



Secretaría de Educación Pública



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

“Efecto del Silenciamiento de *TomloxB* sobre la maduración de frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*)”

Tesis

Que para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

Presenta:

Elizabeth León García

Asesores:

Dr. Hugo Sergio García Galindo

Dr. Miguel Ángel Gómez Lim

**“EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE *TomloxB* SOBRE LA MADURACIÓN
DE FRUTOS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*)”**

Por:

M.C. Elizabeth León García

Trabajo de tesis propuesto a la

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN ALIMENTOS

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ

Como requerimiento parcial para

Obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

FEBRERO 2017

*A mi amado esposo y a mi hijo
Solo Dios sabe lo que haría sin uds*

RECONOCIMIENTOS

A Jesús, Señor de todo. Creador de un mundo fascinante al cual la ciencia busca investigar.
Por hacer de los genes, un lenguaje perfecto.

A mis padres y mi hermana; a mi tía. Mi familia materna, la cual ha sido un pilar en mi vida, por su incondicional cuidado para mi hijo. A mi suegra por su cariño y apoyo ilimitado con mi hijo.

A mi gran y querida familia en Irapuato. A mis tíos y mis primos: por cuidarme, quererme y alegrarme en todo tiempo. A mis niñas, las cuales fueron un dulce bálsamo en tiempos de nostalgia. A mi tía Rosy y a mi tío Arturo, por su favor y absoluto apoyo. Por tratarme como a una hija

A mis hermanos y amigos que siempre me levantaban con sus oraciones y tenían una palabra de ánimo cuando atravesé tiempos difíciles. Por su aceptación, su fe y cariño.

A mis compañeros de laboratorio, los que me ayudaron y aconsejaron; los que rieron conmigo y los que me respaldaron en todo tiempo; los viejos y los nuevos; los foráneos y los de siempre; a mis residentes; los que me acompañaron al principio y los que aún quedan en nuestro segundo hogar, por siempre amado Laboratorio de Post-cosecha

A mis amigos de Irapuato. Por enseñarme, acompañarme y animarme cuando viví entre ellos y lejos de mi hogar. Adelantaron mis pasos al conocimiento y me favorecieron con su amistad.

A mis asesores el Dr. Hugo Sergio García Galindo y el Dr. Miguel Ángel Gómez Lim por auspiciar esta tesis. Por dirigirme, enseñarme, regañarme y guiarme a lo largo de este tiempo. Al M. C Javier De La Cruz Medina por su incondicional apoyo. Mi eterno agradecimiento a todos ellos.

AL CONACYT, por hacer posible este sueño. Por su financiamiento económico

RESUMEN

León García, Elizabeth. Doctorado en Ciencias en Alimentos. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. Enero, 2017. "Efecto del silenciamiento de *TomloxB* sobre la maduración de frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*)". Asesores: Dr. Hugo Sergio García Galindo y Dr. Miguel Ángel Gómez Lim.

Las lipoxigenasas son enzimas que catalizan la hidroperoxidación de ácidos grasos poliinsaturados de la membrana. En tomate, se han encontrado 5 isoformas: *Tomlox A, B, C, D* y *E*, las cuales son diferencialmente reguladas. Específicamente, la *TomloxB* se expresa en el fruto y se cree que su acción contribuye a la pérdida de integridad de la membrana y daño oxidativo, lo que propicia la maduración y posterior senescencia del fruto. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del silenciamiento del gen *TomloxB* sobre la fisiología postcosecha del tomate. Para esto se llevó a cabo la transformación de explantes de tomate (*Solanum lycopersicum* var *TA234*) vía *A. tumefaciens*, con el plásmido pCAMBIA 2301 que contenía un inserto del gen *TomloxB* en antisentido, al gen reportero GUS (*uidA*) y al gen de resistencia a Kanamicina (*nptII*). La regeneración de las plantas se hizo por medio de Cultivo de Tejidos Vegetales y la comprobación de la transformación por el ensayo de GUS, PCR, RT-PCR y Southern Blot.

Se obtuvieron 12 líneas transgénicas con una eficacia de transformación del 13.8 %. Durante la evaluación post-cosecha no se encontraron diferencias fenotípicas indeseables, siendo similares al fruto silvestre. Los frutos transformados cosechados en los estados *Breaker* y *Turning* evidenciaron un aumento en la vida post-cosecha (hasta 60 días) permaneciendo en el estado Red. Como resultado del silenciamiento, la actividad de *TomloxB* fue disminuida, y hubo un menor consumo en sus principales sustratos, ácido linoleico y linolénico, lo que propició una mayor firmeza y una reducción en la pérdida de peso, en comparación con los frutos testigo. La luminosidad fue más alta en los frutos transgénicos. El silenciamiento del gen influyó en la producción de etileno, retrasando su pico máximo al día 8; esto propició modificaciones en las actividades enzimáticas de PG y PME, así como en la síntesis de licopeno. El silenciamiento del gen *TomloxB* es una alternativa eficiente para reducir las pérdidas post-cosecha, ampliar las oportunidades de comercialización, exportación y almacenamiento. Esto dará beneficios a la cadena productiva del tomate.

ABSTRACT

León García, Elizabeth. Doctoral Program in Food Science. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. Februray, 2017. "Silencing of *TomloxB* gene on ripening of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruits". Advisors: Dr. Hugo Sergio García Galindo and Dr. Miguel Ángel Gómez Lim.

Lipoxygenases catalyze the hydroperoxidation of polyunsaturated fatty acids which are structural components in cell membrane. Tomato contains at least six encoding lipoxygenase genes: Tomlox A, B, C, D, E and F, and they are differentially controlled. Specifically, TomloxB is expressed in fruit and is possible that its action has been implicated in membrane deterioration and oxidative damage, carried into the ripening fruit and finally senescence. The goal of this work was to evaluate the effect of *TomloxB* gen silencing upon post-harvest life. To achieve this we produced transgenic tomato plants (*Solanum lycopersicum* var TA234) via *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 carrying a binary vector pCAMBIA 2301 which contains a neomycin phosphotransferase (*nptII*) gene and a β -glucuronidase (*uidA*) reporter gene and the *TomloxB* antisense constructs. The transformed plants were tested positive for GUS assay in leaves. *TomloxB* antisense gene was detected by PCR and RT-PCR. Southern blot analysis showed the integration of *uidA* into the plant genome.

A stable transformation with 13.8 % efficiency was achieved, which means 12 transgenic lines. During post-harvest evaluation, there were no detectable phenotypic differences between transgenic plants and wild-type tomato plants. Transgenic fruits harvested in *Breaker* and *Turning* stage showed a larger post-harvest life (until 60 d) than wild-type. As result of silencing process, TomloxB activity decreased and there was a lower consumption of linoleic and linolenic acid, its main substrates. This action allowed a greater firmness and a reduction in loss of weight in compared with the wild-type. The transgenic tomato fruits showed higher luminosity than wild-type fruits. The climacteric peak was reached at day 8 in transgenic fruits, which represents a 6 days' delay in comparison with wild-type fruits. PME, PG activities and lycopene synthesis were modified by ethylene influence. *TomloxB* gene silencing is an effective choice to reduce post-harvest losses, to expand trade opportunities, exports and storage. This could improve tomato productive chain.

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABLAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
I INTRODUCCIÓN	1
II ANTECEDENTES	3
2.1. Origen, domesticación y difusión	3
2.2. Evolución y taxonomía	3
2.3. Descripción botánica del tomate	4
2.4. Importancia económica	6
2.5. Pérdidas postcosecha	9
2.5.1 La importancia económica de las pérdidas postcosecha	10
2.5.2 Factores que propician las pérdidas postcosecha	11
2.6. Daños mecánicos y sus efectos fisiológicos	11
2.7. Principales controles de prevención de pérdidas postcosecha	12
2.8. Manejo Postcosecha	12
2.8.1 Temperatura de almacenamiento	13
2.8.2 Atmósferas modificadas y controladas en tomate	13
2.8.3 Otros tratamientos postcosecha en tomate	14
2.9. Cambios físicos y químicos durante la maduración	15
2.9.1 Ablandamiento	15
2.9.2 Composición de la pared celular y enzimas asociadas al ablandamiento	16
2.9.3 Radicales libres en el ablandamiento de la pared celular	19
2.9.4 Otras enzimas asociadas a la maduración en tomate	19
2.10. Enzimas LOX en la maduración	20
2.10.1 Nomenclatura y función	21
2.10.2 Localización intracelular de LOX y sus posibles funciones	23
2.10.3 Función de las LOX en las membranas	26
2.11. Interrelación de LOX y etileno	26
2.12. La LOX en la respuesta a heridas y ataques de herbívoros	28
2.13. Actividad de LOX en Tomate	30
2.14. Trabajos de silenciamiento de <i>TomloxB</i> en tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	31
2.15. Conversión a azúcares y producción de ácidos orgánicos	32

2.16. Producción de pigmentos	33
2.16.1 Licopeno	33
2.17. Respiración	35
2.18. El rol del etileno como hormona	36
2.19. Silenciamiento de genes por RNA de interferencia	37
2.20. Transformaciones genéticas en tomate	39
2.21. <i>Agrobacterium</i>	40
2.21.1. Procesamiento de transferencia de T- DNA	41
2.22. Cultivo de Tejidos Vegetales	43
2.22.1. Organogénesis directa	43
2.22.2. Embriogénesis somática	44
2.22.3. Factores que influncian en la regeneración in vitro.	45
2.22.4. Reguladores del crecimiento en plantas	47
2.23. Síntesis de antecedentes	48
III. JUSTIFICACION	49
IV. HIPÓTESIS	49
V. OBJETIVO GENERAL	50
5.1 Objetivos Específicos	50
VI MATERIALES Y METODOS	51
6.1. Material vegetal y medios de cultivo	51
6.2. Protocolo de esterilización de materiales	51
6.3. Protocolo de esterilización de desechos y bioseguridad	52
6.4. Protocolo de asepsia de semillas	52
6.5. Corte de explantes	52
6.6. Cepa de <i>Agrobacterium</i>	52
6.6.1. Preparación del preinóculo	52
6.6.2. Preparación del inóculo	53
6.7. Vector de clonación y secuencia de <i>TomloxB</i> en antisentido	53
6.8. Transformación genética	53
6.9. Subcultivos <i>in vitro</i>	54
6.10. Protocolo de adaptación a tierra	54
6.11. Subcultivos en tierra	55
6.11.1. Acondicionamiento a invernadero	55
6.12. Obtención del fruto	55
6.13. Parámetros fisiológicos evaluados	56
6.13.1 Sólidos solubles.	56

6.13.2. Acidez titulable	52
6.13.3. Valor de pH-	56
6.13.4. Color	57
6.13.5. Firmeza	57
6.13.6. Pérdida de peso	57
6.13.7. Velocidad de producción de etileno (VPE) y Producción de CO2	57
6.13.8. Actividad de LOX	58
6.13.8.1. Preparación del extracto	58
6.13.8.2. Preparación de la solución sustrato	58
6.13.8.3. Reacción	58
6.13.9. Actividad de la Pectinmetilesterasa	59
6.13.10. Actividad de la Poligalacturonasa	59
6.13.11. Determinación de licopeno	60
6.13.12. Determinación de ácidos grasos	60
6.14. Técnicas Moleculares	61
6.14.1. Extracción de DNA	61
6.14.2. Aislamiento de RNA	62
6.14.3. PCR	62
6.14.4. Técnica del Southern Blot	63
6.14.5. RT-PCR	64
6.15. Análisis estadístico	64
VII RESULTADOS Y DISCUSION	65
7.1. Transformación	65
7.2. Sub-cultivos	65
7.3. Ensayo Histoquímico de GUS	71
7.4. Comprobacion molecular	72
7.5. RT-PCR	75
7.6. Monitoreo de la vida post-cosecha	75
7.7. Actividad de LOX	76
7.8. Determinación del Perfil lipídico de la Membrana	78
7.9. Determinación de ácido linoleico y linolénico	79
7.10. Firmeza	81
7.11. Producción de Etileno y CO2	82
7.12. Actividad de poligalacturonasa	84
7.13. Actividad de pectinmetilesterasa	86
7.14. Determinación de Licopeno	88
7.15. Color	89
7.16 Determinación de pH y Acidez.	91
7.17. Determinación de sólidos solubles.	92
7.18. Pérdida de peso	94

VIII CONCLUSIONES	96
IX RECOMENDACIONES	98
X BIBLIOGRAFIA	99
XI ANEXOS	122
11.1 Anexo 1 Medios de cultivo y soluciones utilizadas en cultivo de tejidos Vegetales	123
11.2 Anexo 2. Solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M	128
11.3. Anexo 3 Curva patrón Bradford	129
11.4 Anexo 4. Curva patrón de ácido galacturónico	130
11.5. Anexo 5. Curva patrón de Licopeno	131
11.6. Anexo 6 Soluciones requeridas para la técnica de Southern Blot	132

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1. Distintas variedades de tomate	4
FIGURA 2.2. Anatomía de una planta de tomate	5
FIGURA 2.3. Anatomía del fruto de tomate	6
FIGURA 2.4. Producción mundial de tomate (Ton) en 2014	7
FIGURA 2.5. Exportación mundial de tomate (Ton) en 2013	8
FIGURA 2.6. Importación mundial de tomate (Ton) en 2013	8
FIGURA 2.7 Distribución de la producción mexicana de tomate (Ton) en 2015	9
FIGURA 2.8. Posibles roles de LOX en el metabolismo	22
FIGURA 2.9. Funciones de LOX en diferentes procesos de desarrollo de la planta	24
FIGURA 2.10. Localización intracelular de LOX	25
FIGURA 2.11. Mecanismo propuesto de interrelación de LOX en la biosíntesis de Etileno	27
FIGURA 2.12. Biosíntesis del Ácido Jasmónico.	29
FIGURA 2.13. Estructura de 3 carotenoides de importancia en el tomate	35
FIGURA 2.14. Biogénesis del RNAi	39
FIGURA 2.15. Representación esquemática del proceso de transformación de plantas mediada por <i>Agrobacterium</i>	42
FIGURA 6.1. Construcción del vector pCambia 2301 con el gen <i>TomloxB</i> en antisentido	53
FIGURA 6.2. Carta de clasificación del color en Tomate del Departamento de Agricultura de Estados Unidos.	56
FIGURA 7.1.Explantes cotiledonarios de tomate.	65
FIGURA 7.2. Explantes cotiledonarios vistos en estereoscopio	66
FIGURA 7.3. Comparación de explantes testigo (izquierda) y transformados (derecha) a los 30 días de la transformación.	67
FIGURA 7.4. Organogénesis directa presentada en explantes testigo	67
FIGURA 7.5. Organogenesis directa (izquierda) y embriogenesis somática presentada en explantes transformados	67

FIGURA 7.6. Comparación de explantes testigo (izquierda) y transformados (derecha) a los 36 días de la transformación.	68
FIGURA 7.7 Explantes transformados a los 76 días de transformación mostrando diferente nivel de evolución	68
FIGURA 7.8. Generación de brotes a partir de explantes transformados a los 87 días de la transformación	69
FIGURA 7.9. Plántulas regeneradas <i>in vitro</i> (izquierda) y acondicionamiento en tierra de (centro y derecha) explantes testigo.	69
FIGURA 7.10. Plántulas transgénicas a los 113 días de la transformación (Izquierda). Explantes transformados aun sin regenerar plántulas (derecha y abajo)	70
FIGURA 7.11. (Arriba) Plantas transgénicas en etapa de enraizamiento y (Abajo) planta testigo en invernadero.	71
FIGURA 7.12. Ensayo histoquímico de GUS positivo en hoja, raíz, flor y fruto	72
FIGURA 7.13. PCR realizada en tejido de hojas de 12 líneas transgénicas transformadas con el gen <i>Tomlox B</i> en orientación antisentido.	73
FIGURA 7.14 Análisis por Southern Blot de la presencia del gen <i>Tomlox B</i> en orientación antisentido dentro del genoma de la planta	73
FIGURA 7.15. Expresión relativa de <i>TomloxB</i> de 3 líneas transgénicas comparada con el fenotipo silvestre. Letras diferentes indican significancia ($P < 0.05$)	74
FIGURA 7.16. Frutos transgénicos mantenidos durante 40 días a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$	75
FIGURA 7.17. Frutos testigo (arriba) y transgénicos (abajo) en el día del corte (izquierda), a los 6 días (medio) y a los 14 días (derecha).	76
FIGURA 7.18. Actividad de LOX de 3 líneas transgénicas y el testigo, determinada en 4 estadíos de maduración.	77
FIGURA 7.19. Perfil de ácidos grasos en frutos de tomate	78
FIGURA 7.20. Contenido de ácido linoleico (arriba) y ácido linolénico (abajo) de 3 líneas transgénicas y silvestre determinado en 3 estados de maduración	79
FIGURA 7.21. Determinación de firmeza en frutos de 3 líneas transgénicas y el silvestre	81
FIGURA 7.22. Producción de etileno determinado en frutos en el estado <i>Breaker</i> de 3 líneas transgénicas y la silvestre.	83
FIGURA 7.23. Producción de CO_2 determinado en frutos en el estado <i>Breaker</i> de 3 líneas transgénicas y la silvestre	83

FIGURA 7.24. Actividad de poligalacturonasa evaluada en 4 estadíos de maduración en 3 líneas transgénicas y la silvestre	84
FIGURA 7.25. Actividad de pectinmetilesterasa evaluada en 4 estadíos de maduración en 3 líneas transgénicas y el testigo	86
FIGURA 7.26. Producción de licopeno determinado en 4 líneas transgénicas y la silvestre en 3 estadíos de maduración	88
FIGURA 7.27. Determinación de °Hue durante la maduración de 4 líneas transgénicas y la silvestre.	89
FIGURA 7.28. Determinación de la saturación de color durante la maduración de 4 líneas transgénicas y la silvestre.	90
FIGURA 7.29. Determinación de luminosidad durante la maduración de 4 líneas transgénicas y la silvestre.	91
FIGURA 7.30. Valores de pH durante la maduración de tomate en 4 líneas transgénicas y la silvestre	92
FIGURA 7.31. Determinación del % acidez durante la maduración de tomate en 4 líneas transgénicas y la silvestre	92
FIGURA 7.32. Determinación del % de sólidos solubles durante la maduración de tomate en 4 líneas transgénicas y la silvestre.	93
FIGURA 7.33. Determinación de % Pérdida de peso en cuatro líneas transgénicas. Frutos cosechados en estado <i>Breaker</i> .	95
FIGURA 11. 1. Curva patrón de Bradford	129
FIGURA 11.2. Curva patrón de ácido galacturónico	130
FIGURA 11.3. Curva patrón de licopeno	131

LISTA DE TABLAS

TABLA 2.1. Estimación de las pérdidas postcosecha de tomate en Egipto	11
TABLA 2.2. Distribución del porcentaje de pérdidas postcosecha en países desarrollados y en vías de desarrollo	11
TABLA 2.3. Productos del metabolismo de LOX con una actividad conocida	23
TABLA 2.4. LOX identificados en Tomate	31
TABLA 2.5. Genes relacionados a la síntesis y percepción del etileno durante la maduración de tomate.	37
TABLA 11.1. Solución Tween 20 al 0.1%	123
TABLA 11.2. Medio MSO	123
TABLA 11.3. Medio KCMS	124
TABLA 11.4. Medio YM.	124
TABLA 11.5. Medio MS 0.2%	125
TABLA 11.6. MEDIO 1Z	125
TABLA 11.7. Medio 2Z	126
TABLA 11.8. Medio de enraizamiento	126
TABLA 11.9. Composición del fertilizante	127
TABLA 11.10. Preparación de una solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M	128
TABLA 11.11. Solución desnaturalizante	132
TABLA 11.12. Solución neutralizante	132
TABLA 11.13 Solución 20 X SSC	132
TABLA 11.14. Solución de prehibridación	132

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxiribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
ACC	Acido aminociclopropanocarboxílico
JA	acido jasmónico
ATP	Adenosi Trifosfato
BAP	Benzil aminopurina
°Bx	grados brix
° C	grados centígrados
C*	Croma
Ca	Calcio
CA	Atmósferas Controladas
Cb	Carbenicilina
Cm	Cefotaxima
cm	centímetro
CTV	Cultivo de tejidos vegetales
2, 4-D	2,4 ácido diclorofenoxiacético
DF	Daño por frío
FDA	Food and Drug Administration
FID	Flame Ignition Detector
g	gramo
g/L	gramo por litro
g/mol	gramo por mol
ha	hectárea
Hrs	horas
IAA	Ácido Indol acético
INIFAP	Instituto Nacional de Información Forestal, Agrícola y Pecuaria
JEFCA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
K	Potasio
kg	kilogramos
Km	Kanamicina
L	litros
L*	Luminosidad
LOX	Lipoxigenasa
m	metro
MA	Atmósferas Modificadas
MCP	Metil ciclopropeno
MS	Murashige and Skoog

mg	miligramo
mL	mililitro
mm	milímetro
N	Normal
OPDA	Ácido fitodienoico
PL	Pectato liasa
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PG	Poligalacturonasa
PGR	Reguladores del crecimiento en plantas
pH	potencial hidrógeno
PME	Pectinmetilesterasa
T	Temperatura
ton	Tonelada
TM	Toneladas métricas
TCD	Thermal conductivity Detector
TPE	Tasa de Producción de Etileno
UAE	Unidad de actividad enzimática
YM	Medio de cultivo (Yeast and Mold)