



Secretaría de Educación Pública

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

**Efecto del silenciamiento del gen *Tomlox B* en la producción de etileno en tomate
(*Solanum lycopersicum*) var. TA234**

Tesis

Que para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

IBQ Arturo Alberto Velázquez López

Asesores:

M. en C. Javier de la Cruz Medina

Dra. Elizabeth León García

Dr. Gilber Vela Gutiérrez

H. Veracruz Ver.

Mayo 2017

RESUMEN

Velázquez López, Arturo Alberto, M en C. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Instituto Tecnológico de Veracruz. Mayo, 2017. **EFEECTO DEL SILENCIAMIENTO DEL GEN *TomloxB* EN LA PRODUCCIÓN DE ETILENO EN TOMATE (*Solanum lycopersicum*) var TA234.** Asesores: M.C. Javier de la Cruz Medina, Dra. Elizabeth León García y Dr. Gilber Vela Gutiérrez.

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una de las hortalizas más importantes en México y el mundo. Una gran parte de la comercialización de este fruto es en forma fresca y durante su vida post-cosecha se suceden a lo largo de la cadena productiva, importantes pérdidas. Extender la vida de útil de frutos ha sido el objeto de numerosas investigaciones, basadas en la expresión y medición de la actividad de la ACC oxidasa (ACCO) y poligalacturonasa (PG) principalmente, las cuales son reguladas por el etileno (C₂H₄). La lipoxigenasa (LOX) cataliza la incorporación de oxígeno molecular en los ácidos grasos poliinsaturados; su actividad está relacionada con la síntesis de compuestos volátiles y con la pérdida de firmeza de los frutos durante la maduración del mismo; sin embargo, no se ha estudiado la relación entre la expresión del gen (*TomloxB*) y la producción de Etileno, así como su participación en el proceso de maduración del fruto. Por lo anterior, se propuso analizar el efecto del etileno sobre la actividad de la lipoxigenasa, cuyos objetivos fueron a) Evaluar el efecto del silenciamiento del gen *Tomlox B* sobre la producción de C₂H₄ durante la maduración de frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*) var. TA234, b) Evaluar la administración de C₂H₄ exógeno sobre la actividad de LOX y ACCO en frutos silenciados con el gen *TomloxB*, y c) Cuantificar la expresión de los genes que codifican para las enzimas ACCO, ACC sintasa, *TomloxA*, *TomloxB*, *TomloxC*, con y sin aplicación de C₂H₄ exógeno. Para alcanzar dichos objetivos se cosecharon los frutos en tres estados de maduración (quebrando, rayado y rosado). Se midió la actividad de LOX, ACCO y el nivel de expresión de *Tomlox A,B,C*, ACCO y ACCS; posteriormente se aplicó etileno exógeno y se midieron las mismas variables de respuesta. Los datos obtenidos muestran que el silenciamiento del gen

TomloxB provocó una reducción de la producción de etileno y un retardo en la aparición del pico climatérico, el cual se presentó en el día 6 y 8 (frutos en estado quebrado), mientras que los frutos silvestres mostraron este pico en el día 2.

El silenciamiento del gen *TomloxB* produjo un decremento en la síntesis de la enzima LOX, así como los productos de esta; con esto la actividad de la ACCO se redujo, tanto en el estado quebrado como en el estado torneado, pero no en el estado rosado. Además, debido a que la LOX se encontró en menor cantidad, la membrana celular se halló más íntegra, lo que generó menor pérdida de etileno generado por la célula y menor interacción con el etileno externo, ya sea por la presencia de una cantidad excesiva de frutos o por administración exógena. El etileno desencadena una serie de reacciones que activa a ACCO. El nivel de expresión de los genes estudiados fue variado: en frutos sin etileno exógeno en estado quebrado y torneado mostró una reducción en los tratamientos, mientras que en el estado rosado no hubo diferencia significativa. Al aplicar etileno exógeno se sobre-expresaron algunos genes (*TomloxA*, *ACCO* y *ACCS*), los cuales son positivamente regulados por el etileno, mientras que las *TomloxB* y *TomloxC* mostraron una disminución en el estado quebrado. En los demás estadios obtuvieron una sobre-expresión, por lo tanto, la presencia de las enzimas lipoxigenasas, específicamente *TomloxB*, es necesaria para el proceso de maduración del fruto debido a que está relacionada con la enzima ACC oxidasa la cual sintetiza etileno.

ABSTRACT

Velázquez López, Arturo Alberto, MSc. Research Unit on Food and Development. Technological Institute of Veracruz. May, 2017. **Effect of tomloxB gene silencing and ethylene production in tomato (*Solanum lycopersicum*) var TA234.** Advisors: Javier de la Cruz Medina, MSc; Elizabeth León García, PhD and Gilber Vela Gutiérrez, PhD.

Tomato (*Solanum lycopersicum*) is one of the most important vegetables in Mexico and the world. However, given its short shelf life it is not optimally handled. The trading of this fruit is in the fresh form, which carries great losses as a result of overproduction. Extending the useful life of fruits has been the subject of numerous investigations, based on the expression and control of ACC oxidase (ACCO) and polygalacturonase (PG) activities; enzymes that are regulated by ethylene (C₂H₄). Lipoxygenase (LOX) catalyzes the incorporation of molecular oxygen into polyunsaturated fatty acids; Its activity is related to the synthesis of volatile compounds and the loss of firmness of the fruits during the maturation of the same. However, the relationship between gene expression (*TomloxB*) and ethylene production, as well as its role in the ripening process of the fruit, has not been elucidated. Therefore, we proposed to analyze the effect of C₂H₄ on lipoxygenase activity, and our objectives were: a) To evaluate the effect of Tomlox B gene silencing on the production of ethylene during the ripening of tomato fruit var. TA234, (b) To evaluate the exogenous ethylene application on LOX and ACCO activities in fruits with the TomloxB gene silenced, and c) To quantify the expression of the genes encoding ACCO, ACC synthase, *TomloxA*, *TomloxB*, *TomloxC*, with and without application of exogenous ethylene. In order to achieve these objectives, the fruits were harvested in three stages of maturation (breaking, scratching and pink). The activity of LOX, ACCO and the expression level of Tomlox A, B, C, ACCO and ACCS were measured; exogenous ethylene was then applied and the same response

variables were measured. The data obtained show that the silencing of the *TomloxB* gene caused a reduction in the production of ethylene and a delay in the appearance of the climacteric peak, which was noted on days 6 and 8 (fruits in a cracking state), while the wild fruits showed this peak on day 2.

The silencing of the *TomloxB* gene produced a decrease in the synthesis of LOX, as well as its products thereof; With this event, the activity of the ACCO was reduced, both in the breaking as in the turned states, but not in the pink state. In addition, because LOX activity was decreased, the cell membrane was better integrated, resulting in reduced loss of C_2H_4 generated by the cell and less interaction with external ethylene, either due to the presence of an excessive amount of Fruits or by exogenous administration. C_2H_4 triggered a series of reactions that activated ACCO. The expression level of the studied genes was variable: in fruits without exogenous ethylene in the broken and turning states showed a reduction in the treatments, whereas in the pink state there was no significant difference. When exogenous ethylene was applied, some genes (*TomloxA*, ACCO and ACCS) were overexpressed, which were positively regulated by C_2H_4 , whereas *TomloxB* and *TomloxC* showed a decrease in the broken state. The presence of lipoxygenase isoenzymes, specifically *TomloxB*, play a key role in the maturation process of the fruit because it is related to the enzyme ACC oxidase which synthesizes ethylene.

CONTENIDO

| | Página |
|---|--------|
| RESUMEN | i |
| ABSTRACT | iii |
| LISTA DE FIGURAS | viii |
| LISTA DE TABLAS | v |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 3 |
| 2.1. Tomate (Taxonomía) | 3 |
| 2.2. Origen y cultivo | 5 |
| 2.3. Descripción botánica <i>Solanum lycopersicum</i> | 5 |
| 2.3.1. Sistema radicular | 5 |
| 2.3.2. Hojas | 6 |
| 2.3.3. Flores | 6 |
| 2.3.4. Cultivares | 6 |
| 2.3.5. Semillas | 7 |
| 2.3.6. Germinación | 7 |
| 2.3.7. Crecimiento | 7 |
| 2.3.8. Frutos | 8 |
| 2.3.9. Etapas fenológicas | 9 |
| 2.4 Producción mundial y nacional | 10 |
| 2.5. Las lipoxigenasas | 13 |
| 2.5.1. Definición | 13 |
| 2.5.2. Especificidad | 13 |
| 2.5.3. El papel de las lipoxigenasas en las plantas | 14 |
| 2.5.4. El papel de lipoxigenasas en los frutos | 15 |

| | |
|--|----|
| 2.6. Etileno | 16 |
| 2.6.1. Síntesis de etileno | 17 |
| 2.6.2. Principales enzimas participantes | 18 |
| 2.6.3. Efectos de etileno | 19 |
| 2.7. Ingeniería genética en frutos | 22 |
| 2.7.1. Descripción de ACC sintasa y ACC oxidasa | 23 |
| 2.7.2. Supresión de ACC sintasa y oxidasa | 24 |
| 2.7.3. Estudios sobre frutos de tomate genéticamente Modificados | 25 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 28 |
| 4. HIPÓTESIS | 28 |
| 5. OBJETIVOS | 29 |
| 5.1. General | 29 |
| 5.2. Específicos | 29 |
| 6. MATERIALES Y METODOS | 30 |
| 6.1. Material vegetal | 30 |
| 6.2. Variables de respuesta | 30 |
| 6.2.1. Producción de etileno | 30 |
| 6.3 Aplicación de etileno exógeno | 32 |
| 6.4 Actividad de ACC oxidasa | 33 |
| 6.5 Actividad de lipoxigenasa | 33 |
| 6.6 Niveles de expresión de los genes que codifican enzimas participantes en la maduración del tomate | 34 |
| 6.6.1 Diseño de primers | 34 |
| 6.6.2 Aislamiento de RNA | 36 |
| 6.7 PCR en tiempo real | 36 |
| 7. Diseño de experimentos | 37 |
| 8.- Resultados y discusión | 38 |
| 8.1.- Prueba de GUS | 38 |
| 8.2.- Producción de etileno y CO ₂ de frutos de tomate | 39 |

| | |
|---|----|
| 8.3.- Actividad de lipoxigenasa | 47 |
| 8.4.- Actividad de lipoxigenasa en frutos con administración de etileno | |
| Exógeno | 51 |
| 8.5.- Actividad de ACC oxidasa (ACCO) | 54 |
| 8.6.- Niveles de expresión (RT-PCR) | 58 |
| CONCLUSIONES | 63 |
| | |
| BIBLIOGRAFIA | 64 |
| ANEXOS | 73 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|---|--------|
| Figura 1. Esquema de los hábitos de crecimiento del tomate: indeterminado (izquierda) y determinado (derecha) | 8 |
| Figura 2. Etapas fenológicas del tomate | 10 |
| Figura 3. Producción mundial de tomate | 11 |
| Figura 4. Producción nacional de tomate | 12 |
| Figura 5. Síntesis y alteración de los niveles de etileno a partir de SAM | 18 |
| Figura 6. Ciclo de Yang | 24 |
| Figura 7. Cámara de respiración | 31 |
| Figura 8. Cromatografo de gases Agilent 7820A | 31 |
| Figura 9. Cámara para aplicación de etileno exógeno | 33 |
| Figura 10. Prueba de GUS | 38 |
| Figura 11. Producción de etileno en frutos de tomate en el estadio quebrando: (A) Frutos sin administración de etileno exógeno; (B) Frutos con administración de etileno exógeno | 40 |
| Figura 12. Producción de etileno en frutos de tomate en el estadio rayado: (A) Frutos sin administración de etileno exógeno; (B) Frutos con administración de etileno exógeno | 42 |
| Figura 13. Producción de etileno en frutos de tomate en el estadio rayado: (A) Frutos sin administración de etileno exógeno; (B) Frutos con administración de etileno exógeno | 43 |

Figura 14. Producción de CO₂ de frutos de tomate en el estadio quebrando: (A) Frutos sin administración de etileno exógeno; (B) Frutos con administración de etileno exógeno 45

Figura 15. Producción de CO₂ de frutos de tomate en el estadio rayado: (A) Frutos sin administración de etileno exógeno; (B) Frutos con administración de etileno exógeno 46

Figura 16. Producción de CO₂ de frutos de tomate en el estadio rosado: (A) Frutos sin administración de etileno exógeno; (B) Frutos con administración de etileno exógeno 47

Figura 17. Actividad de LOX de frutos de tomate en estadio quebrando: (A) Frutos sin administración de etileno exógeno; (B) Frutos con administración de etileno exógeno 48

Figura 18. Actividad de LOX de frutos de tomate en estadio rayado: (A) Frutos sin administración de etileno exógeno; (B) Frutos con administración de etileno exógeno 48

Figura 19. Actividad de LOX de frutos de tomate en estadio rosado: (A) Frutos sin administración de etileno exógeno; (B) Frutos con administración de etileno exógeno 49

Figura 20. Actividad de ACC oxidasa (ACCO) en el estadio quebrando: (A) Frutos sin administración de etileno exógeno; (B) Frutos con administración de etileno exógeno 55

Figura 21. Actividad de ACC oxidasa (ACCO) en el estadio rayado: (A) Frutos sin administración de etileno exógeno; (B) Frutos con administración de etileno exógeno 55

Figura 22. Actividad de ACC oxidasa (ACCO) en el estadio rosado: (A) Frutos sin administración de etileno exógeno; (B) Frutos con administración de etileno exógeno 56

Figura 23. Niveles de expresión estado quebrando: (A) Frutos sin administración de etileno exógeno; (B) Frutos con administración de etileno exógeno 58

Figura 24. Niveles de expresión estado rayado: (A) Frutos sin administración de etileno exógeno; (B) Frutos con administración de etileno exógeno 59

Figura 25. Niveles de expresión estado rosado: (A) Frutos sin administración de etileno exógeno; (B) Frutos con administración de etileno exógeno 60

LISTA DE TABLAS

| | Página |
|--|--------|
| Tabla 1. Clasificación botánica de tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) | 3 |
| Tabla 2. Atributos biológicos y efectos benéficos del etileno | 20 |
| Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos usados | 35 |
| Tabla 4. Diseño de experimentos: Completamente al azar | 37 |
| Tabla 5.- Parámetros cinéticos | 51 |
| Tabla 6.- Parámetros cinéticos de LOX al administrarse etileno exógeno | 53 |

1. INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una de las hortalizas más importantes en México y es consumida tanto en fresco como en productos procesados. En México la producción anual total es de 717 toneladas cosechadas en una superficie mayor a 46,677 hectáreas (SAGARPA, 2016). Los frutos del tomate contienen compuestos antioxidantes importantes para la salud humana como los carotenoides licopeno y β -caroteno, los cuales ayudan a contrarrestar los efectos dañinos de radicales libres, que contribuyen al desarrollo de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, como el cáncer (Krzyzanowska *et al.*, 2010). Sin embargo, debido a que es un fruto climatérico, exhibe un limitado tiempo de vida útil. El manejo durante la postcosecha, su comercialización en forma fresca y el procesamiento de esta fruta es otra limitante, debido a su corta vida de anaquel, ya que experimenta reacciones bioquímicas relacionadas con la maduración, las cuales producen cambios no deseados para el consumidor (cambios en textura, color, olor, sabor) y por lo tanto grandes pérdidas como consecuencia de la sobreproducción.

Alargar la vida de anaquel de frutos ha sido el objeto de numerosas investigaciones, muchas de las cuales están basadas con la expresión de genes relacionados a la maduración. Se han propuesto numerosos métodos para el alargamiento de la vida de anaquel de estos frutos, por ejemplo recubrimientos a base de propoleo, caseína de leche, plásticos, ceras y otros componentes; atmosferas modificadas dependiendo de las exigencias del fruto a envasar, las cuales reducen el proceso de respiración en los frutos, conservando sus características fisicoquímicas, sensoriales y microbiológicas por mayor tiempo (Ospina *et al.*, 2008) y actualmente el uso de la ingeniería genética de plantas, para el control de su maduración ha tenido mayor impacto, aunque aún no se ha adoptado comercialmente: principalmente los tomates modificados *ripening inhibitor (rin)*, *no ripening (nor)* y *color no ripening (cnor)*, cuya modificación genética consistió en el bloqueo de los genes que sintetizan la

aminociclopropano carboxilato (ACC) sintasa, la ACC oxidasa, de los cuales se han realizado estudios para analizar su participación en la síntesis de etileno. También se ha logrado el bloqueo en antisentido de genes que codifican para enzimas lipoxigenasas (*TomloxA*, *B* y *D* principalmente), en los cuales también se han realizado estudios para el análisis de su participación en el proceso de maduración, ya que estas enzimas degradan los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (ácido linoleico o linolenico) localizados en la membrana celular, que en su estructura contengan 1,4-*cis,cis* pentadieno. La mayoría de las enzimas mencionadas participan en el proceso de maduración, a excepción de la *TomloxD*, al igual que en la síntesis de etileno, pero aún no se ha reportado la relación entre este conjunto de enzimas durante el proceso de maduración. Es por ello que se ha propuesto esta investigación para analizar la relación entre *TomloxB* y el etileno durante el proceso de maduración, midiendo la producción de etileno en tomates (*Solanum lycopersicum* var. TA234) genéticamente modificados con el silenciamiento en anti-sentido del gen *Tomlox B*, y el nivel expresión de algunos genes.

2. ANTECEDENTES

2.1. Tomate (Taxonomía)

La familia Solanaceae es la más variable de todas las especies de los cultivos en términos de utilidad agrícola; es la tercera familia de especies de los cultivos en términos de utilidad agrícola, la tercera familia de los cultivos de mayor importancia económica, superada solo por las gramíneas y leguminosas, y la más valiosa en términos de cultivos hortícolas. Entre todas las familias de plantas, los miembros de las solanáceas son muy diversos en términos de hábito de crecimiento (desde árboles a pequeñas plantas y arbustos anuales), hábitat (desde los desiertos hasta el bosque húmedo tropical), y la morfología. Muchas especies de solanáceas han jugado papeles importantes como plantas modelo (Foolad *et al.*, 2007). El tomate común es una planta dicotiledónea que se encuadra en la familia de las solanáceas. En la tabla 1 se muestra la ubicación taxonómica actualmente más aceptada del tomate.

Tabla 1. Clasificación botánica de tomate (*Solanum Lycopersicum*)

| | |
|-------------|------------------------|
| Reino | Plantae |
| Subreino | Embryobionta |
| División | Magnoliophyta |
| Subdivisión | Angiosperamae |
| Clase | Magnoliopsida |
| Subclase | Dicotyledonae |
| Orden | Tubiflorae |
| Familia | Solanaceae |
| Subfamilia | Solanoideae |
| Tribu | Solanacea |
| Genero | Solanum = Lycopersicum |
| Especie | S. lycopersicum |

(Foolad *et al.*, 2007)

El tomate es una planta que puede desarrollarse de forma rastrera, semierecta o erecta. Su sistema radicular está compuesto por una raíz principal (corta y débil), raíces secundarias (numerosas y potentes) y raíces adventicias. En el tallo principal, de un grosor de 2 a 4 cm, se desarrollan hojas, tallos secundarios (cuya ramificación es simpodial) e inflorescencias. La hoja es compuesta e imparipinada, con folíolos peciolados, lobulados y un borde dentado. La flor es perfecta, regular e hipógina y consta de 5 o más sépalos. La flor suele tener el mismo número de sépalos que de pétalos, estos últimos de color amarillo. Los estambres, que se desarrollan fusionados, forman un cono estaminal que envuelve al gineceo (con ovario bi o plurilocular). Las flores se agrupan en inflorescencias de tipo racemoso (dicasio) y se unen al eje floral por medio de un pedicelo articulado que contiene la zona de abscisión, distinguible por un engrosamiento con un pequeño surco originado por una reducción del espesor del córtex. El fruto es una baya bi- o plurilocular, que está constituido por el pericarpio, el tejido placentario y las semillas (Angarita *et al.*, 2012).

En la primera clasificación taxonómica, al tomate cultivado se le denominó *Solanum lycopersicon*. Por estar estrechamente relacionada con la belladona y la mandrágora (Plantas del género *Solanum*) fue considerada como una planta venenosa. En 1754, Miller hizo una distinción asignando al tomate cultivado el género *Lycopersicon* sobre la base de caracteres diferenciales en hojas y anteras. Así pues, *Lycopersicon* tiene hojas pinadas y la dehiscencia se produce en el lateral de las anteras mientras que *Solanum* tiene hojas con tendencia a ser simples y la dehiscencia se produce en el extremo de las anteras. Las relaciones filogenéticas entre *Solanum* y *Lycopersicon* han sido el origen de largos debates durante mucho tiempo. Algunos investigadores reconocían *Lycopersicon* como un género distinto, mientras que otros sugerían que éste debía estar unido al género *Solanum*. Recientemente y basándose en datos morfológicos y moleculares, se ha readoptado el nombre científico de *Solanum lycopersicum* para el tomate cultivado, mientras que las otras especies de *Lycopersicon* han sido incorporadas al género *Solanum* (Angarita *et al.*, 2012).

2.2. Origen y cultivo

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y las plantas más relacionadas con él, tienen su centro de origen en una región montañosa, estrecha y alargada de los Andes, que comprende Perú, Ecuador y Chile. Además, algunas plantas claramente emparentadas con el tomate cultivado son parte de la flora nativa de las Islas Galápagos. Estos parientes primitivos del tomate ocupan ambientes diversos, y representan una fuente de genes casi inagotable para la mejora genética de la especie cultivada (Hernández *et al.*, 2009).

La domesticación y cultivo del tomate fuera de su centro de origen parece que tuvo lugar inicialmente con las primeras civilizaciones de México. Precisamente, la palabra tomate proviene del vocablo náhuatl "tomatl". En 1554 fue llevado a Europa, empezando a comercializarse en Estados Unidos hacia el año 1835, cuando el tomate comenzó a adquirir popularidad que lo ha hecho un alimento muy consumido hasta nuestros días. Todavía puede encontrarse una gran diversidad de formas cultivadas de tomate en los primeros centros de domesticación (Tigchelaar *et al.*, 2001).

2.3. Descripción botánica del *Solanum lycopersicum*

El tomate se clasifica como un cultivo hortícola herbáceo de ambientes cálidos, con temperatura óptima de crecimiento de 20 a 25°C. Su crecimiento y desarrollo se detiene a temperaturas inferiores a 10°C. Las formas cultivadas del tomate son diploides, autógamas, herbáceas, perennes y semi-perennes en regiones tropicales, y se utilizan como cultivo anual casi universalmente. En condiciones de crecimiento adecuadas, su sistema radial es fibroso y robusto, pudiendo llegar a 1.2 a 1.8 m de profundidad. Los tallos son cilíndricos en plantas jóvenes y angulosos en plantas maduras; alcanzan alturas de 0.4 a 2 m (Hernández *et al.*, 2012).

2.3.1. Sistema radicular

El sistema radicular del tomate está constituido por: la raíz principal, las raíces secundarias y las raíces adventicias. Generalmente se extiende superficialmente

sobre un diámetro de 1.5 m, y alcanza más de 0.5 m de profundidad; sin embargo, el 70% de las raíces se localizan a menos de 0.20 m de la superficie. Todas las raíces absorben agua, pero los minerales son absorbidos por las raíces más próximas a la superficie, por lo que hay que tener cuidado al realizar el aporco para no destruir parte del sistema radicular que se encuentra en ese nivel (Hernández *et al.*, 2012).

2.3.2. Hojas

Las hojas son compuestas de formas alargadas y alternas, constituidas por siete o nueve folíolos de borde dentados. Las hojas están formadas por varios pares de hojuelas, dependiendo del tipo de crecimiento de la planta. Los pelos glandulares se rompen en la poda, manchando las manos al operario, en las axilas de las hojas están las yemas que producen chupones o tallos laterales (Argerich y Gaviola, 2008).

2.3.3. Flores

La flor del tomate es perfecta, con partes masculinas y femeninas (Álvarez *et al.*, 2009), de color amarillo, consta de 5 o más sépalos, 5 o más pétalos y de 5 a 6 estambres; se agrupan en inflorescencias de tipo racimo cimoso, compuesto por 4 a 12 flores. Temperaturas superiores a los 30°C ocasionan que el polen no madure, por lo tanto, no hay fecundación, y se observa aborto floral o caída de flor. Por esto se recomienda seleccionar variedades que se adapten a este tipo de condiciones ambientales. El inicio de la fructificación ocurre entre los 60 a 65 días después de la siembra, y la primera cosecha puede realizarse entre los 75 a 80 días, si la variedad es de crecimiento determinado. Si es indeterminada, la fructificación da inicio entre los 70 a 80 días, y la primera cosecha se realiza entre los 85 y 90 días (Pérez *et al.*, 2001).

2.3.4. Cultivares

Una de las principales características para dividir los diferentes cultivares de tomate es la duración de su ciclo vegetativo. Se consideran precoces aquellos cuya duración es de 90 a 110 días y que producen sus primeros frutos entre los 65 y 80 días a partir del trasplante; semi-precoces cuando el ciclo vegetativo es de 110 a 120 días y

empieza a madurar entre los 75 y 90 días a partir del trasplante; y tardíos con 120 a 130 días y requerimientos de 85 a 100 días a partir del trasplante para la primera recolección (Sarita, 1993).

2.3.5. Semillas

La semilla de tomate esta fisiológicamente madura cuando se ha completado la maduración del fruto (Álvarez *et al.*, 2009), es aplanada y de forma lenticelar con dimensiones aproximadas de 3x2x1 mm. Si se almacena por periodos prolongados se aconseja hacerlo a humedad del 5.5%. Una semilla de calidad deberá tener un porcentaje de germinación arriba del 95% (Pérez *et al.*, 2001).

2.3.6. Germinación

El proceso de germinación comprende tres etapas descritas por Pérez *et al.* (2001):

- a) Rápida absorción, que dura 12 horas, y se observa una rápida absorción de agua.
- b) Reposo, dura 40 horas, durante la cual no se observa ningún cambio; la semilla comienza a absorber agua de nuevo.
- c) Crecimiento: asociada al proceso de germinación de la semilla.

Este proceso necesita elevadas cantidades de oxígeno; cuando la oxigenación es deficiente se reduce drásticamente la germinación, como suele ocurrir en suelos anegados. La temperatura óptima oscila entre los 20 y 25°C; se produce mejor en la oscuridad, y en algunas variedades resulta inhibida por la luz.

2.3.7. Crecimiento

Dentro de las numerosas variedades de tomate, existen las de tipo determinado e indeterminado, mostradas en la figura 1, además de variedades de comportamiento intermedio. Esta característica está regulada genéticamente, pero varía de acuerdo con su adaptación a los diferentes climas y condiciones de suelo (Hernández *et al.*, 2012).

De acuerdo a Pérez *et al.* (2001), el cultivo de tomate se clasifica en :

- a) De crecimiento indeterminado: El tallo producido a partir de la penúltima yema empuja la inflorescencia terminal hacia afuera, de tal manera que el tallo lateral parece continuación del tallo principal que le dio origen. Estos cultivares son ideales para establecer plantaciones en invernadero.
- b) De crecimiento determinado: Las variedades de crecimiento determinado, tienen la forma de arbusto, las ramas laterales son de crecimiento limitado, y la producción se obtiene en un periodo relativamente corto. Esta característica es muy importante porque permite concentrar la cosecha en un periodo determinado según sea la necesidad del mercado.



Figura 1. Esquema de los hábitos de crecimiento del tomate: indeterminado (izquierda) y determinado (derecha) (Hernández *et al.*, 2012).

2.3.8. Frutos

Todos los cultivares de tomate que existen actualmente en el mercado difieren de mucho en la forma del fruto, pueden ser ovalados, bola, alargados, tipo de pera, tipo de berenjena, etc. Los defectos en la forma se asocian con una pobre polinización y

el desarrollo irregular de algunos lóculos, y pueden afectar la apariencia, la firmeza, la disminución del contenido de sólidos solubles, y otras variables. Este carácter tiene un fuerte componente genético; algunos ejemplos son los genes fs8.1 (Fruit shape 8.1), fw2.2 (Fruit weight) y el gen lcn 2.1 (locule number 2.1) que definen la forma del fruto.

2.3.9. Etapas fenológicas

La fenología del cultivo comprende las etapas que forman su ciclo de vida. Dependiendo de la etapa fenológica de la planta, así son sus demandas nutricionales, necesidades hídricas, susceptibilidad o resistencia a insectos y enfermedades. En el cultivo del tomate, como se observa en la figura 2, se determinan 3 etapas durante su ciclo de vida (Pérez *et al.*, 2001).

Inicial

Comienza con la germinación de la semilla. Se caracteriza por el rápido aumento en la materia seca; la planta invierte su energía en la síntesis de nuevos tejidos de absorción y fotosíntesis.

Vegetativa

Esta etapa se inicia a partir de los 21 días después de la germinación y durante 25 a 30 días antes de la floración. Requiere mayores cantidades de nutrientes para satisfacer las necesidades de las hojas y ramas en crecimiento y expansión.

Reproductiva

Se inicia a partir de la fructificación, dura entre 30 o 40 días, y se caracteriza por el crecimiento detenido de la planta y los frutos extraen los nutrientes necesarios para su crecimiento y maduración.

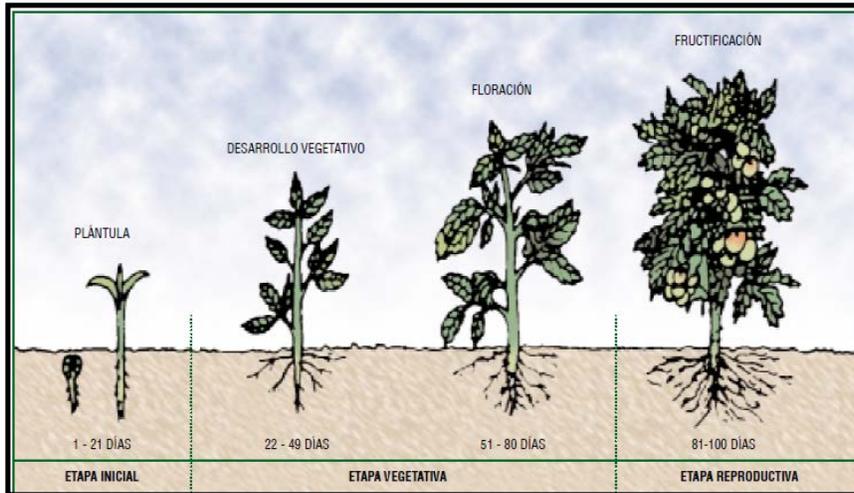


Figura 2. Etapas fenológicas del tomate (Pérez *et al.*, 2001)

2.4 Producción mundial y nacional

La producción de tomate en el 2014 se distribuyó de la siguiente manera: China fue el principal productor de tomate en el mundo, con una participación del 31%, India con 11%, Estados Unidos con 8%, Turquía 11%, mientras que México ocupó el doceavo lugar, con un 3% de participación en la producción (Figura 3).

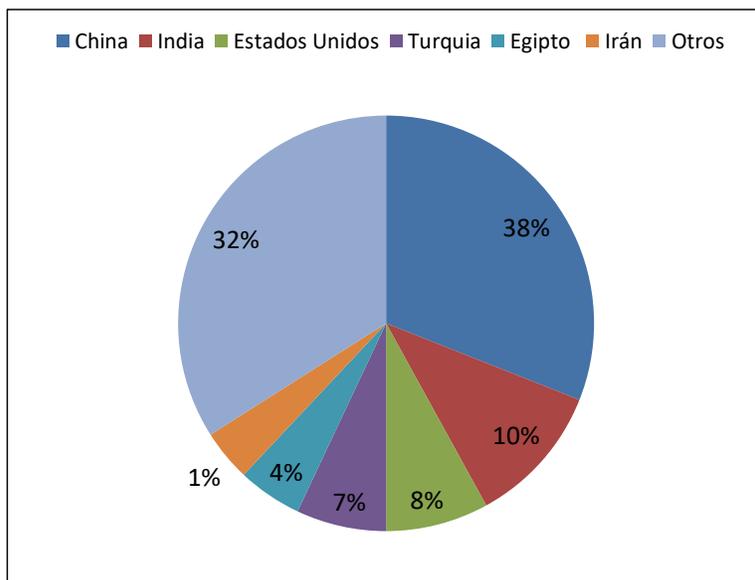


Figura 3. Producción mundial de tomate (FAO , 2015)

En México, en los últimos seis años se han sembrado y cosechado en promedio 55 mil hectáreas de tomate rojo (Jitomate), con una producción promedio de 2.28 millones de toneladas de esta hortaliza (SAGARPA, 2015). La producción de Jitomate de 2007 a 2012 mostró una tasa media de crecimiento anual (TMAC) de 2.65%, alcanzando en 2012 una producción de 2.84 millones de toneladas, que representó un aumento acumulado en la producción de 17%, comparado con la producción de 2007. Los rendimientos en toneladas por hectárea cosechada presentan una tendencia creciente, pasando así de un rendimiento de 45.2 en 2007 a 62.23 toneladas por hectárea en 2015 (SAGARPA, 2015).

Durante 2014, se produjeron en todo México 2.26 millones de toneladas de jitomate, siendo el principal productor el estado de Sinaloa, cuya producción representó el 46% del total nacional, con un monto 3.8 veces mayor al producido por el segundo lugar, Baja California, con 8%. Siguen en la lista los estados de Michoacán, San Luis

Potosí y Jalisco con 7, 7 y 5%, respectivamente (Figura 4). Regionalmente, a todo lo largo del territorio nacional se distribuye la producción de jitomate, sin embargo, la zona productora de mayor importancia es la noroeste.

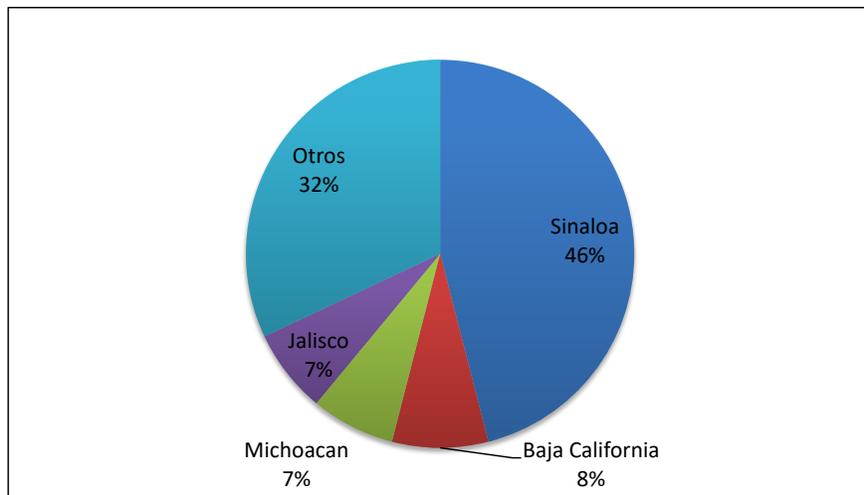


Figura 4. Producción nacional de tomate (SAGARPA, 2016).

Según el SIAP-SAGARPA, la producción del tomate rojo en México se divide en dos ciclos. Por ejemplo, para el año agrícola, en el ciclo Otoño-Invierno (OI) la siembra de tomate rojo inició en octubre de 2015 y terminó en marzo de 2016, sembrándose el mayor porcentaje, 36.53% del ciclo, en noviembre de 2015. Para el ciclo OI la cosecha se realizó de los meses de enero a julio de 2015 y el mayor porcentaje de la cosecha, 41.32%, se levantó en marzo.

El mercado del tomate bola producido en Sinaloa en el ciclo otoño-invierno y que es comercializado en las diferentes centrales de abasto de la República mexicana durante el mes de febrero y la primera quincena de marzo, en su mayoría tuvieron una disminución en su precio en las diferentes presentaciones de venta. Por ejemplo, a inicios de febrero el tomate bola sinaloense se comercializó la caja de 14 kg en el mercado de abasto de Cd. Juárez en 227 pesos por caja (\$16.21/kg) y en la segunda

semana de marzo se mantuvo constante en un precio de 120 pesos/caja (\$8.57/kg), lo que representó un decremento en el precio del tomate bola de 107 pesos/caja (\$7.64/kg) en tan solo un mes. Por otro lado, la caja de tomate bola sinaloense de 15 kg en el mercado de la central de abastos de León se ha mantenido constante a un precio de \$210/caja (\$8.07/kg). En la central de abastos de Iztapalapa en Distrito Federal fluctuó en el mes de febrero entre los 130 y 140 pesos/caja de 10 kg y en la segunda semana de marzo estuvo constante en un precio de 120 pesos/caja de 10 kg, lo que representó una disminución en su precio con respecto al mes anterior (SAGARPA, 2016).

2.5. Las lipoxigenasas

2.5.1. Definición

Las lipoxigenasas (EC 1.13.11.12) comprende una clase de enzimas que contienen hierro, los cuales usan oxígeno molecular en la dioxigenación de los ácidos grasos que contienen 1,4 pentadieno en su estructura, tal como los ácidos linoleico y linolénico en plantas y ácido araquidónico en células animales. Los hidroperóxidos lipídicos resultantes se metabolizan adicionalmente en compuestos fisiológicamente activos. En los mamíferos, algunas de estas moléculas producidas, biorreguladores, son los leucotrienos, prostaglandinas, tromboxanos, y lipoxinas. Los productos de la lipoxigenasa en las plantas superiores son metabolizados por una de las dos principales vías que conducen a la formación de ácido jasmónico o traumatina (hormona de la herida), que se sabe que tienen funciones reguladoras (Ferrie *et al.*, 1994), o pueden ser convertidos en compuestos volátiles responsables del olor característico y sabor al fruto, como hexenal y hexanal (aldehídos).

2.5.2. Especificidad

Los substratos típicos de la LOX en plantas son el ácido linoleico y el ácido linolénico. La lipoxigenasa cataliza la hidroxperoxidación de los ácidos grasos cuyos intermediarios provienen de reacciones secundarias, conduciendo a la producción de

ácido jasmónico, traumatina, ácido traumático, compuestos volátiles (aldehídos, cetonas).

Las lipoxigenasas (LOX) pueden ser agrupadas en dos tipos: la 9-LOX, la cual forma específicamente 9-hidroperóxidos (9-HPO), y la 13-LOX, que forma 13-hidroperóxidos (13-HPO) (Vela-Gutiérrez, 2015). Estos dos tipos de hidroperóxido liasas, 9-HPL y 13-HPL, rompen los 9-HPO y 13-HPO, generando cada uno fragmentos C9 o C6 y C12, respectivamente (Chen *et al.*, 2004).

2.5.3 El papel de las lipoxigenasas en las plantas

En el reino vegetal operan fundamentalmente cuatro sistemas enzimáticos para la modificación oxidativa de los ácidos grasos: α -oxidación, β -oxidación, ω -oxidación y oxidación enzimática mediada por lipoxigenasa (LOX). En general, se puede decir que los tres primeros carecen de una especificidad de sustrato, mientras que el sistema LOX posee una clara especificidad, siendo exclusivo para ácidos grasos poliinsaturados con estructura Z,Z-1.4 pentadieno (Sanz *et al.*, 1992a).

Algunos de los procesos fisiológicos en los que la lipoxigenasa participa incluyen daño mecánico, el ataque de patógenos, geminación de las semillas, senescencia y síntesis de ácido absísico (Sanz *et al.*, 1992b).

La enzima LOX no se encuentra confinada en un órgano particular. Su presencia se ha confirmado en raíces, cotiledones, hipocotilos, flores y hojas, y aún dentro de una misma planta, la actividad puede variar ampliamente (Baysal y Demirdöven, 2006).

Se han detectado múltiples isoformas de lipoxigenasa en numerosas plantas y animales. Aunque la mayoría de las LOX se localizan en el citosol, otras han sido localizadas en vacuolas, mitocondrias y la membrana plasmática. Las formas solubles de lipoxigenasa, localizadas en el citosol, se ha reportado que catalizan la oxigenación específica de ácidos grasos esterificados, mientras que las lipoxigenasas relacionadas a la membrana no lo hacen. Además, una lipoxigenasa purificada de tomate maduro fue reportada como inactiva en el complejo de la membrana lipídica (Kausch y Handa, 1997).

La ruta de la lipoxigenasa es conocida por la generación de compuestos C6 volátiles que son abundantes en tomate, entre los más notables están hexenal, hexenol, hexanal y hexanol. Sin embargo, un análisis de la funcionalidad de LOX en plantas ha sido complicado por la presencia de múltiples isoformas (Ealing, 1994). Está claramente demostrado que el papel de la lipoxigenasa ha surgido del trabajo con *Arabidopsis thaliana* modificada genéticamente, en la cual se suprimió el gen *LOX2*, resultando en la disminución de la acumulación de ácido jasmónico, y por lo tanto en la reducción de la expresión de genes inducibles por el mismo (Griffiths *et al.*, 1999). Los productos resultantes de la reacción enzimática de la lipoxigenasa, los hidroperóxidos, son compuestos que tienen una alta tendencia a la formación de radicales libres, mostrándose estos altamente reactivos. Estos radicales dañan la estructura de la membrana, reaccionando así mismo con proteínas, aminoácidos e incluso ADN por reacción con guanina. A pesar de la gran cantidad de información que existe concerniente a las LOX, pocas conclusiones se habían podido extraer sobre su posible papel fisiológico en plantas (Gardner, 1991).

Sin embargo, con posteriores investigaciones se ha podido concluir que existen tres áreas de la fisiología vegetal donde la LOX parece estar implicada: el crecimiento y desarrollo, la senescencia, y la respuesta a daño del tejido vegetal o resistencia a plagas. En cualquiera de estas tres áreas es posible encuadrar el posible papel fisiológico de cada uno de los metabolitos de la ruta de la LOX (Viera *et al.*, 2000).

2.5.4. El papel de lipoxigenasas en los frutos

La peroxidación lipídica es común a todos los sistemas biológicos, tanto que aparece en los procesos de desarrollo y regulados ambientalmente en las plantas (Feussner y Wasternack, 2002). Se ha mencionado que las lipoxigenasas en el tomate podrían estar involucradas en la síntesis de ácido jasmónico y en la formación de compuestos volátiles. Durante el proceso de respiración en los frutos existe degradación oxidativa de los materiales de reserva (principalmente compuestos carbonados: almidón) en el fruto, la cual da lugar a compuestos sencillos como azúcares y ácidos orgánicos (Stanley y Burg, 1961).

Los frutos pueden ser clasificados en 2 grupos, basados en la intervención del etileno durante su maduración. Los frutos no climatéricos son aquellos que no dependen del etileno, como la cereza, fresa y piña. Los frutos climatéricos, tales como el tomate, aguacate, melón, manzana, pera, durazno y kiwi son caracterizados por un incremento en la producción de etileno, el cual es acompañado por un pico de respiración durante su maduración, llamado “pico climatérico” (Soares y Mello, 2006). Incluye modificaciones de la estructura y la composición de los polisacáridos constituyentes que se han correlacionado con la expresión de una amplia gama de hidrolasas y transglicosilasas (Xue *et al.*, 2009). Esto resulta en cambios sensoriales en textura, aroma y color. El vire de color es uno de los cambios más importantes y visibles en el tomate, implicando una acumulación de carotenoides; un fenómeno que está asociado a la transición de cloroplastos a cromoplastos (Griffiths, 1999).

2.6.1 Etileno

El etileno es una hormona gaseosa que a bajas concentraciones (100 $\mu\text{L/L}$), juega un papel importante en la regulación del metabolismo de la maduración de frutos, vegetales y cultivos ornamentales. En general, el etileno puede influenciar la vida de anaquel de frutos climatéricos y no climatéricos, afectando sus atributos de calidad y desarrollo de desórdenes fisiológicos y enfermedades postcosecha (Palou *et al.*, 2003).

El etileno tiene las siguientes características (Alexander y Grierson, 2002):

- Es auto-catalítico, es decir, capaz de estimular su propia biosíntesis
- Requiere una producción y acción por cierto período antes de provocar sus efectos
- Es clave en la maduración y senescencia del fruto.

Las rutas del etileno y la citoquinina están bien definidas y además participan en el proceso de senescencia y cambios de color, con otras hormonas, tales como el ácido jasmonico (AJ), el que también ha demostrado que afecta este proceso.

Durante la última década, muchos estudios se centraron en la caracterización de los genes que codifican la biosíntesis de etileno, y el efecto del etileno en la transcripción y traducción de muchos de los genes relacionados con la maduración. La ACC sintasa es la enzima clave responsable de la biosíntesis de etileno. La inhibición de la producción de etileno por supresión de la síntesis de ACC puede bloquear la maduración normal del fruto, incluyendo la degradación de las clorofilas, la síntesis de carotenoides, la solubilización de las pectinas de la pared celular y la variación en los niveles de volátiles (Palou *et al.*, 2003).

2.6.1 Síntesis de etileno

Estudios fisiológicos han determinado que el proceso de maduración se caracteriza por una elevada respiración y por la síntesis autocatalítica de etileno. La síntesis autocatalítica de etileno es el principal determinante de los cambios fenotípicos que alteran el color, la textura, el aroma y la susceptibilidad a patógenos en el fruto. Teniendo en cuenta la importancia del etileno en este proceso, muchos de los trabajos de investigación en este campo se han realizado con genes implicados en la regulación dependiente de etileno, principalmente con la biosíntesis, percepción y señalización de esta hormona (Angarita *et al.*, 2012).

La biosíntesis de etileno, parte de S-adenosilmetionina (SAM). La etapa limitante de la ruta es la síntesis del ácido 1-aminociclopropano-carboxílico (ACC), catalizado por la enzima ACC sintasa. La última etapa de la vía cataliza una oxidasa (ACC oxidasa) que requiere oxígeno como cofactor. Las primeras estrategias para tratar de retrasar la maduración de los frutos han estado relacionadas con la alteración de genes implicados en esta ruta (Angarita *et al.*, 2012):

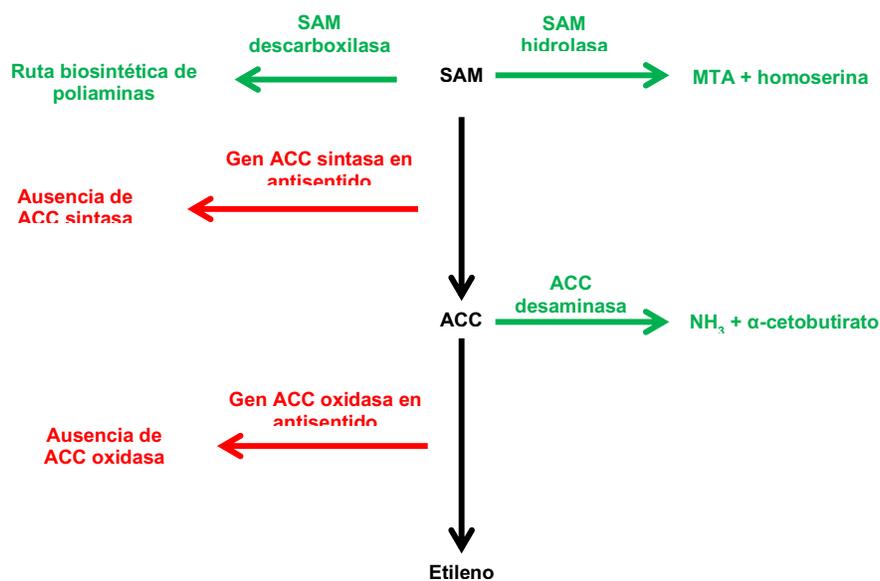


Figura 5. La síntesis y alteración de los niveles de etileno a partir de SAM (S-Adenosilmetionina) En verde, enzimas que degradan los precursores de la síntesis de etileno. En rojo, representan las estrategias para reducir los niveles de etileno sobre la base de la anulación de función de los dos enzimas de la ruta de biosíntesis de esta hormona (Stearns y Glick, 2003).

2.6.2 Principales enzimas participantes.

El etileno puede promover un nuevo ARNm y la síntesis de durante la maduración de los frutos. La actividad de la poligalacturonasa disminuye en tomate cuando se inhibe

la producción de etileno. Esta enzima participa en la hidrólisis de la pared celular, haciendo que el fruto se vuelva suave, y sobresale más en la etapa de sobremaduración. Estudios recientes indican que otros genes están involucrados en la maduración de frutos, que participan en el proceso de extensión de proteína (expansina, EXP), lipoxigenasa (LOX), Pectin liasa y β -galactosidasa (Medina, 2015). La LeEXP1 es una proteína que juega un importante papel en el reblandecimiento. Su función en la despolimerización de la pectina puede ser debido a que no trabaja sola, sino por la influencia de la poligalacturonasa (Xue *et al.*, 2009).

2.6.3 Efectos de etileno

El efecto del etileno en las respuestas de la planta a las tensiones como el frío y la herida es bastante variable. La exposición de los melones maduros a 1000 mL L^{-1} de etileno durante 24 h indujo la maduración y se eliminó el daño por frío en los frutos almacenados posteriormente a $2.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 semanas (Lipton *et al.*, 1979). La sensibilidad al enfriamiento de los cítricos generalmente aumenta por la exposición al etileno, pero los tratamientos con Etileno parecen mejorar la tolerancia de algunos frutos (Forney y Lipton, 1990). Los frutos de aguacate expuestos a Etileno desarrollaron más daños por frío que las frutas refrigeradas sin Et, mientras que las frutas de tomate se vuelven más resistentes al enfriamiento a medida que maduran.

En su papel de hormona, el etileno controla muchos procesos en las plantas superiores, como la senescencia de órganos, respuestas al estrés, germinación de la semilla, cicatrización de heridas, además de las interacciones con otras hormonas e iones metálicos, y ha sido identificado como la principal hormona que inicia y controla el proceso de maduración de la fruta. Otros atributos biológicos y efectos benéficos del etileno se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Atributos biológicos y efectos benéficos del etileno.

| Atributos biológicos | Efectos benéficos sobre el fruta |
|--|---|
| Gas incoloro | Promueve el desarrollo de color |
| Compuesto de ocurrencia natural | Estimula la maduración climatérica |
| Producto a partir de metionina vía ACC por una ruta metabólica altamente regulada. | Estimula dehiscencia en nueces. |
| Síntesis inhibida (retroalimentación negativa) por Etileno en el tejido reproductivo vegetal | Altera la expresión sexual en Cucurbitaceae. |
| Síntesis promovida (retroalimentación positiva) por Etileno en tejido climatérico reproductivo | Promueve el florecimiento en Bromeliaceae. |
| Requiere O ₂ para ser sintetizado y O ₂ y bajos niveles de CO ₂ para ser activado | Reduce los depósitos de cereales por inhibición de la elongación del tallo. |

(Chen *et al.*, 2005)

El Etileno se ha utilizado en forma líquida para efectuar la germinación de las semillas y el brote del bulbo, retardar el crecimiento, reducir la dominancia apical, iniciar o inhibir la iniciación de las raíces, estimular el látex y otras secreciones, inducir, promover o retrasar la floración. A fin de favorecer el desarrollo del color, ayudar en la cosecha, desfoliar las plantas y ayudar en el control cultural de las plagas de insectos. Por ejemplo, la floración se promueve en piña y la expresión del sexo se altera en los pepinos. El desarrollo del color se potencia mediante la estimulación de la síntesis de pigmentos en manzanas y tomates o la destrucción de clorofila en bananos y cítricos (Salviet, 1999). El Ethephon (compuesto que genera etileno) se ha utilizado en manzanas, cereales, cerezas, cítricos, café, algodón,

pepinos, uvas, guayaba, aceitunas, melocotones, pimientos, piña, arroz, caucho, caña de azúcar, camote, tabaco, tomate y nueces. También se utiliza en muchas plantas ornamentales y frutas pequeñas. Además, El etileno tiene un papel doble en la post-cosecha, por un lado ocasiona que los frutos adquieran características organolépticas óptimas para su consumo, pero también es responsable de la senescencia de los tejidos, generando efectos desfavorables en la calidad (Balaguera *et al.*, 2014).

Las aplicaciones post-cosecha de etileno en forma gaseosa, se usan principalmente para promover la maduración del fruto. La fruta de mejor calidad se produce cuando la concentración de etileno, dióxido de carbono y oxígeno en la atmósfera, y la duración de la exposición, la temperatura y la humedad se controlan cuidadosamente y se mantienen en niveles óptimos. Puesto que incluso los frutos marginalmente maduros se pueden forzar a madurar si se les da una estimulación suficiente, es decir, concentraciones elevadas de etileno durante una duración prolongada, no se deben abusar de los efectos promotores de la maduración (McGarry *et al.*, 2005). Esto debido a que el fruto puede presentar estrés por anoxia (ausencia de O₂), en donde existe un aumento de especies activas de oxígeno (AOS por sus siglas en inglés) las cuales debilitan la membrana celular, principalmente, disminuyendo la calidad y vida post-cosecha del fruto (Blokchina *et al.*, 2001).

Aunque la respuesta media-máxima para la mayoría de los efectos de etileno es de 0.1 mL/L, se utilizan comercialmente concentraciones de 10 a 1000 mL/L para promover la maduración de aguacates, plátanos, mangos, melones, kiwis, mango, frutas de hueso y tomates (Blankenship y Sisler, 1991).

Los efectos perjudiciales más importantes del etileno en la calidad del fruto son la alteración o aceleración de los procesos naturales de desarrollo, maduración y senescencia que se ven como beneficiosas en un contexto diferente. Por ejemplo, la promoción de la destrucción de la clorofila sería perjudicial para la lechuga (pero sería beneficiosa para tabaco), o podría ser benéfica para el envejecimiento de los limones (pero sería perjudicial para el almacenamiento de las limas).

A menos que se agregue intencionalmente al ambiente de almacenamiento para provocar una respuesta específica, el etileno se considera un contaminante y la exposición debe ser minimizada. Los efectos perjudiciales son a menudo causados por la exposición no intencional de la mercancía cosechada.

En el fruto el etileno tiene diversos efectos, por ejemplo, el tratamiento con etileno a frutos cítricos, acelera la degradación de la clorofila y la aparición de colores amarillos o anaranjados; un proceso similar ocurre en los plátanos donde el etileno estimula la pérdida de clorofila y la aparición de color amarillo; sin embargo, el etileno también promueve la maduración de la pulpa.

Aparte de su efecto beneficioso sobre la promoción del ablandamiento del tejido durante la maduración del fruto, el etileno afecta la textura promoviendo el ablandamiento no deseado en algunos frutos como pepinos y pimientos, o endurecimiento en espárragos y camotes. La firmeza de muchas frutas y verduras disminuye con el tratamiento de etileno. Esto suele ser beneficioso cuando está asociado con la maduración; por ejemplo, en aguacates, melones, peras y tomates, pero si se aplica durante demasiado tiempo, la maduración puede progresar en senescencia y la pulpa puede llegar a ser demasiado blanda. En general, el etileno mejora el sabor al estimular la maduración de los frutos (Badwin, 2004).

Además, el etileno permite el desarrollo de compuestos volátiles en tomates. Por ejemplo, el compuesto aromático más importante, el (Z) -3-hexenal, fue 31% y 17% más alto en los frutos madurados en la planta, en comparación con las frutas cosechadas maduras verdes y maduras con o sin etileno, respectivamente. En este caso, al igual que con los otros 31 compuestos volátiles del tomate, los compuestos volátiles totales fueron 12% más altos en frutos que fueron cosechados maduros y tratados con etileno que en aquellos maduros sin etileno (Salveit, 1999).

2.7. Ingeniería genética en frutos

La ingeniería Genética ofrece la posibilidad de introducir genes específicos a las plantas sin alterar las características agronómicas propias de las variedades empleadas, permitiendo modificar y aumentar las variedades disponibles en poco

tiempo (Barrero y Chaparro, 2008). Normalmente en las construcciones de selección genética que se diseñan para la transformación de células vegetales, es común introducir además del gen de interés, dos tipos de genes adicionales, un gen reportero y un gen que confiere resistencia a algún antibiótico. Los genes reporteros evidencian desde fases tempranas y de manera directa a las células transformadas. El gen más utilizado para este propósito es el gen GUS (proveniente de *Escherichia coli*) (Chávez *et al.*, 2002).

2.7.1 Descripción de ACC sintasa y ACC oxidasa

Los ácidos aminociclopropano carboxilato (ACC) sintasa y oxidasa, son las principales enzimas participantes en la biosíntesis de etileno, el cual se biosintetiza a partir del aminoácido metionina (Lieberman, 1979); más precisamente a partir de los carbonos 3 y 4, y con requerimiento de ATP. El (S-Ado-Met) es el precursor del ACC, y la etapa limitante en la ruta es la conversión de (S-Ado-Met) a ACC, catalizada por la ACC sintasa.

El grupo tiometilo ($\text{CH}_3\text{-S}$) de la metionina, es reciclado a través del “ciclo de Yang”, mostrado en la figura 4, por medio de la vía de 5-metiltioadenosina, llegando nuevamente hasta metionina. Esta vía cíclica involucra el consumo de energía (ATP) y de O_2 . La última etapa de la vía formadora de Et, la cataliza la enzima ACC oxidasa, que requiere O_2 como sustrato y oxida el ACC para producir Et, CO_2 y ácido cianhídrico (HCN), el cual es detoxificado a cianoalanina por la cianoalanina sintasa, para prevenir su acumulación tóxica. Cuando se tiene una concentración alta de ACC como control natural de la producción de Et, se produce una malonilación del ACC, generando el N-Malonil-ACC, el cual es precursor de otros metabolitos secundarios (Cervantes, 2002).

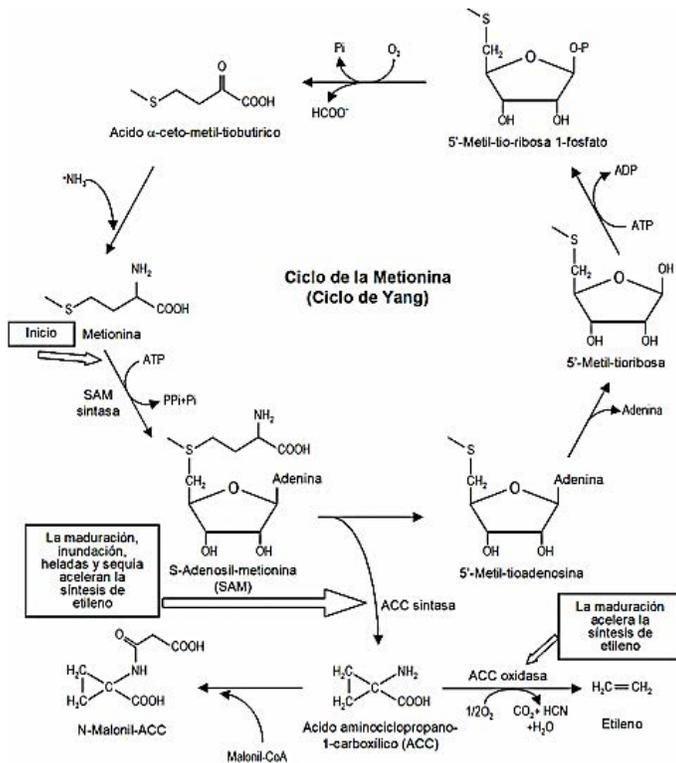


Figura 6. Ciclo de Yang, o de la síntesis de etileno (Jordan y Casaretto, 2006).

2.7.2 Supresión de ACC sintasa y oxidasa

El primer receptor de etileno identificado en el tomate fue revelado a través del aislamiento de la fruta Never-ripening (Nr). En este estudio se observó que la insensibilidad global y dominante de etileno en el mutante Nr fue nula. El Nr demostró ser un gen de tomate estructuralmente similar al receptor de respuesta de etileno que codifica una mutación que afecta la capacidad de unión de etileno. La expresión de genes de NR y homólogos adicionales de los receptores de tomate indicaron que las transcripciones NR y LeETR4 son más abundantes en la

maduración de los tejidos del fruto. La represión de cada gen utilizando construcciones anti-sentido de genes específicos sugirió una redundancia funcional similar a la reportada para la familia de receptores de *Arabidopsis*, aunque se observó la expresión de genes de forma compensatoria, dando como resultado manifestaciones fenotípicas únicas (Chen *et al.*, 2005).

2.7.1 Estudios sobre frutos de tomate modificados genéticamente

En el caso del tomate, existen numerosas especies silvestres del género *Solanum* que son consideradas como un importante recurso para generar variabilidad genética en los programas de mejoramiento. El mejoramiento del tomate se ha orientado a resolver problemas de producción, resistencia a enfermedades y calidad de fruto. Los esfuerzos realizados por mejorar la calidad de fruto han tenido éxito limitado, debido a las complejas interacciones entre los diferentes componentes del fruto, las características de la planta y el ambiente (Casas *et al.*, 2003).

El trabajo del mejorador se facilita cuando los caracteres de interés son de fácil evaluación y altamente heredables. Algunos de éstos en los que se ha puesto atención, por ser importantes en la calidad, son la medición y evaluación de los sólidos solubles totales (SST), acidez titulable, valor de pH y color (Stevens, 1973).

Científicos del Instituto Nacional de Investigación Genómica Vegetal en Nueva Delhi (India) han ampliado la duración de la vida del jitomate tras su recolección en unos 30 días, al suprimir enzimas que promueven la maduración. Los científicos, dirigidos por Asis Datta, identificaron dos enzimas: la alfa-manosidasa (alfa-Man) y la beta-D-N-acetilhexosaminidasa (beta-Hex), que se acumulan en los tomates en fases críticas de su maduración. Utilizaron técnicas de modificación genética para “silenciar” las enzimas en los tomates, e indican que los tomates experimentales que carecían de alfa-Man eran aproximadamente 2.5 veces más firmes que los convencionales y que aquellos que carecían de beta-Hex eran 2 veces más firmes (Waan, 1997).

Los genes mutantes involucrados en el proceso de maduración (*rin*, inhibidor de maduración, *nor*, no madura), se utilizan para desarrollar variedades de vida útil larga, especialmente para la producción de tomates maduros de invernadero. El mutante *rin* inhibe el etileno auto-catalítico durante la maduración, concluyendo así que el locus de este gen es el regulador del conjunto de genes que desarrollan la maduración del fruto (Lincoln y Fischer, 1988). Este locus es denominado MADS-box el cual funciona como factor de transcripción (Fujisawa *et al.*, 2011). Los cruces entre un pariente *rin* con un pariente normal general plantas con frutos de comportamiento de maduración intermedia, y por tanto una vida de útil más larga (Escalona *et al.*, 2009). Otra mutante de tomate es Nor (No ripening) el cual manifiesta anomalías en el proceso de maduración; el gen mutado pertenece a la familia ACCS. Este mutante permanece verde debido al “*Knock out*” del gen *LeACO1* (Arad y Mizrahi, 1983). Los frutos de variedades de vida útil larga mantienen su firmeza durante el almacenamiento por más tiempo que los de variedades convencionales, pero pueden tener menor calidad sensorial. El desarrollo de color rojo también puede reducirse en las variedades de larga vida útil, ya que tienen tasas de producción de etileno menores. Los tomates han servido también como un cultivo modelo para la modificación molecular de los genes asociados con la producción de etileno y las actividades de las enzimas de la pared celular. Las variedades transgénicas modificadas en sus características de maduración y almacenamiento, pueden proporcionar aún más opciones en las operaciones de manejo postcosecha de tomates para el mercado fresco (Escalona *et al.*, 2009).

El aumento del rendimiento se ha logrado mediante el mejoramiento para la tolerancia al calor, para la producción bajo condiciones calientes y húmedas. Debido a las dificultades asociadas con la selección fenotípica para un rendimiento mejorado, recientemente, mediante los marcadores moleculares se han identificado los rasgos que están directa o indirectamente relacionados con el rendimiento del tomate. El tomate es susceptible a más de 200 enfermedades causadas por hongos, patógenos, bacterias, virus o nematodos; las especies silvestres se han utilizado como la fuente de resistencia para todas las enfermedades de tomate. Además, el

tomate cultivado está sujeto al ataque de numerosos insectos, incluyendo varias especies de ácaros, moscas blancas, áfidos, lepidópteros (gusano del fruto del tomate, gusano soldado, gusano bellotero del algodón, gusano soldado del sur), Coleóptera (escarabajo colorado de la papa y el escarabajo pulga del tabaco), Diptera (minedores y mosca de la fruta), muchos de ellos capaces de causar pérdidas devastadoras. El mejoramiento para resistencia a insectos en tomate ha encontrado más dificultades que para el mejoramiento a resistencia a enfermedades. La creación de nuevas variedades ha adquirido gran importancia en los últimos años, como resultado de nuevas técnicas, de nuevas exigencias agrícolas e industriales, y de problemas derivados de la presencia de nuevas enfermedades y plagas (Foolad *et al.*, 2007).

3. JUSTIFICACIÓN

En México como en otros países productores de tomate, este cultivo ha adquirido un mayor consumo, sin embargo, existen una serie de problemas para la producción y comercialización de estos frutos. Principalmente porque el tomate pertenece a los frutos climatéricos, es decir, sintetiza etileno auto-catalítico, que acelera el proceso de maduración de los frutos, y cuya consecuencia es la pérdida que puede ir desde un 45 hasta un 75% de la producción total del cultivo (SAGARPA, 2016). El proceso de maduración de los frutos climatéricos, como el tomate, es muy complejo, implicando una cascada de reacciones, las cuales se han tratado de elucidar para el control del mismo. En este sentido, es necesario realizar investigaciones básicas a nivel molecular dirigidas a la expresión de los genes involucrados en la síntesis de etileno y relacionadas a la maduración del fruto. La información generada de esta investigación permitirá determinar la relación de los genes a analizar con la principal hormona reguladora (etileno).

4. HIPÓTESIS

Frutos de tomate transformados genéticamente con el gen silenciado *TomloxB* generan menor producción de etileno y menor nivel de expresión de ACC oxidasa.

5. OBJETIVOS

5.1. General

Evaluar el efecto del silenciamiento del gen *TomloxB* sobre la actividad de ACC oxidasa, la producción de etileno y la expresión de los genes relacionados (*Tomlox A, B, C*) en frutos de tomate (*Solanum lycopersicum* var. TA234).

5.2. Específicos

- Evaluar el efecto del silenciamiento del gen *TomloxB* sobre la producción de etileno durante la maduración de frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*) var. TA234
- Aplicar etileno exógeno a los frutos silvestres y a los tratados
- Analizar la relación entre ACC oxidasa y lipoxigenasa durante la maduración de frutos de tomate, así como los tratados con etileno exógeno.
- Cuantificar la expresión de los genes *TomloxA, B, C*, ACC oxidasa y ACC sintasa durante la maduración de los frutos, así como los tratados con etileno exógeno.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material vegetal

Los frutos (*Solanum lycopersicum* var. TA234), fueron colectados del invernadero del laboratorio post-cosecha de la Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos, lavados y desinfectados con una solución de cloro (10 ppm).

Los frutos fueron clasificados en 3 estadios de maduración: "Quebrando" (B) que han alcanzado su tamaño completo, pero son parcialmente verdes. "Rayado" (R) frutos que muestran una coloración roja del 50%, y "Rosado" (P) son más de 60% de rojo (Boller *et al.*, 1979). En cada estadio de maduración, cada muestra (fruto) fue analizado por triplicado, en base al tratamiento del diseño, para los análisis moleculares y medición de etileno. Todas las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido para el análisis molecular.

6.2 Variables de respuesta

6.2.1. Producción de etileno

Se cuantificó la producción de etileno proveniente de los frutos en los estadios de maduración descritos anteriormente. Durante su maduración a 25°C los frutos (30-40 g) se colocaron en pequeñas cámaras de vidrio de 0.3 L de capacidad, provistas de una tapa a la cual se le insertó un septo de hule (Figura 7). Los frutos se mantuvieron dentro de las cámaras cerradas por 3 horas para la acumulación de etileno. Simultáneamente se analizó un testigo.



Figura 7. Cámara de respiración

El gas producido por la respiración y contenido en la cámara se extrajo con una jeringa para cromatografía de gases a través del septum de hule, utilizando 1 cm de espacio libre de cabeza. La cuantificación se realizó en un cromatógrafo de gases Agilent modelo 7820A (Figura 8), equipado con una columna Agilent Poraplot-Q de 12 m de longitud, 0.32 mm de diámetro, bajo condiciones de 250°C en el inyector, 100°C en el horno y 250°C en el Detector de Ionización de Flama (FID). Se empleó N₂ UAP como gas acarreador a un flujo de 1.5 mL/min en la columna. Los resultados del CG se representan por el área bajo la curva de operación; con estas áreas se calcularon las concentraciones de etileno mediante una curva estándar.



Figura 8. Cromatógrafo de gases Agilent 7820A

Para calcular la concentración de etileno se empleó la fórmula publicada por Salveit y Yang (1978).

$$PE = \frac{V_{gas}}{t} * \frac{E_{tm} - E_{tb}}{P} * \frac{1}{100}$$

Dónde:

PE= Producción de etileno en $\mu\text{L/g-h}$.

Vgas= Volumen de la cámara – volumen del fruto (mL).

t= Tiempo de residencia del fruto en la cámara (h).

Etm= mg/L de etileno en la muestra.

Etb= mg/L de etileno en el blanco.

P= Peso del fruto en g.

6.3 Aplicación de etileno exógeno en atmósferas modificadas

Los experimentos fueron realizados a 25°C, en las cámaras experimentales (Figura 9). Los frutos fueron colocados dentro de las cámaras, por un tiempo de 120 minutos (Griffiths, 1999), donde se aplicó una mezcla certificada de etileno en aire sintético (PRAXAIR®) de 100 $\mu\text{L/L}$ (concentración crítica en frutos) hasta que un cambio completo de la atmósfera interior fue alcanzado. Para calcular el volumen libre, es decir, el volumen de aire por desplazar. Se obtuvo el volumen de la cámara y el volumen ocupado por los frutos, conociendo previamente la densidad de estos. De esta forma se obtuvo el volumen de aire a desplazar, por diferencia entre el volumen de la cámara menos el volumen ocupado por los frutos. Para esto se utilizó un flujo controlado de la mezcla de etileno a la salida del cilindro. El tiempo necesario para desplazar la atmósfera interior se calculó dividiendo el volumen de aire por desplazar entre el flujo de etileno.



Figura 9. Cámara para aplicación de etileno exógeno

6.4 Actividad de ACC oxidasa

Se pesaron 3 g de una fracción cubica (~2 cm) conteniendo cáscara y pulpa, se cortó en fracciones de 0.5 cm. En baño de hielo se agregó 0.5 mL de Aminoetoxivinilglicina (AVG) (SIGMA[®]) 5 mM y se mantuvo en hielo por 10 minutos. Se adicionaron 0.25 mL de Manitol 0.4 M (J.T. Baker[®]) y 0.5 mL de ACC (SIGMA[®]) 5 mM, se selló el vial y se homogenizó en un vortex. Posterior a la adición de las soluciones mencionadas, la mezcla se incubó a 25 °C, con agitación a 60 rpm por 3 horas.

Pasadas las 3 horas, se mezcló en vortex por 10 segundos y se midió la cantidad de etileno producido; para esto se tomó una muestra de 1 mL de gas del espacio libre de cabeza y se inyectó en el cromatógrafo de gases Agilent modelo 7820A, bajo las condiciones ya descritas. Mediante una curva estándar, se determinó la cantidad de etileno producido por la muestra. Una unidad de actividad enzimática es definida como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de ACC a etileno para producir 1 μ L de etileno/g-h.

6.5 Actividad de lipoxigenasa

Se utilizó una técnica modificada de Gökmen *et al.* (2002) en la cual el extracto se preparó a partir de 10 g de muestra y 50 mL de agua desionizada. Este extracto se

filtró y se centrifugó a 15000 g por 30 minutos. El sobrenadante se utilizó como extracto crudo enzimático. La determinación de proteína se realizó por el método de Bradford.

La solución sustrato fue preparada mezclando 157.2 μ L de ácido linoléico (SIGMA[®] al 60%, 157.2 μ L de Tween 80 y 10 mL de agua desionizada; esta solución fue filtrada a través de nitrocelulosa (Milipore, USA). Esta solución se clarificó con la adición de 1 mL de NaOH 1N (Golden Bell[®]) y se diluyó a 200 mL con buffer de fosfatos (pH 6.0) (J.T. Baker).

Para medir la actividad se preparó la solución sustrato (29 mL), a concentraciones de 0.156, 0.312, 0.625, 1.125 y 2.5 mM de ácido linoléico, se transfirió a un matraz de 125 mL a temperatura controlada (30 °C). Esta solución fue aireada durante 2 minutos y la reacción se llevó a cabo adicionando 1 mL de extracto crudo enzimático. Se transfirieron alícuotas de 1 mL del medio de reacción a tubos de vidrio, a los cuales se les agregó 4 mL de 0.1 N de NaOH a intervalos de 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4 y 5 minutos. Se utilizó la solución de 0.1 N de NaOH para detener la reacción enzimática y clarificar la solución. La formación de hidroperóxidos se midió con un espectrofotómetro Agilent modelo 8453, como el incremento en absorbancia a una longitud de onda de 234 nm, por la presencia de dienos conjugados. El testigo se preparó mezclando 1 mL de la solución sustrato con 4 mL de NaOH 0.1 N.

Una unidad de actividad de LOX es definida como el incremento en absorbancia de 0.001 a 234 nm por minuto por mg de proteína.

6.6 NIVELES DE EXPRESION DE LOS GENES QUE CODIFICAN ENZIMAS PARTICIPANTES EN LA MADURACION DEL TOMATE

6.6.1 Diseño de Primers

Para el diseño de los primers, se buscaron las secuencias de los genes *TomloxA*, *TomloxB*, *TomloxC*, ACC oxidasa y ACC sintasa, en la base de datos del Centro

Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). El factor de elongación (*EF1*) exhibió una expresión estable y fue validado como testigo interno en el análisis de expresión génica (Tian *et al.*, 2015). Para cada gen se encontraron varias secuencias. Para seleccionar la secuencia definitiva de los genes, se tomó en cuenta las que tuvieran información bibliográfica completa (GenBank), comparando la homología de cada una. Los primers fueron diseñados en el programa en línea PRIMER designing tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Se ingresaron las secuencias de cada uno de los genes por separado en formato FASTA.

Una vez diseñados, se comprobó la especificidad de los *primers* mediante el algoritmo BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), con la verificación de un solo match en tomate, correspondiente a la secuencia diana. Los *primers* fueron sintetizados en el IBT-UNAM.

Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos usados.

| Gen | Primer directo (5'-3') | Primer reverso (3'-5') |
|----------------|-------------------------------|-------------------------------|
| <i>TomloxA</i> | GAGGCGTGGGATAGGATTTATG | GAACACATAGAGGGTAAGCTGG |
| <i>TomloxB</i> | ATACACACGCGGTGATCGAA | AGTTTAGGCCACCAAGCCTC |
| <i>TomloxC</i> | GAGCTAACTAGGCCACCAATAG | TTCTATTGCCTATGGTGCTGAA |
| <i>ACCO</i> | TAATGGGAATGGGAAGAAAAGATT | ACAAAGCAAGATAAAGCACCC |
| <i>EF-1</i> | TTCCCTCTATGCCAGTGGAC | CATCTCCAGAGTCCAGCACA |
| <i>ACCS</i> | AAGCTTAACGTCTCGCCTGG | CCACCCTGGCTCTTGACATT |

6.6.2 Aislamiento de ARN.

El RNA total fue extraído de aproximadamente 2 g de muestra congelada de frutos utilizando el reactivo Trizol[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA). El DNA genómico presente en el extracto fue eliminado por digestión con DNasa libre de RNasa (Invitrogen), a 2.5 µg de RNA, de acuerdo con el protocolo del fabricante (Anexos 2). El RNA total fue cuantificado en el equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Alemania) y para corroborar la pureza del DNA se realizaron electroforesis en gel de 10 g L⁻¹ (1%) de agarosa (Sigma[®]) para comprobar la concentración e integridad.

6.7 PCR en tiempo real

Una vez obtenido el RNA, se prosiguió al análisis del nivel de expresión de los genes mencionados; para ello fue utilizado el reactivo Master Mix SYBrGreen[®] (Applied biosystem), siguiendo el protocolo del fabricante. La cuantificación de los niveles del transcrito de los transportadores se realizó comparando los valores del ciclo de amplificación (Ct) de cada gen problema, normalizando con la expresión del gen de actina

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{tg} - \Delta C_{tgc}$$

Donde Ct es el número del ciclo en la cual la amplificación supera la línea base, ΔC_t es el cambio de Ct entre dos muestras (inicial y final), g es el gen de interés y gc es el gen calibrador. El cambio en la expresión relativa de cada gen se calculó como $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Rodríguez y Rodríguez, 2006), en el equipo de PCR-TR (One-step Plus[™] Real Time PCR systems, Applied Biosystems, Alemania)

El protocolo de amplificación consistió en una RT-PCR en base al kit SYBR Green (Applied Biosystems, USA) cuya fluorescencia señal se midió durante la etapa de recocido a 60°C. Para comprobar la especificidad de hibridación de cada oligonucleótido, se llevó a cabo el análisis de fusión curva (55-94 °C) al final de la amplificación.

7. DISEÑO DE EXPERIMENTOS

El análisis molecular de los genes involucrados en la maduración fue realizado en cada estadio de maduración; al igual que la medición de etileno. Una unidad experimental contenía 3 frutos. Los detalles del diseño experimental se describen en la Tabla 4.

Tabla 4. Diseño de experimentos: completamente al azar 2x2x3

| Modificado genéticamente | Aplicación de etileno | Estado de maduración |
|---------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Si | Si | Verde |
| | | Torneado |
| | | Rojo |
| | No | Verde |
| | | Torneado |
| | | Rojo |
| No | Si | Verde |
| | | Torneado |
| | | Rojo |
| | No | Verde |
| | | Torneado |
| | | Rojo |

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Prueba de GUS

Esta técnica se utilizó para hojas de tomate (*Solanum lycopersicum* var. TA234) y así determinar si el vector aún está incorporado en el sistema.

En la figura 10 se puede observar el cambio de coloración (azul (+)); la muestra D representa el 100%, B 90%, C 25%, E y F representa 10% con respecto a la muestra A (hoja de planta silvestre). Esto es debido a la construcción del vector en donde se encuentra la secuencia del gen silenciado en anti-sentido y el gen uida (gen reportero) el cual representa la presencia de la transformación por cambio de coloración al estar en contacto con la β -glucuronidasa.

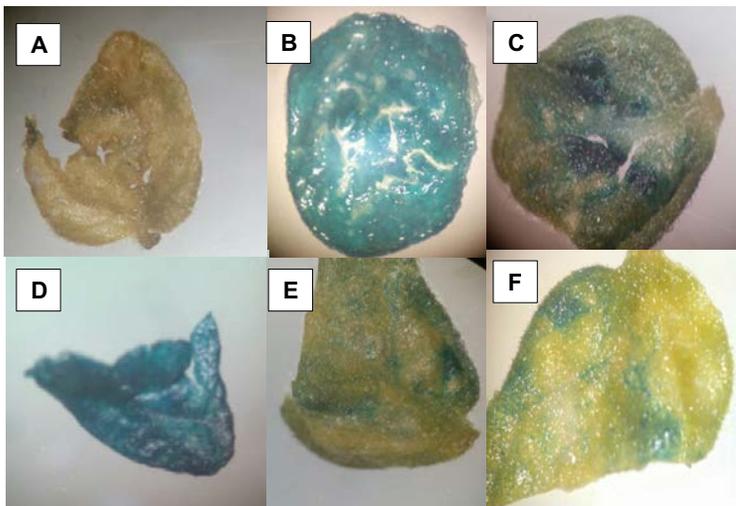


Figura 10. Prueba de GUS (A: Testigo, B: 1.1I, C: 5.2C, D: 5F, E: 2.2D, F: 4.3C)

8.2 Producción de etileno y CO₂ de frutos de tomate

En la figura 11 se puede observar a producción de etileno en el estadio quebrando donde el tratamiento testigo (fruto silvestre) mostró la aparición del pico de etileno entre el día 3 y 4; en cambio, las líneas transgénicas (1I y 5F) presentaron esta aparición los días 6 y 8, respectivamente; sin embargo, la línea transgénica 2.2D exhibió el pico en el día 2. El retardo en la aparición del pico de etileno significa un aumento en la vida de anaquel del fruto (León *et al.*, 2016) debido a que el etileno es una de las principales fitohormonas reguladoras del proceso de maduración, una vez presentado el pico, la presencia de esta hormona desencadena una serie de reacciones que llevan a la síntesis de enzimas (Vijay y Rakesh, 2011) que están relacionadas con el proceso de maduración conduciendo al fruto a la senescencia (Klee, 2002). La aparición retardada del pico se debe probablemente al silenciamiento del gen *TomloxB*, cuya función principal está relacionada con la integridad de la membrana celular, ya que los sustratos (ácidos linoleico y linolénico) de la proteína que codifica este gen están presentes en ella (Ealing, 1994). El mantener la integridad de la membrana disminuye la difusión de los gases (etileno y CO₂) (Ferrie *et al.*, 1994), los cuales por medio de un proceso de señalización (ETR1, EIN) llevan a cabo la síntesis de proteínas catalizadoras, las cuales están involucradas en la maduración del fruto (Klee, 2002). Además, el etileno es percibido por una familia de cinco receptores localizados en la membrana (Wang *et al.*, 2002). Investigaciones realizadas en *Arabidopsis* mostraron que existen 5 receptores de etileno ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 y EIN4, los cuales por medio de técnicas genéticas y bioquímicas se identificaron como sensibles al etileno (Bleecker y Kende, 2000). Además, en las mismas figuras se presentan la producción de etileno (B) en frutos con administración de etileno exógeno, en donde se observa el mismo efecto en el retraso de la aparición del pico climatérico; sin embargo, se encontró una disminución en la concentración de etileno de los frutos transgénicos, por lo tanto la administración de etileno exógeno ejerció un efecto negativo en los frutos transgénicos y positivo en el fruto testigo; efecto contrario a lo reportado por

Montalvo *et al.* (2007) en donde la aplicación de etileno exógeno aumento la producción de etileno.

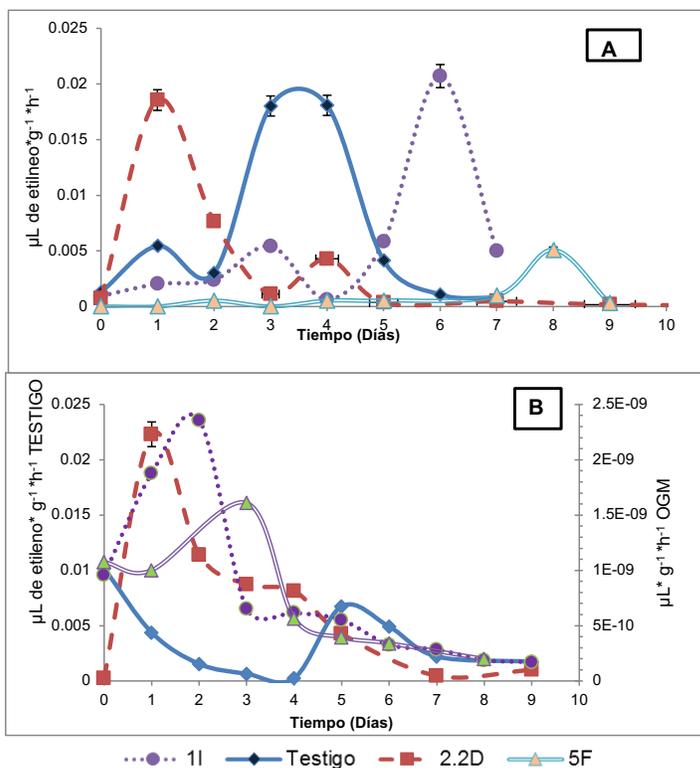


Figura 11. Producción de etileno en frutos de tomate en el estadio quebrando: (A) Frutos sin administración de etileno exógeno; (B) Frutos con administración de etileno exógeno

En la siguiente figura (12) se presenta la producción de etileno en frutos de tomate; durante el estadio rayando. Se aprecia que la aparición del pico de etileno fue variada; el tratamiento testigo lo exhibió entre los días 2 y 4, ya que no hubo diferencias significativas entre estos días, mientras que las líneas transgénicas (1I, 5F y 1I) mostraron el pico los días 2, 3 y 4, respectivamente. Esta variación en la

producción máxima de etileno se atribuye a que el fruto durante este estado mostró mayor cantidad de cambios. Existen estudios durante esta etapa de maduración en donde se reporta la producción de pigmentos como carotenoides y licopeno (Vijay y Rakesh, 2011), la descomposición de compuestos de reserva como almidón hacia monosacáridos (Deikman, 1997), mayor descompartamentación de la membrana celular, en la cual la enzima lipoxigenasa actúa, aumentando la difusión de los gases (Ealing, 1994).

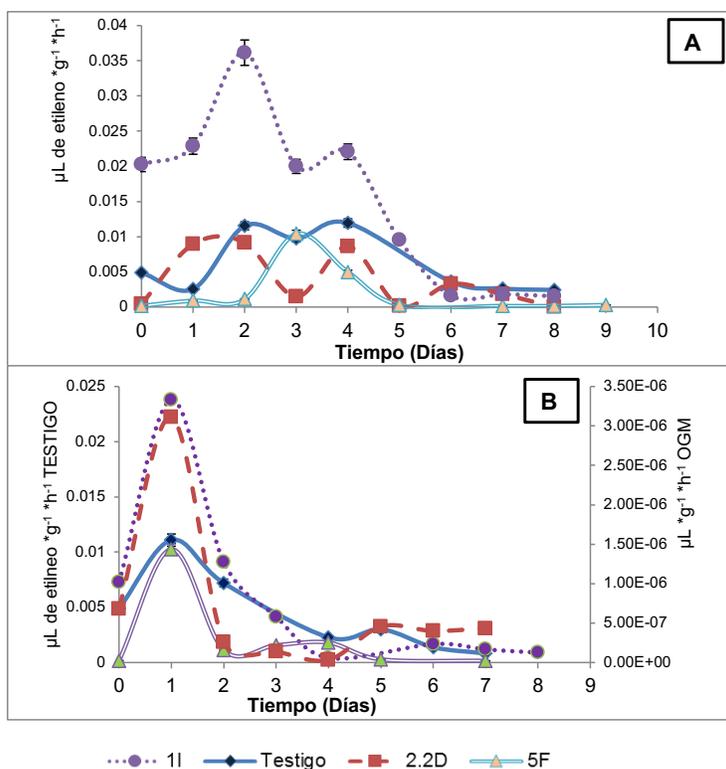


Figura 12. Producción de etileno en frutos de tomate en el estadio rayado: (A) Frutos sin administración de etileno exógeno; (B) Frutos con administración de etileno exógeno

La producción de etileno varía de acuerdo al estado de maduración del fruto, obteniendo una menor producción en los primeros estados de maduración (figura 8 y 9). En la figura 13 se muestra la producción de etileno en el estadio rosado, donde se observa que el tratamiento testigo mostró una mayor síntesis de etileno ($\approx 0.04 \mu\text{L}$ de etileno $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$), mientras que las líneas transgénicas tuvieron una menor producción. La aparición del pico de etileno en el testigo, se observó el día 3, mientras que en las líneas transgénicas 1I, 2.2D y 5F lo hizo los días 1, 2 y 5, respectivamente. Esta variación en la aparición del pico de etileno está relacionada con el cambio de coloración observado en la figura 13, el cual indica la presencia del vector con el gen silenciado el cual corresponde a *TomloxB*, que sintetiza la enzima lipoxigenasa. Sin embargo, la concentración de etileno es reducida en comparación al tratamiento testigo. Esto es probablemente atribuido al silenciamiento del gen que codifica LOX B (León, 2016), lo que permite una menor síntesis de la enzima, y mantiene la integridad de la membrana (Ealing, 1994); por lo tanto se advierte una alta producción de etileno en el fruto testigo, ya que mientras más elevada es la concentración de etileno, los receptores del mismo se activan (Chen *et al.*, 2005).

La producción de etileno de frutos de mango tratados con etileno exógeno aumentó rápidamente y alcanzó un pico en el día 4 de almacenamiento. Esta observación indicó que la acumulación de etileno fue posiblemente debido a mayores tasas de oxidación de ACC a etileno, como lo demuestra el rápido aumento de la actividad ACC oxidasa de la fruta tratada. El tratamiento con 1-MCP o el etileno exógeno mejoró la actividad de ACCO, que se asoció con una mayor producción de etileno de frutos tratados con 1-MCP y etileno. Este es el primer informe de estudios en los que 1-MCP podría estimular la actividad ACCO.

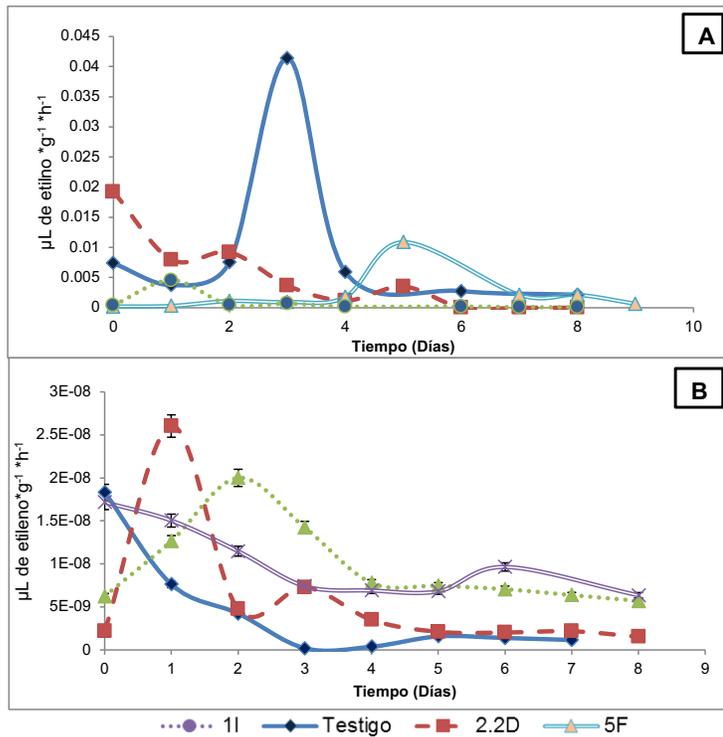


Figura 13. Producción de etileno en frutos de tomate en el estadio rayado: (A) Frutos sin administración de etileno exógeno; (B) Frutos con administración de etileno exógeno.

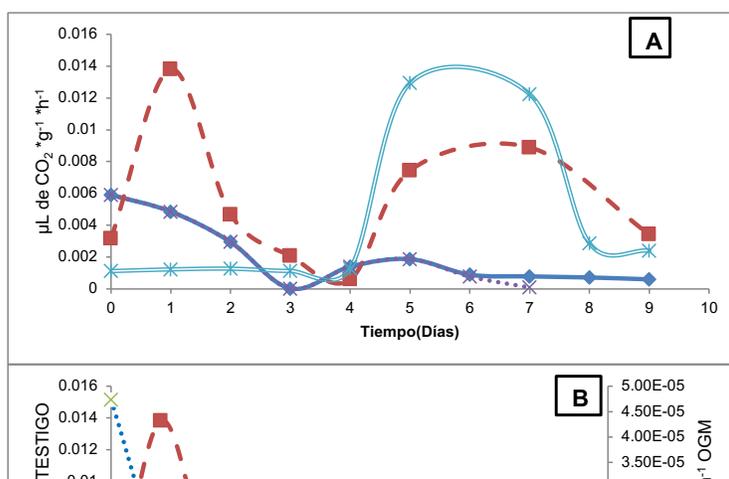
La respiración es el proceso mediante el cual las reservas orgánicas de carbohidratos, proteínas y grasas son degradadas a productos finales simples con liberación de energía (Kader, 1992); este proceso es determinado de manera experimental mediante la producción de dióxido de carbono (CO_2). En las figuras 14 a la 16 se muestra la producción de este gas en el fruto testigo, así como en las líneas transgénicas 2.2D, 1I y 5F.

Durante el estado quebrando no se observa un aumento en la síntesis de CO_2 en frutos con aplicación de etileno exógeno; este fenómeno ocurre porque el etileno en

Eliminó: ¶

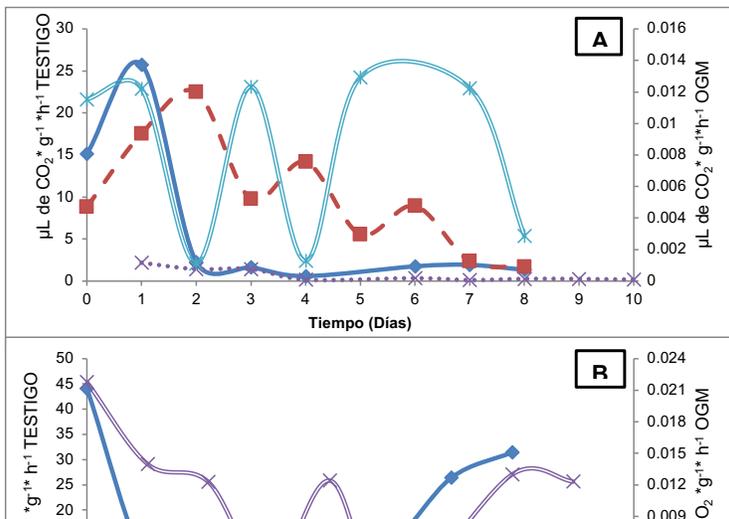
esta etapa no es autocatalítico (Figura 14). Además, se puede observar que la producción de CO₂ está regulada por el etileno, principalmente durante el estado torneado, ya que, al proporcionar etileno exógeno, la producción de CO₂ aumenta (figura 15). El efecto contrario se observó durante el estado rosado, debido a la desaparición del pico climatérico, el cual ocurre durante el estado torneado. Generalmente los frutos climatéricos muestran un incremento en la producción de CO₂ y después un decline, los cuales coinciden con la maduración o senescencia de los mismos (Wang et al., 2002).

En las figuras 14, 15 y 16 se muestran las gráficas de respiración en el estado quebrando, torneado y rosado, respectivamente. Se observa que el testigo tuvo una menor producción de CO₂ comparándola con las líneas transgénicas. Esto significa que el etileno y el CO₂ se incrementan en el proceso de maduración; estos resultados concuerdan con Mathooko (1996), en cuyo trabajo indica que el CO₂ puede actuar como inductor o supresor de la misma respiración esto depende de la concentración in situ. Una mayor síntesis de CO₂ implica la inhibición del proceso de maduración, debido a que se produce anoxia en el fruto el cual retrasa la maduración, esto debido a que el O₂ es el receptor de electrones en la cadena respiratoria; es decir, hay una menor producción de energía química (ATP), la cual es necesaria para la síntesis de etileno (ciclo de Yang). Una opinión generalizada es que el dióxido de carbono puede regular el metabolismo respiratorio a través de sus efectos antagónicos sobre la acción del etileno. Otra hipótesis que se ha utilizado para explicar el efecto del dióxido de carbono sobre el metabolismo respiratorio en frutas y verduras es su influencia en el pH de las células. Tras la exposición a un nivel elevado de dióxido de carbono, el pH de las frutas y hortalizas podría disminuir debido a la disociación del ácido carbónico a bicarbonato e iones hidrógeno hasta un punto en el que la función fisiológica normal podría no ser sostenida (Mathooko, 1996). Además, investigaciones con peras indican que una producción alta de CO₂ inhibe a la enzima ACC oxidasa, la cual es la encargada de convertir ACC a etileno (Hans et al., 2003).



—●— TESTIGO -■- 2.2D ····×··· 1I -×- 5F

Figura 14. Producción de CO₂ de frutos de tomate en el estadio quebrando: (A) Frutos sin administración de etileno exógeno; (B) Frutos con administración de etileno exógeno



}

Figura 15. Producción de CO₂ de tomate en el estadio rayado: (A) Frutos sin administración de etileno exógeno; (B) Frutos con administración de etileno exógeno

Al aplicarse etileno exógeno, la producción de CO₂ de los frutos transgénicos fue menor en comparación a los frutos sin adición de etileno exógeno; este fenómeno se relaciona con la producción de etileno, visto anteriormente. La disminución de la síntesis de la enzima lipoxigenasa (*TomloxB*) causó que el etileno administrado se comportara como reductor de su propia síntesis, mismo fenómeno observado en la producción de etileno. Efecto contrario es observado por varios investigadores (Bufler, 1984; Chaves *et al.*, 2002; Agar *et al.*, 1999; Montalvo *et al.*, 2007), donde la administración de etileno exógeno a frutos permitió un aumento en la producción de etileno y CO₂.

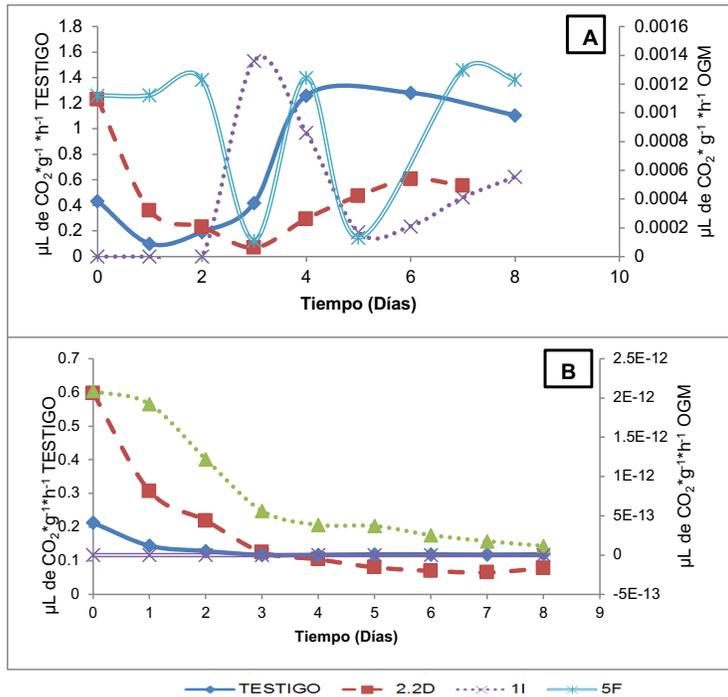


Figura 16. Producción de CO₂ de frutos de tomate en el estadio rosado: (A) Frutos sin administración de etileno exógeno; (B) Frutos con administración de etileno exógeno

8.3 Actividad de lipoxigenasa

La lipoxigenasa es una de las enzimas importantes que participa en el proceso de maduración de los frutos. Sus principales sustratos son los ácidos grasos poliinsaturados como los ácidos linoléico o linolénico, en la membrana celular. Los

resultados encontrados sobre la actividad de lipoxigenasa en los frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*) var. TA234 en estado quebrando se muestran en las siguientes figuras (17 – 19).

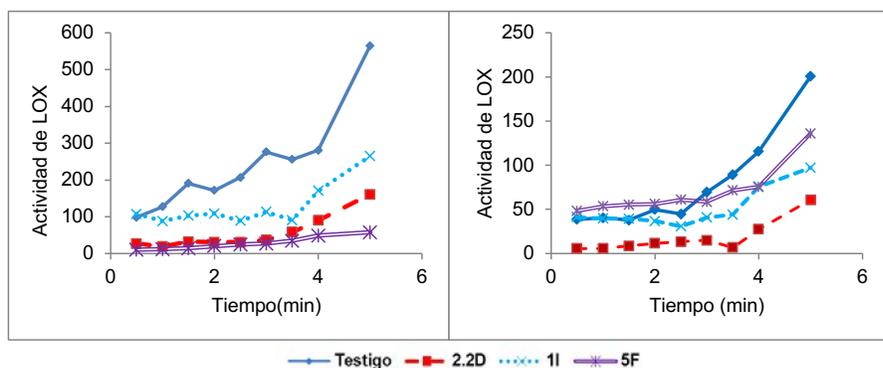


Figura 17. Actividad de LOX de frutos de tomate en el estadio quebrando: (A) Frutos sin administración de etileno exógeno; (B) Frutos con administración de etileno exógeno

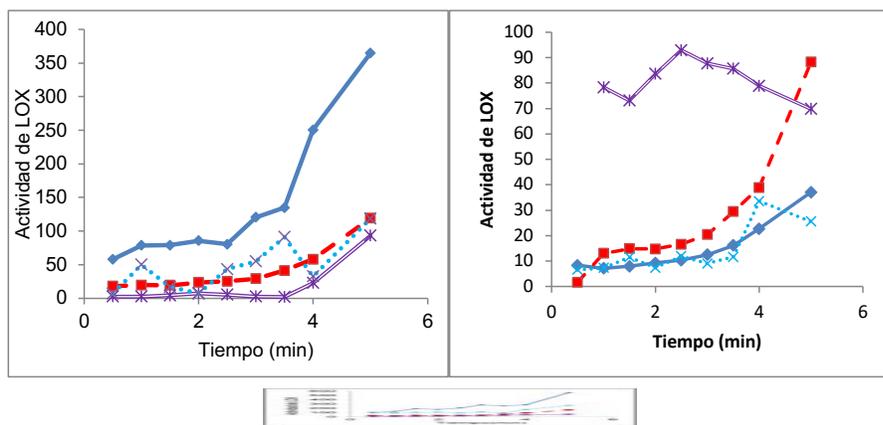


Figura 18. Actividad de LOX de frutos de tomate en el estadio rayado: (A) Frutos sin administración de etileno exógeno; (B) Frutos con administración de etileno exógeno

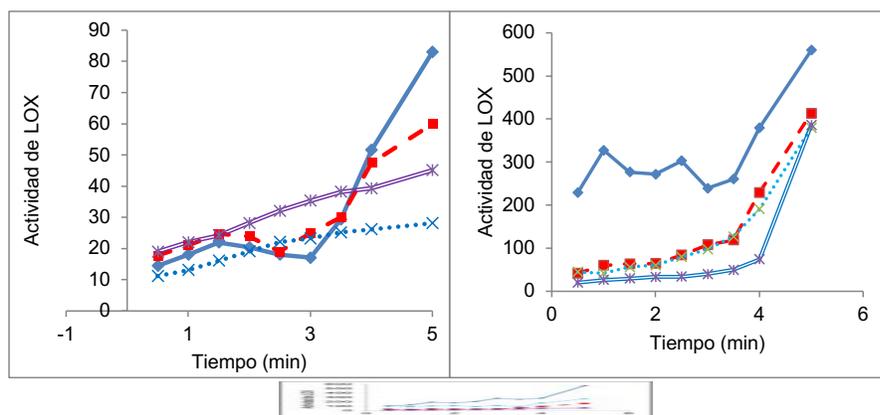


Figura 19. Actividad de LOX de frutos de tomate en el estadio rosado: (A) Frutos sin administración de etileno exógeno; (B) Frutos con administración de etileno exógeno.

La actividad de lipoxigenasa es proporcional a la concentración de sustrato (ácido linoleico) generalmente. Algunas cinéticas mostraron (datos no mostrados) el efecto de concentración micelar crítica, el cual consiste en la formación de micelas de aceite, con una variación de tamaño de las mismas, que afectan las lecturas espectrofotométricas (Riley *et al.*, 1996), esto se observó en concentraciones de 2.5 mM.

La actividad de lipoxigenasa de aquellos frutos que fueron genéticamente modificados (silenciamiento del gen *tomloxB*) presentaron actividad, pero menor que los frutos silvestres. Esto debido a que el silenciamiento no inhibe la expresión de RNA mensajero, sino que la reduce con la formación de RNA de doble cadena (Beaudin y Rothstein, 2006). Existen otros estudios (Stearns Glick, 2003; Diaz *et al.*, 2012) en los que se inhibe la expresión de cierta enzima (denominado *knockout*), en el caso de frutos de tomate al aplicar bloqueo de la una proteína receptora de etileno, esta no manifestó actividad y el fruto permaneció en estado verde (fruto denominado *nor* (No ripening) (Giovanni, 2004).

La ruta metabólica de LOX se desencadena cuando la membrana celular se rompe e implica la hidrólisis de esos ácidos grasos de los glicerolípidos de las plantas por la acción de acil-hidrolasas endógenas. Los ácidos linoleico y linolénico libres se oxidan a continuación por las enzimas lipoxigenasas para producir sus derivados 9- o 13-hidroperóxido, que a continuación sirven como sustratos para la vía hidroperóxido liasa (HPL). En el tomate, el aroma del fruto cuando madura es causado por una serie de aldehídos y alcoholes volátiles de seis átomos de carbono, como el hexanal, el trans-2-hexenal, el hexanol o el cis-3-hexenal, que se producen típicamente a partir de ácidos grasos poliinsaturados como los ácidos linoléico y linolénico, a través de la vía LOX (Palou *et al.*, 2003).

En la tabla 6 se puede observar los parámetros cinéticos obtenidos en los diferentes estados de maduración de los frutos de tomate. Los tratamientos de las líneas transgénicas 5F y 11 en los estados quebrando y rayado tuvieron una menor V_{max} (Velocidad máxima), mientras que en el estado rosado son mayores. De acuerdo a Riley *et al.* (1996), existen muchos cambios durante el desarrollo del fruto, sobre todo en la actividad de lipoxigenasa. La actividad de dichas enzimas aumentó en 69% entre maduro verde y estado quebrando, mientras que en estado rojo maduro se mantienen. Comparándolo con los resultados obtenidos, el silenciamiento tuvo un mayor efecto en los primeros estadios de maduración de los frutos de tomate.

Tabla 5. Parámetros cinéticos.

| Estadio | Muestra | Km (min ⁻¹) | Vmax (mmol min ⁻¹) |
|-----------|-----------|-------------------------|--------------------------------|
| Quebrando | Silvestre | 0.190 ± 0.013 | 12.853 ± 0.012 |
| | 2.2D | 0.220 ± 0.0046 | 14.121 ± 0.56 |
| | 1I | 0.368 ± 0.231 | 12.271 ± 0.012 |
| | 5I | 0.238 ± 0.023 | 9.444 ± 0.32 |
| Rayado | Silvestre | 0.179 ± 0.024 | 14.837 ± 0.023 |
| | 2.2D | 0.198 ± 0.032 | 3.431 ± 0.44 |
| | 1I | 0.287 ± 0.167 | 5.313 ± 0.32 |
| | 5I | 5.885 ± 0.21 | 11.467 ± 0.32 |
| Rosado | Silvestre | 0.298 ± 0.014 | 66.225 ± 2.86 |
| | 2.2D | 0.321 ± 0.0016 | 67.567 ± 0.92 |
| | 1I | 0.438 ± 0.023 | 69.444 ± 0.32 |
| | 5I | 0.842 ± 0.002 | 73.557 ± 0.021 |

8.4. Actividad de lipoxigenasa en frutos con aplicación de etileno exógeno

Estudios *a priori* revelan que la enzima lipoxigenasa está relacionada con la producción de etileno, sin embargo, investigaciones posteriores mencionan que esta enzima es independiente y no regulada por etileno; el hecho de que la biosíntesis de etileno es aumentada por etileno exógeno a través de las enzimas relacionadas con la maduración (Todd *et al.*, 1990), sugiere que existe una relación entre el etileno y la lipoxigenasa. En las siguientes figuras se muestra la actividad de lipoxigenasa de fruto con aplicación de etileno exógeno.

En las figuras 17, 18 y 19 se aprecia la actividad de LOX en frutos con aplicación de etileno exógeno (100 µL/L); el comportamiento es similar a los presentados en las figuras, donde la actividad de LOX es menor en los frutos transgénicos comparados

con el fruto silvestre. El etileno es considerado auto-catalítico, e induce la formación de enzimas que aceleran la maduración y su síntesis; por lo tanto, el silenciamiento genético de *TomloxB*, en donde hay una menor síntesis de lipoxigenasa no se ve afectado por el etileno exógeno, ya que la actividad de LOX se encuentra disminuida. Zhang *et al.* (2009) demostraron que la actividad lipoxigenasa aumenta conforme el proceso de maduración se desarrolla.

En las figuras 18 y 19 se muestran las actividades de LOX en los estadios rayado y rosado, respectivamente. Se observa el mismo comportamiento que en el estado de maduración quebrando. La modificación genética realizada produjo una reducción de su actividad. Griffith *et al.* (1999), mostraron resultados donde la actividad de LOX aumentó con el desarrollo de la maduración del fruto; esta actividad se intensifica después de aplicar etileno exógeno durante 0.5 horas. Ellos mencionan que el etileno exógeno ejerce un efecto positivo en la actividad de lipoxigenasa. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos en el presente trabajo de investigación; por tal, se propone que la actividad de lipoxigenasa es independiente de etileno. Además, aunque el comportamiento es similar, la actividad aumento, evidenciando que hay cierto tipo de regulación entre etileno y LOX.

Tabla 6. Parámetros cinéticos de LOX al administrarse etileno exógeno

| Estadio | Muestra | Km (min ⁻¹) | Vmax (mmol) |
|---------|---------|-------------------------|-------------|
|---------|---------|-------------------------|-------------|

| | | | min ⁻¹) |
|-----------|-----------|--------------|---------------------|
| Quebrando | Silvestre | 0.095±0.02 | 14.749±0.01 |
| | 2.2D | 0.131±0.011 | 4.915±0.23 |
| | 1l | 0.125±0.012 | 3.871±0.126 |
| | 5l | 0.142±0.022 | 7.874±0.221 |
| Rayado | Silvestre | 0.294±0.123 | 26.562±0.021 |
| | 2.2D | 0.495±0.043 | 10.01±0.005 |
| | 1l | 0.318±0.132 | 7.299±0.074 |
| | 5l | 0.339±0.034 | 18.727±0.054 |
| Rosado | Silvestre | 0.277±0.054 | 24.745±0.12 |
| | 2.2D | 0.339±0.102 | 18.727±0.32 |
| | 1l | 0.482±0.044 | 4.052±0.23 |
| | 5l | 0.9655±0.049 | 5.555±0.123 |

La velocidad máxima (V_{max}) representa la velocidad más alta que la enzima puede alcanzar; velocidad a la cual la concentración de enzima es igual a la concentración del complejo enzima-sustrato (ES). En las tablas 5 y 6 se muestran los parámetros cinéticos de la LOX; donde los frutos silvestres mostraron mayor V_{max} y una mayor K_m ; mientras que los parámetros de los frutos transgénicos tuvieron una disminución en V_{max} ; esto no significa que las enzimas de los transgénicos tengan mayor especificidad hacia sustrato (Zhang *et al.*, 2011), más bien una menor concentración de la enzima LOX, ya que la constante de Michaelis-Menten (K_m) por definición, es igual a la concentración de sustrato con la cual la velocidad de reacción enzimática alcanza un valor igual a la mitad de la velocidad máxima (Sofo *et al.*, 2004). En otras palabras, representa la concentración de sustrato en la cual la mitad de los sitios activos están ocupados por el sustrato. A menor cantidad de enzima existe una

menor cantidad de sitios activos; esto se relaciona con la velocidad máxima de reacción, donde los frutos silvestres tuvieron una mayor V_{max} que los frutos transgénicos. Comparando los parámetros cinéticos de frutos sin tratamiento y los administrados con etileno exógeno, se observa una disminución de V_{max} . Esto es debido a que el etileno provoca una señalización para la producción de una mayor cantidad de enzimas. Además, si se tiene un incremento de la cantidad de enzima, la K_m será menor porque a mayor cantidad de enzima la afinidad con el sustrato aumenta (Buranasompob *et al.*, 2007).

No existen reportes sobre el cálculo de parámetros cinéticos de LOX durante la maduración del fruto de tomate; sin embargo, existen trabajos donde reportan que la actividad de LOX aumenta conforme el proceso de maduración se desarrolla (Ocampo *et al.*, 1986). Se han realizado estudios donde esta enzima se ve afectada por altas presiones, su inhibición alarga la vida de anaquel de productos como jarabes, cremas, nueces y semillas (Chaikham *et al.*, 2007).

8.5 Actividad de ACC oxidasa (ACCO)

La síntesis de etileno es crítica para la maduración de los frutos. La vía de la biosíntesis del etileno ya ha sido caracterizada, y las enzimas claves son el ácido aminociclopropanocarboxílico sintasa (ACCS) y la ACC oxidasa (ACCO), que regulan la producción de ACC a partir de S-adenosilmetionina (SAM) (Naja *et al.*, 2016). En el fruto de tomate, la inhibición de la biosíntesis de etileno a través del silenciamiento en anti-sentido del gen TomloxB extendió la vida útil (León, 2017). De acuerdo a los resultados obtenidos se observó que la actividad de ACCO fue afectada por el silenciamiento, haciéndose más notorio en el estadio quebrando, con una reducción de la actividad enzimática (UA) en su punto máximo de 90% (0.011 UA en silvestre y 0.001 UA en promedio de las líneas transgénicas), comparadas con los resultados de Bolitho *et al.* (1996) en donde obtuvieron una reducción máxima de aproximadamente 50% de actividad, con lo cual la producción de etileno a partir de ACCO no solo depende de la actividad de esta enzima sino que está acompañada de la actividad de diferentes proteínas catalizadoras, en este caso la lipoxigenasa juega un papel importante en la síntesis de etileno.

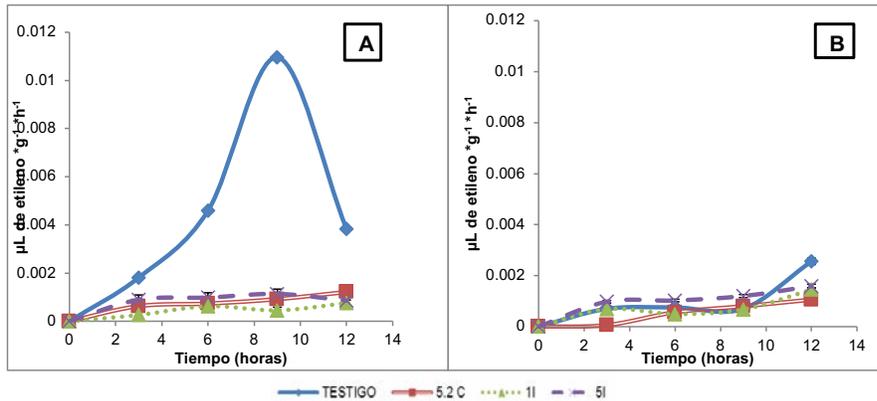


Figura 20. Actividad de ACC oxidasa (ACCO) en el estadio quebrando: (A) Frutos sin administración de etileno exógeno; (B) Frutos con administración de etileno exógeno

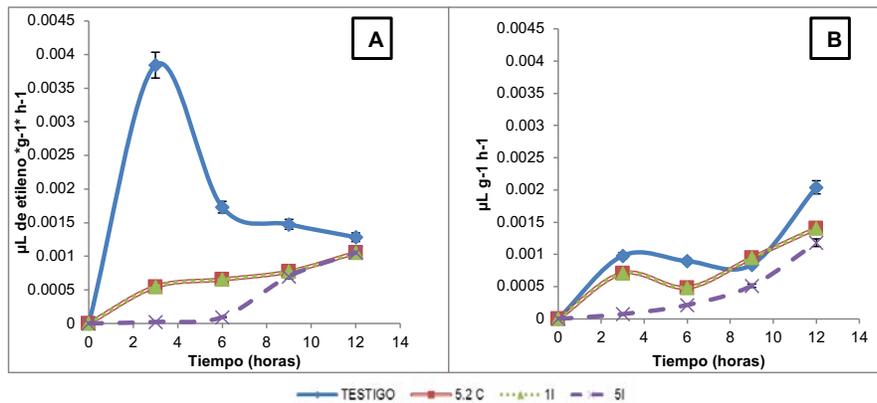


Figura 21. Actividad de ACC oxidasa (ACCO) en el estadio rayado: (A) Frutos sin administración de etileno exógeno; (B) Frutos con administración de etileno exógeno

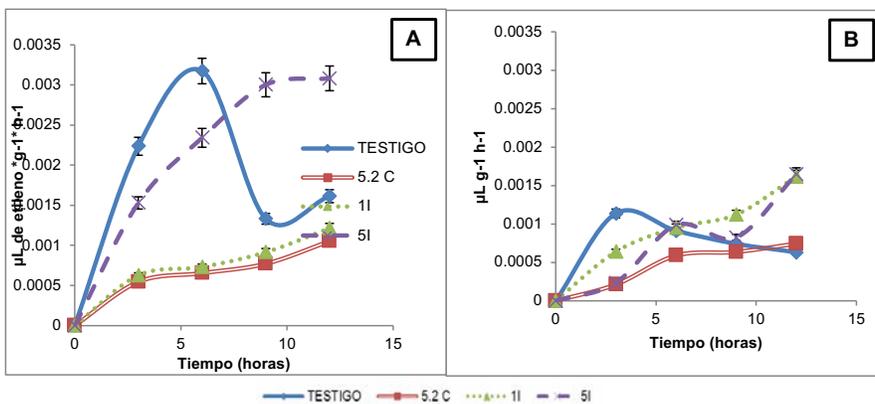


Figura 22. Actividad de ACC oxidasa (ACCO) en el estadio rosado: (A) Frutos sin administración de etileno exógeno; (B) Frutos con administración de etileno exógeno

En las figuras 23, 24 y 25 se puede observar una reducción del nivel de expresión de ACCO y ACCS, comparando frutos silvestres con las líneas transgénicas. Esta reducción es más favorable en el estadio quebrando (figura 23), debido a que en esta etapa (pre-climatérico) aún hay una regulación de etileno (ETR1), mientras que en el estadio rosado existe una reducción menor debido a que el fruto se encuentra en la fase post-climatérica, donde las reacciones que conducen a la maduración del fruto son irreversibles. Este aumento en la actividad de ACCO concuerda con los resultados de Kasai *et al.* (1998), quienes trabajaron con Brócoli. Estos autores evidenciaron que, durante la senescencia, la producción de etileno aumenta y posteriormente declina. La actividad de ACCO aumenta con un incremento en la producción de etileno; sin embargo, los resultados obtenidos muestran que la actividad de ACCO fue reducida, aun presentando síntesis de etileno. Este efecto fue debido al silenciamiento del gen *TomloxB*, el cual permite mantener a la membrana de las células vegetales más integra, reduciendo así la difusión tanto de etileno como de CO₂ (Vijay y Rakesh, 2011).

Comparando las actividades de los frutos con y sin tratamiento de etileno exógeno observamos un efecto negativo de esta hormona sobre la actividad de ACCO, incrementando las actividades de las líneas transgénicas en presencia de etileno. En la figura 17 se muestra la actividad de esta enzima en el estado quebrando, donde los frutos (tanto testigo como líneas transgénicas) con administración de la hormona gaseosa, exhiben una disminución en la expresión de ACCO; esto a causa de que el etileno es el principal regulador de esta enzima, el cual sufre de inhibición competitiva con la ACC (Bousquet y Thimann, 1983). Sin embargo, todos los tratamientos muestran una actividad similar, no hay diferencia significativa entre el testigo y las líneas transgénicas. Resultados similares fueron obtenidos por Bidonde *et al.* (1998), los cuales obtuvieron un aumento en las actividades de ACCO, debido a que el etileno induce un incremento en la síntesis de esta enzima; esto explicaría el retardo en la aparición del pico de etileno de las líneas transgénicas, una menor actividad de ACCO, una disminución en la producción de etileno y un aumento en la vida de anaquel del fruto.

En las figuras 24 y 25 se exponen las actividades de ACCO en los estadíos rayado y rosado, donde se puede observar una reducción de las actividades en frutos con aplicación de etileno exógeno. En los resultados anteriores se hace notar el efecto del silenciamiento, reduciéndose en todos los estados de maduración la actividad de ACCO; esto significa que TomloxB está relacionada con ACCO, ya que una disminución en la actividad de TomloxB conlleva a una reducción de la actividad de ACCO. Riley *et al.* (1996) demostraron que la lipoxigenasa está relacionada con la formación de hidroperóxidos a partir de ácidos grasos (C:18, principalmente ácidos linoléico y linolénico) que se localizan y brindan estabilidad a la membrana de las células vegetales. La integridad de la membrana está relacionada con la difusión de los gases (Yokotani *et al.*, 2009) y a mayor integridad (Todd *et al.*, 1990) es menor la difusión y el etileno exógeno tiene una menor señalización para la aceleración de la madurez del fruto de tomate.

8.6 Niveles de expresión (RT-PCR)

En este proyecto se utilizó el método comparativo, el cual es un modelo matemático que calcula cambios en la expresión del gen como un relativo entre la diferencia de la muestra experimental y la muestra patrón.

En este trabajo se determinó el nivel de expresión de los genes Tomlox A, B, C, ACCO y ACCS, los cuales están relacionados con la maduración del fruto por medio de qRT-PCR en frutos de tomate en los estadios quebrando, rayado y rosado de maduración como se ve en la figura 17.

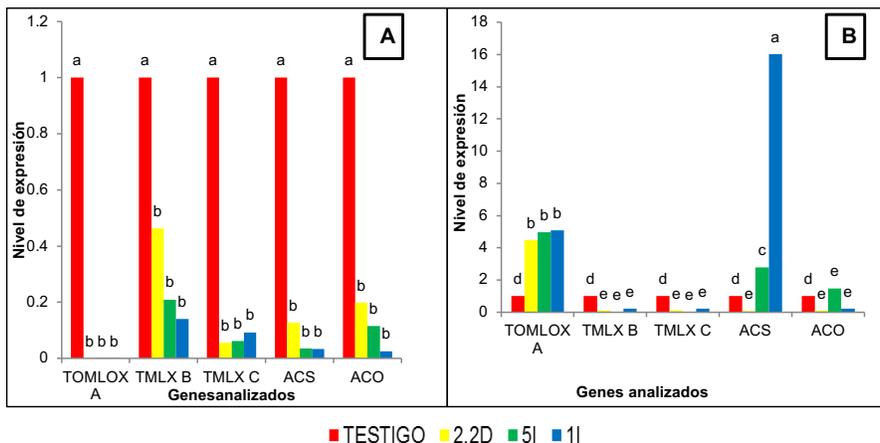


Figura 23. Niveles de expresión estado quebrando: (A) Frutos sin administración de etileno exógeno; (B) Frutos con administración de etileno exógeno

En la gráfica 23, se puede observar que los genes TomloxA, TomloxC, ACCS, ACCO analizados exhiben una reducción en su nivel de expresión; esto debido al silenciamiento del gen TomloxB de las líneas transgénicas. Se aprecia que el nivel de expresión en el testigo es igual a 1. En base a esto, los demás genes están "silenciados". El gen TomloxA se observa mayormente inhibido, probablemente debido a la existencia de homología entre estos genes (40%), el nivel de expresión

menor al gen silenciado se debe a que TomloxA es expresado mayormente en la germinación de las semillas (movilización de lípidos).

El nivel de expresión del gen TomloxC (menor que el gen TomloxB), se debe a que este gen está relacionado con la producción de compuestos volátiles durante el estadio rayado, al comenzar la maduración del fruto existe poca síntesis de compuestos volátiles. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de ACCS y ACCO, como causa de que el fruto se encuentra en pre-climatérico, donde la producción de etileno por las principales enzimas que participan es baja, a comparación de los demás estadios estudiados en este trabajo.

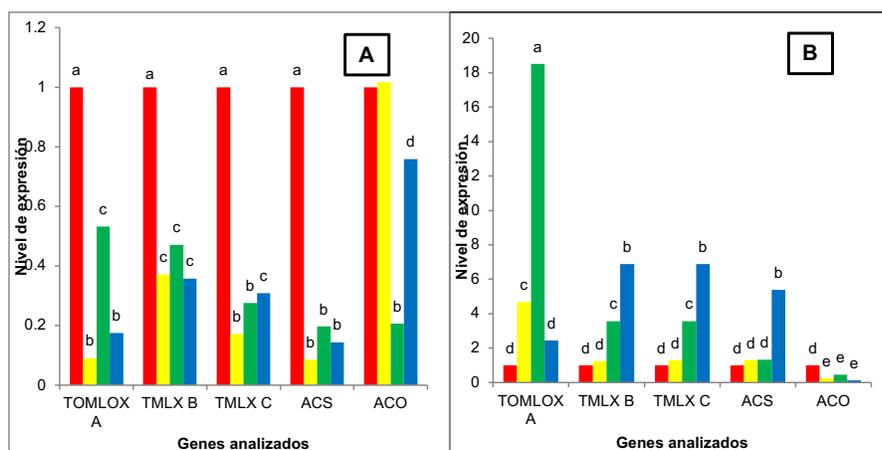
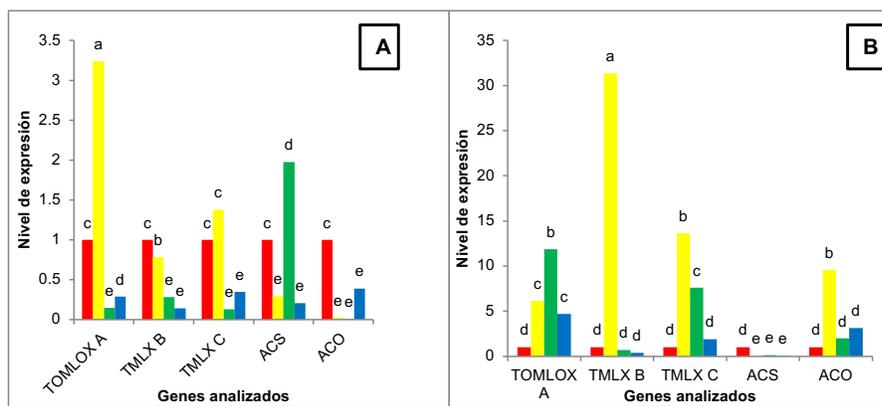


Figura 24. Niveles de expresión estado rayado: (A) Frutos sin administración de etileno exógeno; (B) Frutos con administración de etileno exógeno



■ TESTIGO ■ 2.2D ■ 5l ■ 1l

Figura 25. Niveles de expresión estado rosado: (A) Frutos sin administración de etileno exógeno; (B) Frutos con administración de etileno exógeno

En las figuras anteriores (24 y 25), el nivel de expresión de todos los genes fue diferente. El análisis mostró que los genes muestran un alto grado de expresión diferencial en el tomate en la última etapa de maduración analizada (rosado); el nivel de expresión del gen ACCO fue elevada a partir del estadio rayado. Estos resultados concuerdan con la observación de que ACCO es el miembro predominante de esta familia de genes que se expresa en frutos de tomate.

Se han estudiado varios niveles de expresión del gen ACCO. En los tejidos del fruto han sido reportados en varias especies de plantas. En el melón, por ejemplo, el nivel de expresión de ACCO1 aumenta en el fruto maduro y en la respuesta al tratamiento con etileno en hojas y heridas. Estos resultados son similares a los obtenidos en el presente trabajo. En manzana, la ACCO1 se acumula en frutos maduros, la expresión de ACCO2 ocurre predominantemente en tejidos de fruta más jóvenes, mientras que ACCO3 muestra un menor nivel de expresión en tejidos de fruta jóvenes y muestra el menor nivel de expresión en frutos maduros, al igual que el tomate durante el estado quebrando existe una menor expresión comparándola con

el estadio rosado donde el nivel de expresión de ACCO aumenta (Zohreh *et al.*, 2012).

Las expresiones de los genes estudiados relacionados a la maduración se mantienen durante este proceso, especialmente en la etapa quebrando. Sin embargo, la expresión de ACCO fue baja y aumentó conforme el proceso de maduración se desarrollaba. Esto es consistente con otros reportes que han demostrado que sólo tres genes (*TomloxA, B, C*) (Beaudin y Rothstein, 1997; Griffith *et al.*, 1999) se expresaron diferencialmente. La ACCO podría ser considerada clave en la aparición del pico de etileno, como se explicó anteriormente, los resultados de actividad de ACCO concuerdan con los niveles de expresión presentados (Alexander y Grierson, 2002).

Se ha demostrado que los niveles de transcritos de ACCO están regulados por el propio etileno (Blecker y Kende, 2000) y también por un grupo variado de factores tales como inundación, heladas, heridas, polinización de flores, senescencia, fitohormonas como auxinas (IAA), giberelinas (GA) y 1-metilciclopropeno (1-MCP). Los cambios en la expresión génica ACCO son críticos en el control de la maduración de los frutos y la resistencia a la senescencia causada por el etileno. Estos cambios podrían ser controlados por el ajuste del gen ACCO1, usando técnicas anti-sentido o ARNi (interferencia del ARN) o post-cosecha tales como 1-MCP y CO₂ como inhibidores de la acción del etileno (Zohreh *et al.*, 2012).

La aplicación de etileno exógeno al tomate es suficiente para inducir el proceso de maduración como se aprecia en el nivel de expresión de los genes en las figuras 24 y 25. Aunque el efecto de este gas en el estado quebrando no obtuvo el mismo efecto. Se ha demostrado que varios mRNAs relacionados con la maduración se acumulan, ya sea directa o indirectamente, en respuesta al etileno (Naja *et al.*, 2016). Por el contrario, la aplicación de inhibidores químicos de la síntesis o percepción del etileno inhibe la maduración normal del fruto (Griffith *et al.*, 1999). La síntesis de etileno y el proceso maduración también se ha inhibido en plantas de tomate transgénicas que contienen un gen en anti-sentido ACC sintasa o ACCO (Giovannoni, 2001). Tal es el caso del silenciamiento realizado en trabajos anteriores a este (silenciamiento del

gen TomloxB), que en los resultados obtenidos que demuestran la relación existente entre la enzima LOX y ACCO.

La inhibición de ACCO en el trabajo realizado por Grierson y Rupert (1994), mediante ARN en anti-sentido manifestó efectos pleiotrópicos en la maduración, particularmente cuando los frutos se separaron en la etapa verde madura. Dichos frutos mostraron un menor ablandamiento y cambio de coloración inadecuado (amarillo), pero se desvaneció para desarrollar un color rojo completo. La tasa de sobremaduración y deterioro de la fruta también se redujo en estos tomates, y esto fue particularmente notable cuando los frutos fueron cortados en los estadios estudiados.

Como se observa en las figuras anteriores (23, 24 y 25) los niveles de expresión de los frutos durante su desarrollo (rayado y rosa) aumentaron al administrarse etileno exógeno, a excepción del estadio quebrando, en la cual las actividades de lipoxigenasas y ACC oxidasa concuerdan con los niveles de expresión encontrados.

CONCLUSIONES

- El silenciamiento en anti-sentido del gen *TomloxB* disminuyó la producción de etileno en los tres estadios de maduración, haciéndose más notorio en el estado quebrado, y con ello aumentó la vida de anaquel del fruto.
- El silenciamiento en anti-sentido del gen *TomloxB* afecta la expresión y actividad de ACC oxidasa.
- Existe una relación entre ACC oxidasa y LOX, en la cual una disminución de la actividad de LOX reduce ACC oxidasa.
- El etileno es regulador de LOX, ACC oxidasa en los estadios torneado y rosa, en el estado quebrado no son regulados.
- En los primeros estados de maduración el etileno exógeno no afectó la expresión y actividad de LOX y ACCO.
- El nivel de expresión del gen silenciado sufrió una reducción en todos los estadios, sin administración de etileno exógeno.
- En el estado rosado el nivel de expresión y actividad de ambas enzimas, ACCO y LOX están reguladas por etileno.

BIBLIOGRAFÍA

- Agar I., Biasi, W. y Mitcham, E. 1999. Exogenous ethylene accelerates ripening responses in Bartlett pears regardless of maturity or growing region. *Postharvest Biology and Technology* 17: 67-78.
- Alexander, L. y Grierson, D. 2002. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *Journal of Experimental Botany* 53(377): 2039-2055
- Almeida, J., Asís, R., Molineri, V. N., Sestari, I., Silvestre, B., Carrari F., Pereira P. L. y Rossi M. 2014. Fruits from ripening impaired, chlorophyll degraded and jasmonate insensitive tomato mutants have altered tocopherol content and composition. *Phytochemistry* 13: 114-119
- Alvarez-Hernandez, J. C., Cortez-Madrigal, H., Garcia-Ruiz, I., Ceja Torres, L. F., Perez-Dominguez, J. F. y Montanez-Soto J. L. 2009. Injerto de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en germoplasma silvestre como fuente de resistencia a plagas y enfermedades. Tesis de Maestria. Instituto Politecnico Nacional.
- Angarita-Díaz, M. P., Moreno-Ferrero, V. y Pineda-Chaza, P. J. 2012. Generación de líneas T-DNA de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. P73 e identificación de mutantes e inserción. Universidad Politécnica de Valencia.
- Arad, S. y Mizrahi, Y. 1983. Stress induced ripening of the non ripening tomato mutant *nor*. *Physiologia Plantarum* 59(2):213-217.
- Arias, C. y Toledo, J. 2007. Manual de manejo postcosecha de frutas tropicales. Obtenido de : <http://www.fao.org/inpho/content/documents/vlibrary/ac304s/ac304s00.html>
- Argerich, C. y Gaviola, J. 2008. Manual de producción de semillas hortícolas. Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza.
- Badwin, E. 2004. Ethylene and postharvest commodities. *HortScience* 39(7):1538-1540.

- Balaguera, H. E., Salamanca, F. A., García, J. y Arévalo A. 2014. Ethylene and maturation retardants in the postharvest of perishable horticultural products. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas* 8 (2): 302-313.
- Barrero-Farfán, I. V. y Chaparro-Giraldo, A. 2008. Expresión de GUS en explantes de *Solanum phureja* (Juz. et. Buk) Var. Criolla Colombia, Transformados con *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Biológica Colombiana* (13(1):119-130.
- Baysal, T. y Demirdöven, A. 2006. Lipoxygenase in fruits and vegetables: A review. *Enzyme and Microbial Technology* 40(4):491-496.
- Blankenship, S. M. y Sisler, E. 1991. Comparison of ethylene gassing methods for tomatoes. *Postharvest Biology and Technology* 1: 59-65.
- Beaudin, N. y Rothstein, S. J. 1997. Developmental regulation of two lipoxygenase promoters in transgenic tobacco and tomato. *Plant Molecular Biology* 33:835-846.
- Bidonde, S., Ferrer, M. A., Zegzouti, H., Ramassamy, S., Latché, A., Pech, J. C., Hamilton, A. J., Grierson, D. y Bouzayen, M. 1998. Expression and characterization of three tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase cDNAs in yeast. *European Journal of Biochemistry* 250:20-26.
- Bleecker, A. B. y Kende, H. 2000. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annual Reviews in Cell Developmental Biology* 16:1-18
- Blokhina, O., Chirkova, T. y Fagerstedt, K. 2001. Anoxic stress leads to hydrogen peroxide formation in plant cells. *Journal of Experimental Botany* 52(359): 1179-1190.
- Bolitho, K., Lay, M., Knighton M. y Ross, G. 1996. Antisense apple ACC-oxidase RNA reduces ethylene production in transgenic tomato fruit. *Plant Science* 122(9):91-99
- Boller, T., Herner, R. C. y Kende, H. 1979. Assay for and enzymatic formation of an ethylene precursor, 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid. *Planta* 145: 293-303

- Bousquett, J. y Thimann, K. 1983. Lipid peroxidation forms ethylene from 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid and may operate in leaf senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81:1724-1727.
- Bouzayen, M., Latché, A., Nath, P. y Pech, J. C. 2010. Mechanism of Fruit Ripening -Chapter 16. In: *Plant Developmental Biology-Biotechnological Perspectives* vol. 1. Springer. ISBN 978-3-642-02300-2.
- Bufler, G. 1984. Ethylene Enhanced 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase activity in ripening apples. *Plant Physiology* 75: 192-195.
- Buranasompob, A., Tang, J., Powers, J., Reyes, J., Clark, S. y Swanson, B. 2007. Lipoxygenase activity in walnuts and almonds. *Food Science and Technology* 40: 893- 899.
- Casas, S., Rodriguez, J. F., Sanchez, J. L., Ron, G., Montes, H. y Chuela, B. 2003. Características agronomicas en retrocruzamiento en maíz-tocintle. *Revista Fitotecnia Mexicana* 26 (4):239-248.
- Cervantes, E. 2002. Ethylene: new interactions, still ripening. *Plant Science* 7(8): 334-335.
- Chaikham, P.; Phuncbaisri, C. y Srisajjalertwaja, S. 2016. Lipoxygenase activity and browning formation of lychee in syrup after high pressure and canning processes. *International Food Research Journal* 23(4): 1418- 1423.
- Chávez, M., Valadez, E., Carrillo, G. y Lozoya, E. 2002. Expresión transitoria del gen de la β -glucuronidasa y efecto del bombardeo en tejido de crisantemo (*Dendrothea grandiflorum*). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 8(1): 107-121.
- Chen, G., Hackett, R., Walker, D., Taylor, A., Lin, Z. y Grierson D. 2004. Identification of a specific isoform of tomato lipoxygenase (Tomlox C) involved in the generation of fatty acid derived flavor compounds. *Plant Physiology* 136: 2641-2651.
- Chen Y., Etheridge, N., y Schaller, E. 2005. Ethylene signal transduction. *Annals of Botany* 95: 901-915.

- Corpa, E. J., y Tapasco, O. A. 2014. Hallazgos de la biosíntesis del etileno en frutas climatéricas y de los factores que afectan la ruta metabólica. *Revista de Alimentos Hoy* 22(31): 43-63.
- Deikman, J. 1997. Molecular mechanisms of ethylene regulation of gene transcription. *Physiological Plantarum* 100: 561- 566.
- Ealing, P. 1994. Lipoxygenase activity in ripening tomato fruit pericarp tissue. *Phytochemistry* 34 (3) :547-552
- Escalona, C., Alvarado, V., Monardes, M., Urbina, H. y Martin, B. 2009. Chile, Manual de cultivo de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.). [Http://www.cepoc.uchile.cl/pdf/manua_cultivo_tomate.pdf](http://www.cepoc.uchile.cl/pdf/manua_cultivo_tomate.pdf). Consultado el 09 de septiembre de 2015.
- Ferrie, B. I., Beaudoin, N., Burkhart, W., Bowhser, C. y Rothstein, S. 1994. The cloning of two tomato lipoxygenase genes and their differential expression during fruit ripening. *Plant Physiology* 106: 109-1 18
- Feussner, I. y Wasternack, C. (2002). Lipoxygenase pathway. *Annual Reviews in Plant Biology* 53: 275-297.
- Fonseca, S., Oliveira, F. A. y Brecht, J. 2002. Modeling respiration rate of fresh fruits and vegetables for modified atmosphere packages: a review. *Journal of food Engineering* 52: 99-119.
- Foolad, M. R. 2007. Genome Mapping and Molecular Breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics* 7: 1-52.
- Foolad, M. R., Chen, F. Q. y Lin, G. Y. 1998. RFLP mapping of QTLs conferring cold tolerance during seed germination in an interspecific cross of tomato. *Molecular Breeding* 4(6): 519-529.
- Fujisawa, M., Nakano, T. e Ito, Y. 2011. Identification of potential target genes for the tomato fruit-ripening regulator RIN by chromatin immunoprecipitation. *Plant Biology* 11(26): 1- 14.
- Gardner, H. 1991. Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants. *Biochimica Biophysica Acta* 1084(3): 221-239.

- Giovannoni, J. J. 2001. Molecular biology of fruit: Maturation and ripening. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 725-749.
- Giovannoni, J. J. 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell* 16: 170-180.
- Gökmen, V., Bahceci, S. y Acar, J. 2002. Characterization of crude lipoxygenase extract from green pea using a modified spectrophotometric method. *European Food Research Technology* 215: 42-45.
- Grierson, D. y Rupert, F. 1994. Control of ripening in transgenic tomato. *Euphytica* 79: 251-263.
- Griffiths, A., Barry, C., Alpuche-Solis A. G. y Grierson, D. 1999. Ethylene and developmental signals regulate expression of lipoxygenase genes during tomato fruit ripening. *Journal of Experimental Botany* 50(335): 793–798.
- Hadfield, K. A., y Bennett, A. B. 1998. Polygalacturonases: Many genes in search of a function. *Plant Physiology* 117: 337- 343.
- Hans, P., Otma, E. y Peppelenbos, W. 2003. Carbon dioxide action on ethylene biosynthesis of preclimacteric and climacteric pear fruit. *Journal of Experimental Botany* 54(387): 1537- 1544.
- Hernandez–Leal, E., García-Zavala, J. J. y Reyes-López, D. 2012. Derivacion de lineas de generaciones tempranas de híbridos de tomate (*Solanum lycoperscum* L.). Tesis de Maestría. Colegio de postgraduados. Campus Montecillo.
- Jordan, M. y Casaretto J. 2006. Hormonas y reguladores del crecimiento: Etileno, ácido absicico, brasinoesteroides, poliaminas, ácido salicílico y ácido jasmónico. *Fisiología Vegetal* (F.A. Squeo & L. Cardemil, eds.) Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile.
- Kader, A. 1992. *Biología y tecnología de Postcosecha: Una revisión general*. *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. UC:3311.
- Kasai, Y., Hydo, H., Ikoma Y. y Yano, M. 1998. Characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylare (ACC) oxidase in broccoli florets and from

- Escherichia coli* cells transformed with cDNA of broccoli ACC oxidase. Botanic Bulletin Academia Sinica 39: 225-230.
- Klee, H. 2002. Control of ethylene-mediated processes in tomato at the level receptor. Journal of Experimental Botany 53(277): 2057-2063.
 - León García, E. 2017. Efecto del silenciamiento del gen *TomloxB* sobre la calidad poscosecha de frutos de tomate (*Solanum lycopersicum*) var. TA234. Tesis doctoral. Instituto Tecnológico de Veracruz.
 - Lincoln, J. y Fischer, R. 1988. Regulation of Gene Expression by ethylene in wild type and rin Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Fruit. Plant Physiology 88: 370- 374.
 - McGarry, R., Ozga, J. A. y Reinecke, D. 2005. The effects of ethephon on Saskatoon (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) fruit ripening. Journal of the American Society of Horticultural Science 130(1):12- 17.
 - Medina, L. 2015. Functional characterization of strawberry (*Fragaria ananassa*) ripening- related genes identified throughout a custom-made oligo-bases microarray platform. Tesis doctoral departamento de Bioquímica y biología molecular. Universidad de Córdoba.
 - Meneses, O., Marcela, S., Valenzuela, C., y Regulo, J. 2008. La atmósfera modificada: una alternativa para la conservación de los alimentos. Revista Lasallista de Investigación 5(2): 112- 123.
 - Montalvo, E., Garcia, H. S., Tovar, B. y Mata, M. A 2007. Application of exogenous ethylene on postharvest ripening of refrigerated "Ataulfo" mangoes. Food Science and Technology 40: 1466-1472.
 - Naja, M., Zainon, M. A., Maizom, H. y Zamri, Z. 2016. Changes in the physical quality parameters of the lowland transgenic tomato fruit during ripening. International Journal of ChemTech Research 9(3): 571-526.
 - Ocampo, C. A., Moerschebacher, B. y Grambow H. J. 1986. Increased Lipoxygenase activity is involved in the hypersensitive response of wheat leaf cells infected with a virulent rust fungi or treated with fungi elicitor. Zeitschrift für Naturforschung C 41: 559-563.

- Palou, L., Crisosto, C., Garner, D. y Basinal, L. 2003. Effect of continuous exposure to exogenous ethylene during cold storage on postharvest decay development and quality attributes of stone fruits and table grapes. *Postharvest Biology and Technology* 27 (2): 243- 254.
- Pérez, J., Hurtado, G., Aparicio, V., Argueta, Q. y Larin, M. A. 2001. Guía técnica: Cultivo de tomate. El salvador. CENTA.
- Porta, H. y Rocha, M. 2002. Plant lipoxygenase: Physiological and molecular features. *American Society of Plant Physiologist* 130 (9): 15-21.
- Ribas, M., Flórez, I. y González, M. A. 2013. Respiración de las plantas. *Fisiología Vegetal* 14: 265-268.
- Riley, J., Willemot, C. y Thompson, J. 1996. Lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities in ripening tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology* 7(2) :97-107
- Rodríguez, M. y Rodríguez, W. 2006. Métodos físico-químicos en biotecnología. IBT-UNAM.
- SAGARPA. 2015. Monografía de cultivo. Jitomate. Subsecretaría de Fomento a los Agronegocios.
- SAGARPA. 2016. Monografía de cultivo. Jitomate. Subsecretaría de Fomento a los Agronegocios.
- Saltveit, M. 1999. Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables. *Post-harvest Biology and Technology* 15: 279-292.
- Sanda, V. y Jisaka, M. 2013. Lipoxygenase and carotenoids: A co-oxidation story. *African Journal of Biotechnology* 12 (20): 2786- 2791.
- Sanz, L., Pérez, A., y Olías, J. 1992a. La lipoxigenasa en el reino vegetal I. Propiedades. *Grasas y Aceites* 43(4): 231-239.
- Sanz, L., Pérez, A., Olías, J. y 1992b. La lipoxigenasa en el reino vegetal II. Funciones fisiológicas asignadas. *Grasas y Aceites* 43(5): 287-290.
- Sarita-Valdez, V. 1993. Cultivo de tomate de mesa. Fundación de desarrollo agropecuario, INC. Santo Domingo, República Dominicana

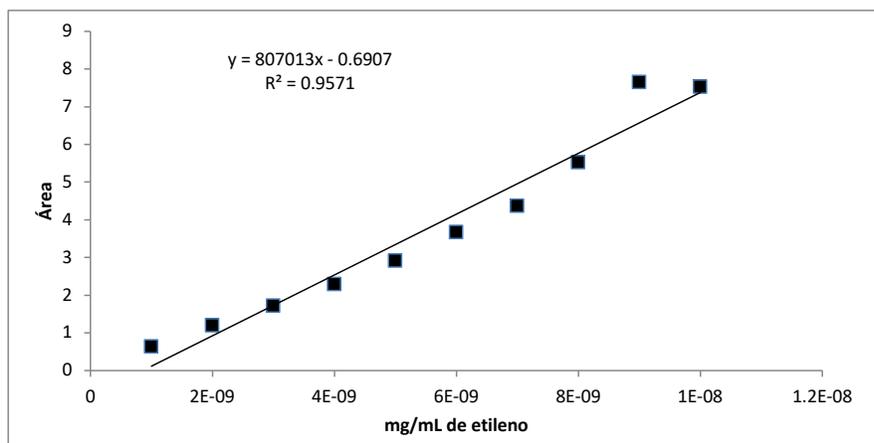
- Soares, A. y Mello, P. 2006. Ethylene and fruit ripening: From illumination gas to the control of gene expression, more than a century of discoveries. *Genetics and Molecular Biology* 29 (3): 508- 515
- Sofo, A., Dichio, B., Xiloyannis, C. y Masai, A. 2004. Lipoxygenase activity and proline accumulation in leaves and roots of olive trees in response to drought stress. *Physiologia Plantarum* 121: 58-65.
- Stanley, P. y Burg, E. 1961. Role of ethylene in fruit ripening. Public Health Service. No. RG-8124: 179- 189.
- Stearns, J. C. y Glick, B. R. 2003. Transgenic plant with altered ethylene biosynthesis or perception. *Biotechnology Advances* 21: 193-210.
- Stevens, M. 1973. The influence of multiple quality requirements on the plant breeding. *HortScience* 8: 110-112
- Tian, C., Jiang, Q., Wang, F., Wang, G-L, Xu, Z. S. y Xiong, A-S. 2015. Selection of Suitable Reference Genes for qPCR Normalization under Abiotic Stresses and Hormone Stimuli in Carrot Leaves. *PLoS ONE* 10(2): e0117569. doi:10.1371/journal.pone.0117569.
- Todd, J., Paliyath, G. y Thompson, J. 1990. Characteristics of Membrane Associated lipoxygenase in tomato fruit. *Plant Physiology* 94: 1225-1232.
- Vela Gutierrez, G. 2003. Maduración acelerada de papaya Maradol (*Carica papaya* L) en atmosferas modificadas con etileno. Tesis de Maestría, Veracruz, México.
- Vela Gutierrez, G. 2015. Transformación de embriones de papaya Maradol (*Carica papaya* L.) con el gen 9/13 de la lipoxigenasa. Tesis de Doctorado, Veracruz, México.
- Vijay, P. y Rakesh, P. 2011. Role of internal atmosphere on fruit ripening and storability- a review. *Journal of Food Science Technology* 3(7): S/pp.
- Viera, A., Oliveira, M., Jose, I. Piovesan, N., Tavares, S., Moreira, M. y Barros, E. 2000. Biochemical evaluation of lipoxygenase pathway of soybean plants submitted to wounding. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 13(1): 5-12.

- Wang, K., Li, H. y Ecker, J. 2002. Ethylene Biosynthesis and signaling networks. *The Plant Cell* 14: S131-S151.
- Wann, E. V. 1997. Tomato germplasm lines T4065, T4099, T5019 and T5020 whit unique genotypes that enhance fruit quality. *HortScience* 32(4): 747-748.
- Xu, J. y Zhang, S. 2014. Regulation of ethylene biosynthesis and signaling by protein kinases and phosphatases. *Molecular Plant* 7: 939-942.
- Xue, Z., Kou, X., Luo, Y., Zhu, B. y Xu, W. 2009. Effect of Ethylene on Polygalacturonase, Lipoxygenase and Expansin in Ripening of Tomato Fruits. *Transactions of Tianjing University* (15): 173- 177.
- Yokotani, N., Nakano, R., Imanashi, S., Nagata, M., Inaba, A. y Kubo, Y. 2009. Ripening-associated ethylene biosynthesis in tomato fruit is autocatalytically and developmentally regulated. *Journal of Experimental Botany* 12(60): 3433-3442.
- Zhang, Y.; Chen, L.; Wu, Z.; Sun, C. 2011. Kinetic parameters of soil b-glucosidase response to environmental temperature and moisture regimes. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo* 35: 1285-1291.
- Zhang, B., Yin, X., Li, X., Yang, S., Ferguson, I. y Chen, K. 2009. Lipoxygenase gene expression in ripening kiwifruit in relation to ethylene and aroma production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 2875-2881.
- Zohreh, J., Raheem, H., Ramin, H. y Ghasemali, G. 2012. Cloning, identification and expression analysis of ACC oxidase gene involved in ethylene production pathway. *Molecular Biology* 4(2): 134- 150.

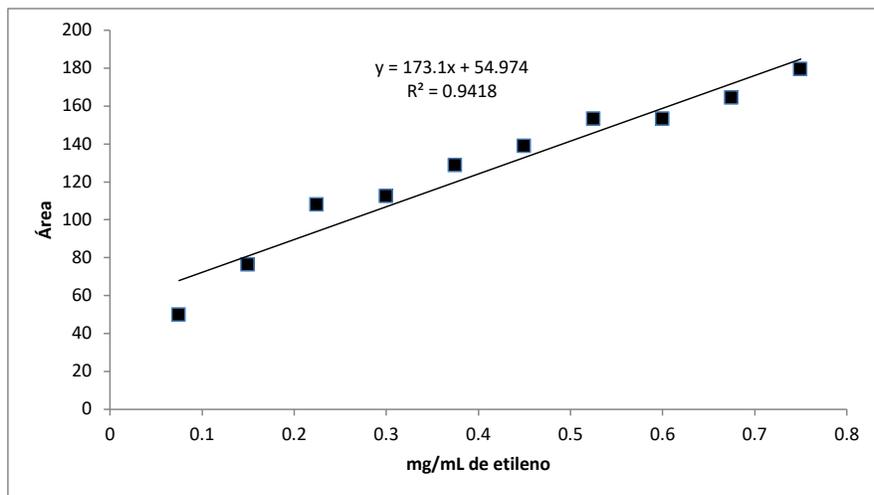
ANEXOS

I. CURVA ESTANDAR ETILENO

Dilución 1:100

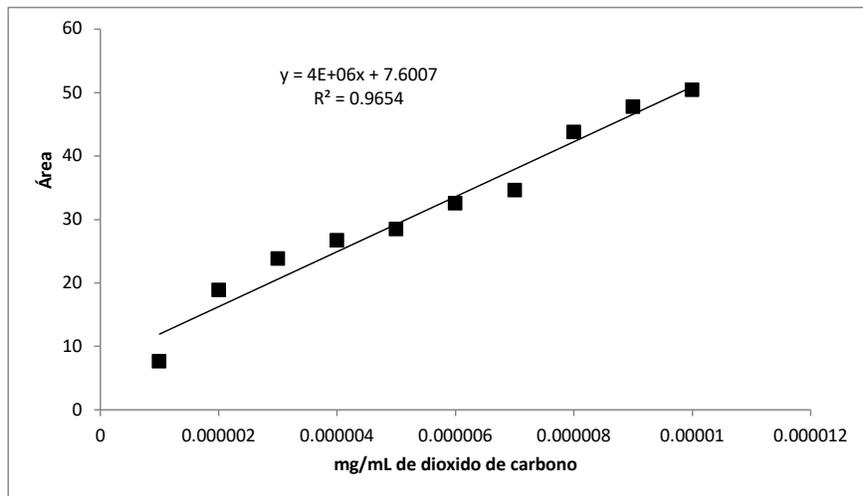


Directo de burbuja

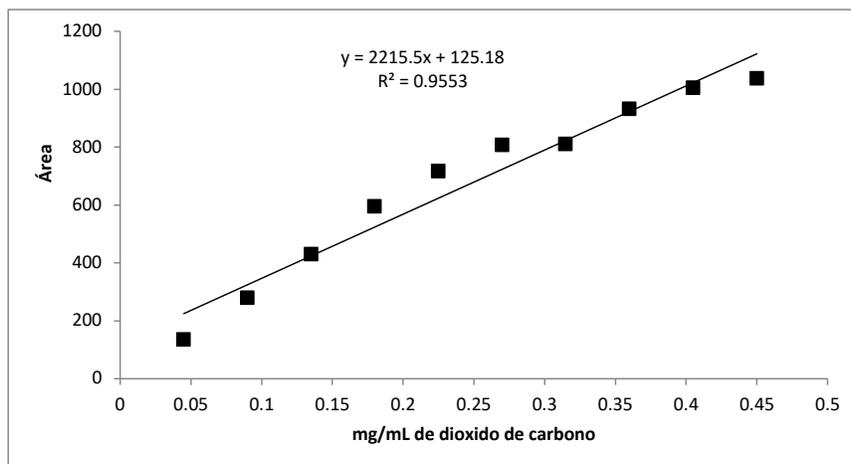


II. CURVA ESTANDAR BIOXIDO DE CARBONO

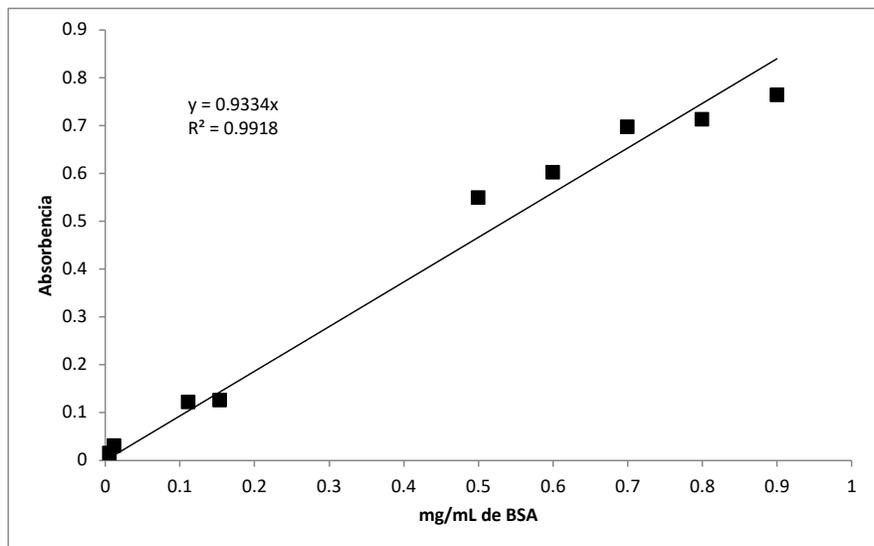
Dilución 1:100



Directo de burbuja



III. CURVA ESTANDAR DE PROTEINA POR EL METODO DE BRADFORD



IV. Transcripción reversa de mRNA

El RNA total extraído y purificado se cuantifica y se concentra a 150 ng/ μ L.

La transcripción reversa se lleva a cabo empleando la siguiente mezcla, para un volumen de 20 μ L de reacción por muestra:

Agua destilada 7 μ L

Buffer 5X primera cadena 4 μ L

DTT (0.1 M) 2 μ L

dNTPs (250 μ M) 2 μ L

Oligo anclado 2 μ L

RNA (150 ng/ μ l) 2 μ L

Volumen total de reacción 19 μ L

La muestra de RNA fue incubada a 65°C por 5 min antes de ser mezclada con los demás reactivos. Luego de incorporar el RNA a cada mezcla de reacción, los tubos fueron incubados a 65°C por 5 min y a 37°C por 10 min.

V. Extracción de RNA

V.1 Método del Trizol

El protocolo seguido ha sido descrito por el fabricante:

Homogenizar 50 -100 mg de tejido en un mortero con N₂ líquido

Transferir el material a un tubo de microcentrifuga. Añadir 1 mL de Trizol y mezclar por inversión, incubar 5 minutos a temperatura ambiente.

Añadir 0.2 V de cloroformo, mezclar por inversión e incubar 2-3 minutos a temperatura ambiente.

Centrifugar a 12000 x g durante 15 minutos a 4°C. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo.

Precipitar el RNA con 0.5 ml de isopropanol e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.

Centrifugar 12000 x g 10 minutos a 4°C y eliminar el sobrenadante.

Lavar el pellet con 1ml de EtOH 70%, agitar y centrifugar a 7500 x g 5 minutos a 4°C

Eliminar el sobrenadante y dejar secar el pellet.

Resuspender en agua libre de RNasas e incubar 10 min a 60°C

VI. Tratamiento del RNA con DNAsa

Este tratamiento nos permitirá degradar el DNA genómico contaminante que no se ha podido eliminar completamente durante el proceso de extracción del RNA, que podría interferir en análisis posteriores.

Añadir en un tubo de microcentrifuga los siguientes reactivos:

| | |
|----------------------|------------------------|
| RNA total | 50 µg |
| Tampón DNAsas | 10 µL |
| RNA guard | 2 µL |
| DNAsa RNAsa-free | 3 µL |
| Agua libre de RNAsas | Completar hasta 100 µL |

Incubar 30 minutos a 37 °C

Añadir 100 µl de agua libre de RNAsas y añadir 1 V de fenol/cloroformo/alcohol isoamilico (25:24:1) y mezclar por inversión

Centrifugar 5 minutos a 13000 rpm a 4°C y recuperar la fase acuosa

Añadir 1 V Cloroformo/alcohol isoamilico (24:1), mezclar por inversión y centrifugar 5 minutos a 13000 rpm a 4°C.

Recuperar la fase acuosa y precipitar el RNA con 0.1 V NaAc 3M y 2.5V EtOH 100%, incubar 1 hora a -80°C.

Centrifugar 20 minutos a 13000 rpm y eliminar el sobrenadante

Lavar el pellet con 200 µL EtOH 70% y centrifugar 5 minutos a 13000 rpm.

Secar el pellet y resuspender en el volumen necesario de agua libre de RNAsas para tener una concentración final de 1 µg/µL

Tampón DNAsas 10X: Tris-HCl 0.4M (pH 7.5), MgCl₂ 60 mM, RNA guard RNase inhibitor Porcine (24.8 U/µL) (Amersham Biosciencie), DNAsa I RNase-free (10 U/µl)(Roche).

VII. Electroforesis de RNA en geles de formaldehido/agarosa

Debido a la facilidad de degradación de RNA es conveniente realizar la electroforesis en gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes. De forma general se ha utilizado formaldehido.

Se funde la agarosa en tampón MEN 1X y se atempera antes de añadir el formaldehido a una concentración final de 6.5%. Se añade tampón de carga a las muestras de RNA y se desnaturalizan 5 minutos a 65°C antes de cargar el gel. La electroforesis se realiza en tampón MEN 1X y a 40-90 voltios durante el tiempo que sea necesario.

MEN 10X: MOPS 0.2 M (pH 7), NaAC 50 mM, EDTA 10 mM (pH 8). Ajustar a pH 7 y autoclavar. Almacenar a 4°C.

Tampón de carga 10X: MEN 1X, formaldehido 6.5%, formamida 50%, azul de bromofenol 0.6X.

VIII. RT-PCR semicuantitativa.

Esta técnica se realizó por el Kit Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen).

Mezclar

RNA 50 ng- µg

Oligo- dt (10 µM) 2 µl

Agua Hasta un volumen de 14 µl

Desnaturalizar el RNA 5 minutos a 65°C y transferir inmediatamente a hielo.

Seguidamente añadir

Tampón RT 10X 2 µl

dNTPs 5 mM c/u 2 µl

RNAguardTM (26.8 U/ µl) 1 µl

Omniscript-RT (4U/ µl) 1 µl

Mezclar e incubar durante 1 hora a 37 °C.

Añadir 20 µl de agua y guardar a -80°C.

Obtención de la primera cadena de cDNA:

PCR sobre el cDNA:

| | |
|-------------------|---------------------------------|
| cDNA | 100-250 ng |
| Tampón de PCR | 1X |
| dNTPs | 100 µM |
| MgCl ₂ | 1-5 µM |
| Oligonucleótido A | 25 pmol |
| Oligonucleótido B | 25 pmol |
| Taq polimerasa | 2.5 U |
| Agua | Hasta un volumen final de 50 µl |

Los parámetros utilizados han sido:

| Temperatura (°C) | Tiempo | Ciclos |
|------------------|--------|--------|
| 94 | 5 min | 1 |
| 94 | 30 s | 30 |
| Y | 30 s | |
| 72 | Z s | |
| 72 | 10 min | 1 |

XIX. Preparación de Reactivo SYBR GreenER Supermix

Tabla 2. Volúmenes de cada componente de la reacción de Real-Time PCR.

| Componente | Concentración inicial | Volumen | Concentración en reacción |
|----------------------------|-----------------------|---------|---------------------------|
| SYBR GreenER qPCR Supermix | 2X | 12.5 uL | 1X |
| Primer directo | 10 mM | 0.5 uL | |
| Primer reverso | 10mM | 0.5uL | 20nM, 200nM |
| Agua desionizada | - | 10.5 uL | 20nm, 200nM |