stress trigger different transcriptomic responses in green and ripening grapevine (*Vitis vinifera*) fruit. BMC Plant Biology, 14, 108. doi: 10.1186/1471-2229-14-108
- Rose, J. K., y Bennett, A. B. 1999. Cooperative disassembly of the cellulose–xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. Trends in plant science. 4(5), 176-183.
- Rose, J. K. C., Lee, H. H., y Bennett, A. B. 1997. Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A. 94, 5955–5960.
- Ruffner, H. P. 1982. Metabolism of tartaric and malic acids in Vitis: a review – Part B. Vitis 21, 346–358.
- Rugkong, A., Rose, J. K., Lee, S. J., Giovannoni, J. J., O’Neill, M. A. y Watkins, C. B. 2010. Cell wall metabolism in cold-stored tomato fruit. Postharvest Biology and Technology, 57(2), 106-113.
- Sadka, A., Dahan, E., Or, E., Roose, M. L.; Marsh, K. B. y Cohen, L. 2001. Comparative analysis of mitochondrial citrate synthase gene structure, transcript level and enzymatic activity in acidless and acid-containing Citrus varieties. Functional Plant Biology, 28, 383–390.
- Sane, V. A., Chourasia, A., y Nath, P. 2005. Softening in mango (*Mangifera indica* cv. Dashehari) is correlated with the expression of an early ethylene responsive, ripening related expansin gene *MiExpA1*. Postharvest Biology Technology. 38, 223–230.
- Sane, V. A., Sane, A. P., y Nath, P., 2007. Multiple forms of *expansin* genes are expressed during banana fruit ripening and development. Postharvest Biology Technology. 45, 184–192.

- Saradhuldhath, P., y Paull, R. E. 2007. Pineapple organic acid metabolism and accumulation during fruit development. *Scientia Horticulturae*. 112, 297–303.
- Selvaraj, Y., y Kumar, R. 1989. Pyruvate kinase activity in ripening mango (*Mangifera indica* L.) fruit. *Journal of Food Science and Technology*. Mysore 26, 228–229.
- Shen, W. B., Li, C. R., Chen, J. Y., Xie, J. H., y Lu, W. J. 2009. Expansin gene expression in cherimoya fruit is correlated with flesh firmness during fruit ripening and softening. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 84(3), 333-339.
- Singh, S. P. y Singh, Z., 2008. Major flavor components in some commercial cultivars of Japanese plum. *Journal- American Pomological Society*. Soc. 62, 185–190.
- Sweetman, C., Deluc, L. G., Cramer, G. R., Ford, C. M., y Soole, K. L. 2009. Regulation of malate metabolism in grape berry and other developing fruits. *Phytochemistry*. 70, 1329–1344.
- Tang, M., Bie, Z., Wub, M., Yi, H., y Feng, J. 2010. Changes in organic acids and acid metabolism enzymes in melon fruit during development. *Scientia Horticulturae*. 123, 360–365.
- Tsay, L. M. y Wu, M. C. 1990. Studies on the physico-chemical properties of post harvest sugar apple. *Acta Horticulturae*, 269, 241±7.
- Tucker, G. A. 1993. Introduction. In: Seymour, G. B., Taylor, J. E., Tucker, G. A. (eds) *Biochemistry of Fruit Ripening*. Chapman and Hall, London, pp 3–43.
- Vishnu Prasanna, K. N., Sudhakar Rao, D. V., y Krishnamurthy, S. 2000. Effect of storage temperature on ripening and quality of custard apple (*Annona squamosa* L.) fruits. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 75(5), 546-550.
- Wu, W., y Chen, F. 2016. Malate transportation and accumulation in fruit cell. *Endocytobiosis and Cell Research*. 27(2), 107-112.
- Yao, Y., Li, M., Liu, Z., You, C., Wang, D., Zhai, H., y Hao Y. 2009. Molecular cloning of three malic acid related genes MdPEPC, MdVHA-A, MdcyME and their expression analysis in apple fruits. *Scientia Horticulturae* 122, 404–408.

## CONCLUSIONES GENERALES

Nuestro estudio ha proporcionado información de los perfiles de expresión de algunos genes relacionados con la maduración de frutos de guanábana bajo diferentes condiciones postcosecha. El análisis de expresión diferencial nos permitió identificar genes que están involucrados en dos eventos importantes en la maduración de frutos de guanábana, que son el ablandamiento y la acumulación de ácidos orgánicos. La información obtenida nos permitió observar que el almacenamiento en frío modificó la abundancia del gen *EXP* relacionado con el ablandamiento, pero no presentó influencia sobre la expresión de los genes relacionados con la síntesis de ácidos orgánicos. Es decir, que las expansinas juegan un papel importante en el ablandamiento del fruto de guanábana, ya que observamos que su expresión aumenta la maduración. Sin embargo, es posible disminuir su acción aplicando bajas temperaturas. Los frutos almacenados a 15 °C durante su maduración mostraron ser menos blandos que los almacenados a temperatura ambiente y conservaron su calidad poscosecha. También pudimos establecer que el aumento en la acidez durante la maduración, viene dada por la acumulación del ácido málico, sin que esta se vea afectada por la temperatura de almacenamiento. Y finalmente, observamos que el ácido cítrico parece no tener una contribución significativa en la acidez del fruto de guanábana, indistintamente de la temperatura a la que se almacenen los frutos durante su maduración.

Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para comprender el efecto de la temperatura sobre otras rutas metabólicas y desarrollar aplicaciones prácticas de manejo postcosecha para reducir las pérdidas. Esto podría impactar en la producción regional para aumentar la vida de anaquel y mantener la calidad de los frutos.

## **PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES**

Este estudio ha explorado una nueva estrategia para prolongar la vida útil de frutos de guanábana y ha aportado nueva información sobre la comprensión de la regulación y la expresión de genes durante la maduración y ablandamiento. Sin embargo, es necesario realizar más experimentos para iluminar el mecanismo aún desconocido de la regulación transcripcional durante la maduración de los frutos.

El objetivo de este estudio fue evaluar la expresión diferencial de genes involucrados en el ablandamiento y las rutas de los ácidos orgánicos bajo diferentes condiciones de temperatura en el almacenamiento, por lo tanto, futuros experimentos para caracterizar los genes, la actividad enzimática, el transporte y la acumulación de los metabolitos relacionados con las rutas de los ácidos orgánicos y el ablandamiento con mayor detalle, podrían ayudar a ampliar la comprensión de las rutas biosintéticas de la maduración del fruto. Sería de interés continuar con el estudio de genes relacionados al transporte vacuolar de estos ácidos y cómo estos estarían siendo regulados por la temperatura y la respiración para así complementar la hipótesis de que la acumulación de los ácidos orgánicos sería por el almacenamiento vacuolar. Por otra parte, sería de ayuda determinar si es que existe algún tipo de regulación post-traducciona que afectaría la actividad enzimática cuando se somete a bajas temperaturas.

## CURRICULUM VITAE

Mónica Elizabeth Martínez González nacida en Tepic, Nayarit el 11 de septiembre de 1977. Egresó del Instituto Tecnológico de Tepic en el año 2000 como Ingeniero Bioquímico en Alimentos. Trabajó cinco años en la industria exportadora de camarón portando una certificación HACCP otorgada por la *National Oceanic and Atmospheric Administration* del Dpto. de Comercio de E.E. U.U. Ha sido docente de materias en el área de las Ciencias Exactas y de inglés. Maestra en Ciencias Biológico Agropecuarias en el Área de Ciencias Agrícolas con Mención Honorífica por la Universidad Autónoma de Nayarit. Se ha desempeñado como Auxiliar de Laboratorio en la Unidad de Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma de Nayarit. Sustentante de esta tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias Biológico Agropecuarias en el Área de Ciencias Agrícolas. Primera autora de dos artículos de revisión publicados en la Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. Ha colaborado en proyectos de investigación nacionales. Ha participado en dos congresos internacionales, simposios y jornadas científicas. Cuenta con 23 cursos, capacitaciones y talleres nacionales e internacionales. Ha divulgado la ciencia a través de cuatro pláticas a los niveles medio superior y superior.