



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**EVALUACIÓN FISIOLÓGICA Y MOLECULAR DE FRUTOS DE
TOMATE QUE SOBRE-EXPRESAN UNA ISOENZIMA DE
RAMNOGALACTURONANO LIASA (*Solyc11g011300*)
DURANTE POST-COSECHA**

Por:

M en C Eduardo Antonio Trillo Hernández

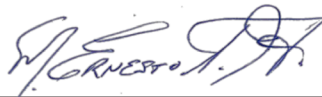
TESIS APROBADA POR LA
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA EN ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designados para la revisión de la tesis de Eduardo Antonio Trillo Hernández, le han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.



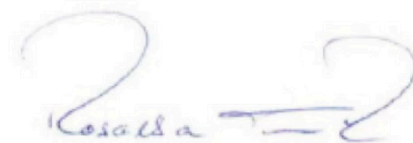
Dr. Martín Ernesto Tiznado Hernández
Director de tesis



Dra. Marisela Rivera Domínguez
Integrante del comité de tesis



Dr. Alexel Jesús Burgara Estrella
Integrante del comité de tesis



Dra. Rosalba Troncoso Rojas
Integrante del comité de tesis



Dr. Miguel Ángel Hernández Oñate
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Evaluación Fisiológica y Molecular de Frutos que Sobre-expresan una Isoenzima de Ramnogalacturonano Liasa (*Solyc11g011300*) Durante Post-cosecha” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Eduardo Antonio Trillo Hernández, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos


Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Agradecimiento para CONACYT por el apoyo prestado durante el posgrado.

Agradecimiento para el CIAD y a todo su personal.

Agradecimiento para el proyecto “Elucidación Fisiológica de la enzima ramnogalacturonano liasa”, además del proyecto “Efecto molecular del bioestimulante Nutrisorb-L”.

Agradecimiento a todo mi comité, en especial al doctor Miguel Hernández el cual fue un excelente mentor y con sus preguntas llevó el trabajo al siguiente nivel y Martín Tiznado por su apoyo durante todo el doctorado.

Agradecimiento al M en C Ángel Javier Ojeda Contreras por su apoyo a lo largo de este proyecto

DEDICATORIA

A mi madre Monica del Carmen Hernández Contreras, mi hermana
Monica Maryhan Trillo Hernández y mi abuela Lucila Villanueva
Quevedo

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
1.INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES	14
2.1 El Fenómeno de la Maduración Ocasiona el Ablandamiento en Frutos	14
2.2 La Pared Celular Durante la Maduración	15
2.2.1 Un Ejemplo de Familia de Genes: La Familia de PME Participa en Varios Fenómenos.....	17
2.3 Estudios Realizados en Polímeros de Pared Celular Durante la Post-cosecha.....	19
2.4 La Cutícula Vegetal	20
2.5 La Hormona Etileno Induce la Maduración en los Frutos de Tomate.....	22
2.5.1 Regulación de Etileno	23
2.5.2 Receptores de Etileno en Tomate	25
2.6 El Comportamiento de la Cutícula y la Pared Celular en Mutantes de Maduración.....	26
2.7 Degradación Coordinada del Polímero Ramnogalacturonano tipo I en la Pared Celular Primaria en Frutos.	28
3. HIPÓTESIS	32
4. OBJETIVOS	33
4.1. Objetivo General.....	33
4.2. Objetivos Específicos	33
5. MATERIALES Y MÉTODOS	34
5.1. Material Vegetal	34
5.2. Cuantificación de Etileno y Tasa de Respiración Mediante Producción de CO ₂	34
5.3. Análisis Físicoquímicos y Manejo de los Datos.....	35
5.4. Firmeza	36
5.5. Genes Analizados por RT-qPCR.....	36
5.6. Análisis de Promotor en Genes de Cutícula	36
5.7. Extracción de ARN, Síntesis de ADN Complementario y Expresión Génica	37
5.8. Vida Post-cosecha y Pérdida de Peso	37
5.9. Diseño de experimentos y Análisis Estadístico de los datos	37
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
6.1. Efecto de la sobre-expresión en la respuesta fisiológica y calidad físico-química	39

CONTENIDO (Contenido)

6.2. Post-cosecha en los Frutos Transgénicos: Cuantificación de Producción de Etileno y la Tasa de Respiración.....	42
7.3 Análisis de Expresión Génica en Frutos Transgénicos	45
7.4 Clusterización de Patrones de Expresión Génica	54
7.5 Análisis de Promotores de Genes de Cutícula.....	57
8. CONCLUSIONES	61
9. PERSPECTIVAS	62
10. REFERENCIAS	63

LISTADO DE FIGURAS

Figura		Página
1	Pericarpio de tomate en 3 etapas de madurez.....	14
2	Ontogenia del fruto de tomate dividido en fases de desarrollo hasta la madurez.....	16
3	Esquema: polímeros de pectina y las enzimas que actúan sobre su estructura.....	21
4	Expresión <i>in silico</i> isoenzimas que degradan al RG-1	29
5	Resumen gráfico.....	31
6	Diagrama de toma de muestra para el análisis de la expresión de genes....	35
7	Pérdida de peso fresco diaria durante 14 días de almacenamiento.....	40
8	Evaluaciones fisicoquímicas durante la madurez.	41
9	Cambios de color durante el desarrollo y maduración de frutos de tomate ...	42
10	Velocidad de respiración y producción de etileno.....	43
11	Cambios en firmeza durante el desarrollo	44
12	Gráficos de expresión génica en el tiempo 39 DDA.....	47
13	Gráficos de expresión génica en el tiempo 42 DDA.....	48
14	Gráficos de expresión génica en el tiempo 49 DDA.....	49
15	Gráficos de expresión génica en el tiempo 56 DDA.....	50
16	Expresión <i>in silico</i> de genes involucrados en biosíntesis y respuesta de etileno.....	54
17	Dendograma de expresión génica en C+.....	55
18	Dendograma de expresión génica en H2.....	56
19	Dendograma de expresión génica en L1.....	57

LISTADO DE CUADROS

Cuadros		Página
1	Mutantes espontaneos de madurez.....	27
2	Elementos reguladores encontrados en promotores de genes de cutícula.....	59

RESUMEN

La pared celular es una estructura localizada fuera de la membrana plasmática, se encuentra compuesta por regiones que difieren en su estructura, y en los frutos comparte funciones con la cutícula vegetal. Ambas estructuras coordinan la respuesta frente al ataque de patógenos, el intercambio de moléculas pequeñas como el agua y en frutos proveen soporte mecánico. La pared celular contiene una región de polímeros denominada pectina que se compone de homogalacturonano, ramnogalacturonano tipo 1 y 2, esta región es asociada a procesos como la adhesión celular y en frutos está asociada a la firmeza. Una de las enzimas que degradan al ramnogalacturonano 1 es la enzima ramnogalacturonano liasa, la cual es codificada por 12 genes con expresión espacio temporal diferente. En un trabajo anterior, los frutos de tomate con el gen *35s::Solyc11g011300* presentaron una mayor vida de anaquel en comparación con la línea isogénica, lo que demostró la función de este gen en la vida post-cosecha de los frutos. Basado en esto, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la sobre-expresión en el proceso de maduración de los frutos. Para ello, se decidió analizar los frutos *35s::Solyc11g011300* durante la post-cosecha. Se analizaron los frutos de líneas independientes (L y H) que sobreexpresan una isoenzima RGL (*Solyc11g011300*) durante la maduración y post-cosecha. Se encontró que los frutos transgénicos mantenían la firmeza mas tiempo que el control, mayor producción de etileno, aparición del climaterio dos días después que la línea isogénica y no se encontraron cambios en la acumulación de sólidos solubles y pH. Por otro lado, una de las alteraciones más interesantes sucedió a nivel transcripcional sobre los genes de la ruta de síntesis de la hormona etileno fue la represión de S-adenosin metionina (SAM) en la línea transgénica L1 y la represión de ACS-sintasa (ACS) 2 y 4 durante los 42 DDA. Con estas evidencias se concluye que la sobre-expresión del gen *Solyc11g011300* afectó la maduración del fruto mediante la desregulación de los genes SAM, ACS4 y ACS2, efecto que podría deberse al proceso de co-supresión.

Palabras clave: biosíntesis de etileno, maduración, sobre-expresión, *Solyc11g011300*

ABSTRACT

The cell wall is a structure located outside the plasma membrane, it is composed of regions that differ in their structure, and in fruits it shares functions with the plant cuticle. Both structures coordinate the response against pathogen attack, the exchange of small molecules such as water, and in fruits they provide mechanical support. The cell wall contains a region of polymers called pectin that is composed of homogalacturonan, rhamnogalacturonan type 1 and 2, this region is associated with processes such as cell adhesion and in fruits it is associated with firmness. One of the enzymes that degrade rhamnogalacturonan 1 is the enzyme rhamnogalacturonan lyase, which is encoded by 12 genes with different space-time expression. In a previous work, tomato fruits with the *35s::Solyc11g011300* gene had a longer shelf life compared to the isogenic line, which demonstrated the role of this gene in the post-harvest life of the fruits. Based on this, the objective of this work was to determine the effect of over-expression on the fruit ripening process. For this, it was decided to analyze the *35s::Solyc11g011300* fruits during the post-harvest period. The fruits of independent lines (L and H) that overexpress an RGL isoenzyme (*Solyc11g011300*) were analyzed during ripening and post-harvest. It was found that the transgenic fruits maintained firmness longer than the control, higher ethylene production, climacteric appearance two days after the isogenic line, and no changes were found in the accumulation of soluble solids and pH. On the other hand, one of the most interesting alterations that occurred at the transcriptional level on the genes of the ethylene hormone synthesis pathway was the repression of S-adenosine methionine (SAM) in the L1 transgenic line and the repression of ACS-synthase (ACS) 2 and 4 during the 42 DAA. With these evidences, it is concluded that the over-expression of the *Solyc11g011300* gene affected fruit ripening through the deregulation of the SAM, ACS4 and ACS2 genes, an effect that could be due to the co-suppression process.

Key words: ethylene biosynthesis, ripening, over-expression, *Solyc11g011300*.

1.INTRODUCCIÓN

La pared celular es una estructura localizada al exterior de la membrana plasmática, realiza funciones de manera coordinada con la cutícula vegetal de las cuales tres de las más importantes son: mediar el intercambio de agua, coordinar la respuesta al ataque de patógenos y ambas estructuras aportan rigidez y soporte mecánico, entre otros (Martin & Rose, 2014). Una de las regiones más dinámicas de la pared celular es la pectina, la cual está compuesta por tres clases de polímeros: homogalacturonano y ramnogalacturonano I y II (Rivera, *et al.*, 2008). La pectina ha sido estudiada durante muchos años ya que se planteaba que era la única estructura responsable de la pérdida de firmeza de los frutos durante la madurez. En la actualidad existe evidencia de que la pérdida de firmeza es un fenómeno multifactorial en el que intervienen la pared celular y la cutícula (Romero & Rose, 2019). Estas dos estructuras externas: pared celular y cutícula, se han estudiado en conjunto debido al conocimiento generado con el análisis de la variedad de tomate *DFD* (Saladié *et al.*, 2007). El comportamiento del tomate *DFD* durante la madurez sugiere que existe coordinación entre la pared celular y la cutícula, ambas pueden jugar un papel fundamental en el deterioro causado durante la madurez (Romero & Rose, 2019) principalmente en la pérdida de firmeza. La principal hormona relacionada con los cambios de firmeza durante la madurez del fruto es el etileno. Esta hormona es sintetizada por el fruto durante su desarrollo y también durante su madurez (Barry & Giovannoni, 2007) mediante el ciclo de Yang (Cara & Giovannoni, 2008). Durante la traducción de señales en respuesta al etileno, participan genes que responden de manera tardía, como los que promueven el ablandamiento del fruto a través de la degradación de la pared celular (Bennett & Labavitch, 2008) y los de respuesta rápida como factores de transcripción. En los genes de respuesta tardía se encuentran los que codifican para enzimas ramnogalacturonano liasa (RGL), según reportes (Berumen, *et al.*, 2017) indican que todas las RGL de tomate albergan elementos de respuesta a etileno (EIN3;EIL, AP2;ERF, AP2;RAV;B3) en su promotor y el gen de RGL-*Solyc11g011300* contiene el elemento regulador EIN3;EIL (Berumen, *et al.*, 2017). Se ha demostrado que RGL es expresada en frutos y que su transcripción ocurre en la etapa de maduración (Berumen, *et al.*, 2018). Además, recientemente su expresión fue correlacionada con la producción de etileno (Trillo, *et al.*, 2021). En este sentido, los elementos de respuesta a etileno también se encontraron en genes implicados en la elongación y transporte de componentes

cuticulares. Recientemente se reportó que, elongasas como CER6 y traslocadoras de ácidos grasos de cadena larga ABCG11, son controladas por la hormona etileno (Romero & Lafuente, 2022). Con base en estas evidencias, se puede sugerir que la hormona etileno podría regular la expresión de los genes de pared celular y cutícula, ambas estructuras relacionadas con los cambios de firmeza en el fruto. La sobreexpresión y silenciamiento de genes son una herramienta útil para elucidar la función de genes específicos dentro de la fisiología de frutos y en fenómenos complejos como el de la maduración. En este sentido, la función de las proteínas remodeladoras de la pared celular ya ha sido estudiada, pero las evidencias acerca de la función de la enzima RGL sigue siendo escasa. En nuestro laboratorio Ochoa, *et al.*, (2018) crearon frutos transformados con el gen *35s::Solyc11g011300* diseñado para sobre-expresar un gen de RGL (*Solyc11g011300*). Los frutos transformados mostraron un fenotipo con firmeza prolongada durante la maduración en comparación con los frutos silvestres (Ochoa, *et al.*, 2018). Partiendo de esta base, se tiene la hipótesis de que el mecanismo genético de etileno podría estar afectado, por lo cual evaluando los cambios que ocurren en el fruto durante la maduración se podría entender el fenotipo observado en las líneas transgénicas. Por ello el objetivo central de este trabajo fue evaluar el comportamiento fisiológico y respuesta transcripcional de los frutos transgénicos. Para ello en esta tesis se evaluaron los parámetros fisicoquímicos de los frutos transgénicos, así como la producción (ACS) y respuesta de diversos genes (E4 y E8) a la hormona etileno. Asimismo, mediante bioinformática se analizaron los promotores de los genes relacionados con la biosíntesis, ensamble y deposición de cutícula con la finalidad de demostrar si la sobreexpresión del gen *Solyc11g011300* causó desregulación de genes involucrados en la reingeniería de la pared celular y afectaciones potenciales en la biosíntesis de cutícula.

2. ANTECEDENTES

2.1 El Fenómeno de la Maduración Ocasiona el Ablandamiento en Frutos

La maduración de los frutos es un fenómeno genéticamente programado que acompaña al desarrollo de la semilla (Klee & Giovannoni, 2011). Desde el punto de vista antropocéntrico, la madurez de consumo de los frutos es un período en el desarrollo de los frutos en el que se presentan las características sensoriales óptimas para su consumo. Este fenómeno de la maduración se ha estudiado en diferentes frutos de importancia económica para México como: mango, fresa, sandía, manzana, piña, naranja, aguacate y tomate, por mencionar algunos. Se ha logrado clasificarlas, con base al incremento en la producción de etileno y a la producción de CO₂, en frutas climatéricas y no climatéricas (Paul, *et al.*, 2012). El estudio de la maduración desde el punto de vista molecular, utiliza como modelo al fruto de tomate ya que su genoma está completamente secuenciado y liberado, tiene un ciclo de vida corto y su fruto es carnoso. Fisiológicamente, la maduración de los frutos es un fenómeno que puede ser afectada por varios factores tales como, humedad en el ambiente, temperatura, incidencia de luz sobre los cultivos, disponibilidad de nutrientes, entre otros. Algunos cambios en los frutos de tomate ocasionados por la maduración son alteraciones en acidez, sólidos solubles, color, sabor, textura, firmeza, acumulación de moléculas del metabolismo secundario y cambios en aroma (Alexander & Grierson, 2002). Estos cambios moleculares que ocurren durante la maduración de los frutos (Alba, *et al.*, 2000), el tiempo de vida de anaquel (Thole *et al.*, 2020) y los principales factores que lo afectan durante la post-cosecha (Grierson & Kader, 1986) ya han sido estudiados.

La calidad de los frutos para el consumo humano está determinada por características y atributos organolépticos como la apariencia física de los frutos, color, sabor, textura y firmeza. Durante el proceso de maduración, uno de los principales cambios que ocurren en el fruto es la disminución de la firmeza, que se asocia a la calidad y vida de anaquel de los frutos (FAO, 2021). La disminución de la firmeza en frutos de tomate tiene lugar en el pericarpio del fruto (Figura 1), este fenómeno se encuentra estrechamente relacionado con la estructura de la pared celular (Seymour, *et al.*, 2013). La firmeza puede ser afectada durante la maduración por factores como la presión de

turgencia (Saladié *et al.*, 2007), el ataque de radicales hidroxilo a los polímeros de la pared celular (Airianah, *et al.*, 2016) y la composición de la cutícula (Yeats & Rose, 2013). Esto nos permite concluir que el fenómeno de la maduración es determinado por varios factores y que los principales cambios en la firmeza son ocasionados por modificaciones en la pared celular (Paniagua *et al.*, 2014).

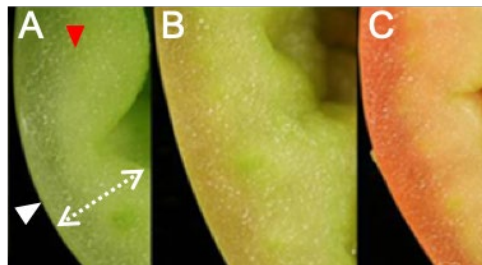


Figura 1. Pericarpio de tomate en 3 etapas de madurez, A) Corresponde a Verde Maduro, B) Cambiante y C) Tomate Maduro. Triángulo blanco indica el endocarpio, triángulo rojo indica el mesocarpio y la línea punteada blanca indica el pericarpio. Imagen tomada y adaptada: the rose lab, school for integrative plant science (<http://labs.plantbio.cornell.edu/rose/>)

2.2 La Pared Celular Durante la Maduración

Anteriormente, se pensaba que era posible tener el control de la maduración, ya sea: retrasando o inhibiendo dicho fenómeno. La información publicada sugería que esto llevaría a una optimización de la vida útil de una gran variedad de productos hortofrutícolas (Seymour, *et al.*, 2013). Es por esto que el estudio de la maduración se centró en el entendimiento de la pared celular primaria y sus modificaciones durante la ontogenia del fruto (Figura 2). Estudios de composición polimérica reportados por Crookes & Grierson, (1983), indican que el pericarpio de tomate contiene mayormente pared celular primaria, por lo que podemos inferir que es abundante en pectina. La pectina es el componente más dinámico y complejo de la pared celular, su estructura se basa en tres clases de polímeros: homogalacturonano (HG), ramnogalacturonano tipo I (RG-I) y II, y en menor proporción residuos de arabinanos, mananos, xilanos y galactanos (Figura 3). Estos polímeros se encuentran interactuando con estructuras de mayor tamaño como las microfibrillas de celulosa y hemicelulosa (Rivera, *et al.*, 2008).

Durante la ontogenia del fruto (Figura 2), la pectina experimenta cambios en los polímeros mayores y en sus interacciones (Verhertbruggen & Knox, 2007). Los cambios en la pared celular primaria, abordados desde la fisiología del fruto en desarrollo, se encuentran vinculados a su ontogenia, esto quiere decir que la re-ingeniería de la pectina es diferente durante los procesos de crecimiento (división celular y expansión celular) y maduración, lo cual se abordará más adelante. El desarrollo del fruto de tomate desde la antesis hasta su madurez fisiológica en la planta toma de 45 a 50 días. En ese periodo, el fruto atraviesa dos fases ontogénicas: desarrollo y la maduración del fruto. La fase de desarrollo incluye dos etapas: la primera etapa corresponde al crecimiento por división celular que ocurre durante los primeros dos días después de antesis (DDA). Durante este tiempo la diferenciación celular forma primordios de células, que posteriormente van a formar los diferentes tejidos del fruto (Azzi *et al.*, 2015). Después, el fruto comienza a crecer aumentando su número de células (Seymour, *et al.*, 2013), lo cual termina entre los días 10 o 12 DAA (Ariizumi, *et al.*, 2013), aunque algunos autores indican que esta fase podría durar hasta 14 DAA (Shakya & Lal, 2018). La segunda fase de crecimiento se denomina expansión celular, evento que ocurre inmediatamente después del periodo de división celular y que se caracteriza por crecimiento periclinal principalmente debido a la entrada de agua a la célula (Solano *et al.*, 1998). Esta fase termina a los 42 DDA inmediatamente después de haber terminado la etapa de verde maduro, en esta etapa los frutos pueden aumentar sus dimensiones más de 10 veces (Klee & Giovannoni, 2011). Finalmente, después de los 42 DAA el desarrollo del fruto ha finalizado para iniciar la última etapa de su ontogenia que es la maduración. Durante toda la ontogenia del fruto, la pectina cumple varias funciones en distintos fenómenos fisiológicos como la elongación celular, debido a esto varias de las proteínas que participan en su re-ingeniería comúnmente provienen de una familia de multigenes (Berumen *et al.*, 2018; Roongsattham *et al.*, 2012; Wu, *et al.*, 2018a).

Durante de la maduración los factores que causan el ablandamiento del fruto del tomate involucran el trabajo coordinado de una serie de enzimas que utilizan como sustrato diversos polímeros pécticos. En el modelo de estudio tomate (*Solanum lycopersicum* L.) las enzimas relacionadas con la degradación de la pectina durante el desarrollo y maduración ya han sido estudiadas y están esquematizadas en la Figura 3. Las enzimas que participan en la re-ingeniería del homogalacturonano son endo-poligalacturonasa (EC 3.2.1.15) que realiza la escisión del enlace α -D-1-4 galactosilurónico (Brady, *et al.*, 1982; Sheehy, *et al.*, 1988; Smith, *et al.*, 1988) y exo-poligalacturonasa (EC 3.2.1.67) que hidroliza el primer enlace glicosídico del extremo no reductor

del polímero. La enzima pectato liasa (EC 4.2.2.2) que actúa en extremos no reductores (Uluisik *et al.*, 2016). La enzima pectin metil-esterasa (EC 3.1.1.11) que hidroliza los grupos metilo de pectina esterificada de los monómeros de ácido galacturónico (Hyodo *et al.*, 2013). Las enzimas que degradan el polímero ramnogalacturonano tipo 1 son la β -galactosidasa (EC 3.2.1.23) que hidroliza las cadenas de galactosa que están enlazadas al polímero principal del ramnogalacturonano tipo 1 (Smith, *et al.*, 2002). La enzima α -arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55) responsable de remover los residuos terminales de arabinosa de varios polímeros pécticos, siendo uno de ellos el ramnogalacturonano tipo 1 (Sozzi *et al.*, 2002), y ramnogalacturonano liasa (EC 4.2.2.23) la cual es responsable del rompimiento del polímero principal del ramnogalacturonano tipo I (Ochoa, *et al.*, 2018). La enzima pectin acetil esterasa (EC 3.1.1.6) añade grupos acetil a los polímeros de pectina. Cada una de las enzimas mencionadas anteriormente provienen de una familia de multigenes, esto quiere decir que existe redundancia en la función y expresión diferencial espacio-temporal entre los genes que codifican para la misma enzima que degradan la pectina en la pared celular, lo cual se va a ejemplificar con la enzima pectin metil esterasa (PME) ya que su participación en diferentes fenómenos fisiológicos es bastante conocido.

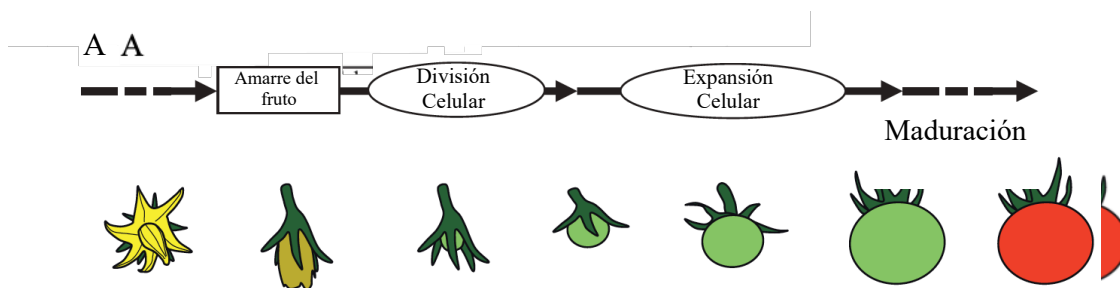


Figura 2. Ontogenia del fruto de tomate dividido en fases de desarrollo hasta la maduración. Adaptado de Ariizumi, *et al.*, (2013)

2.2.1 Un Ejemplo de Familia de Genes: La Familia de PME Participa en Varios Fenómenos

Así como la pared celular primaria mantiene dinamismo en los polímeros de pectina durante la madurez de los frutos; otros fenómenos, como el desarrollo radicular (Jung & McCouch, 2013) y

la elongación de meristemas apicales (Kierzkowski *et al.*, 2012), entre otros, requieren la acción de las enzimas de hidrólisis cuyos sustratos son los polímeros de la pared celular primaria. En cualquiera de los fenómenos mencionados anteriormente, la pared celular primaria es alterada por la activación coordinada de enzimas, lo que justifica el gran número de genes que codifican para la misma enzima, como es el caso de la enzima PME (Wang *et al.*, 2013). La enzima PME pertenece a una familia de multigenes que ha sido ampliamente estudiada en ambos modelos de estudio: tomate *Solanum lycopersicum* (Wen, *et al.*, 2020) y *Arabidopsis* (Wu, *et al.*, 2018b). En *Arabidopsis*, la función bioquímica de PME, como se describió anteriormente es remover los grupos metilo esterificados presentes en el polímero de homogalacturonano (Wolf, *et al.*, 2009). Se tienen registrados dentro del genoma de *Arabidopsis* más de 66 genes que codifican para la enzima PME. Estas secuencias se agrupan en dos grupos: PME y PME1, esta clasificación es determinada por la presencia de una secuencia de aminoácidos (PRE-PME) en la región N-terminal de esta familia de multigenes, la cual sirve como inhibidor de las mismas PME (Wen *et al.*, 2020). La función de la enzima de PME es igual en todos los tejidos, eliminar grupos metilos esterificados en el ácido carboxílico de los monómeros de ácido galacturónico en el polímero de homogalacturonano. Aunado a lo anterior, la planta utiliza genes independientes de PME en diferentes fases de su crecimiento y en diferentes tejidos para realizar su función. Por ejemplo, durante el desarrollo de la planta, la enzima PME5 es activa en meristemas apicales, mientras que las PME1, 21 y 23 realizan su función en los granos de polen. La PME6 cumple una función en la morfología del embrión y en las células de guardianas de los estomas, PME3 es activada durante la elongación celular en hipocotilos, mientras que la PME17 participa en el desarrollo radicular en raíces primarias y secundarias (Wu *et al.*, 2018b). En tomate, recientemente se ha publicado la expresión de la familia de genes PME involucradas en la ontogenia del fruto de tomate (Wen *et al.*, 2020). En ese trabajo los autores encontraron que los genes de PME: *Solyc03g078100*, *Solyc03g123620*, *Solyc11g005770*, *Solyc03g083360*, *Solyc07g017600*, *Solyc06g051960*, *Solyc12g008530*, *Solyc06g009190*, y *Solyc03g123630* (esta última reportada como PME1 en otros trabajos) muestran altos niveles de transcrito durante el desarrollo de la fruta. Durante la maduración de la fruta, los genes *Solyc07g064170* (reportada como PME1.9), *Solyc07g064180* (reportada como PME2.1), y *Solyc07g064190* (reportada como PME3) muestran un alto nivel de expresión. Por otro lado, el gen *Solyc12g098340* es activo durante toda la ontogenia del fruto (Wen *et al.*, 2020).

Tomando en cuenta las modificaciones de la pectina, durante el desarrollo vegetativo de *Arabidopsis*, y el desarrollo de la fruta de tomate, es posible observar como la planta activa diferentes genes de PME en diferentes eventos fisiológicos. Por ello, es posible sugerir que otras familias de genes de pared celular como poligalacturonasa, pectato liasa, ramnogalacturonano liasa, β -galactosidasa y α -arabino-furanosidasa trabajan en distintos fenómenos donde ocurren cambios en la pared celular.

2.3 Estudios Realizados en Polímeros de Pared Celular Durante la Post-cosecha

Las alteraciones que ocurren sobre los polímeros de la pared celular primaria se relacionan estrechamente con el ablandamiento y cambios en textura del fruto. Se han realizado experimentos de silenciamiento dirigido a genes responsables de la degradación de polímeros que forman a la pectina (Verhertbruggen & Knox, 2007) encontrando que, genes como de PME (Hall *et al.*, 1993) y PG (Sheehy *et al.*, 1988) no son responsables del ablandamiento del fruto durante la maduración. En contraste, los resultados encontrados por Yang *et al.*, (2017) indican que es posible retardar el ablandamiento durante la maduración, silenciando un gen que codifica a una pectato liasa (PL) que degrada al homogalacturonano en la pared celular. En el experimento, los autores realizaron el silenciamiento de una PL (*Solyc03g111690*) encontrando que los frutos transgénicos mostraron marchitamiento cuatro días después que la línea isogénica. Además, las plantas alteradas presentaron el mismo porcentaje de pérdida de agua hasta el día 45 de almacenamiento, destacando la importancia de la enzima PL en la permeabilidad de la pared celular. En el mismo estudio, se midió la firmeza de los frutos, encontrando que los frutos transgénicos eran más firmes que la línea isogénica. De hecho, a los 40 días después de almacenamiento, los frutos transgénicos mantenían el doble de firmeza que la línea isogénica (Yang *et al.*, 2017). Por otro lado, algunos investigadores han propuesto el silenciamiento de múltiples genes de pared celular para potenciar la firmeza durante la maduración. Wang *et al.*, (2019) realizaron el silenciamiento de tres genes: pectato liasa pectato liasa (*Solyc03g111690*), poligalacturonasa 2s (*Solyc10g080210*), y β -galactosidasa (*Solyc12g008840*) utilizando la tecnología CRISPR-CAS9. En sus resultados demuestran que el espacio apoplástico mantiene el mismo tamaño en las tres líneas transgénicas analizadas. Los

autores concluyeron que el silenciamiento del gen PL (*Solyc03g111690*) fue capaz de retardar la pérdida de firmeza causada, sin embargo el marchitamiento en los frutos transgénicos apareció 4 días después comparado con la línea isogénica. Estas evidencias (Wang *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2017) podrían indicar la posibilidad de que al realizarse alteraciones sobre alguna enzima de re-ingeniería de pectina ocasione alteración o desregulación de otras estructuras relacionadas con la permeabilidad y pérdida de agua de los frutos, ya que la firmeza y marchitamiento de los frutos transgénicos se ven afectados en los reportes.

También se ha estudiado el transporte de componentes pécticos mediante vesículas desde el retículo endoplasmático al exterior de la membrana plasmática mediante el silenciamiento del gen SI-Rab11a, una GTPasa involucrada en el tráfico de vesículas transportadoras mostrando otro enfoque para el entendimiento de la pérdida de firmeza del fruto (Lunn, *et al.*, 2013). Sin embargo, en otros trabajos como Segado, *et al.*, (2016) y Kosma *et al.*, (2010) se sugiere que la pérdida de firmeza de los frutos depende tanto de la pared celular como de la cutícula.

2.4 La Cutícula Vegetal

La cutícula es una capa delgada localizada en todos los tejidos aéreos de las plantas, frontera entre el medio ambiente y el interior de la célula. Su biosíntesis se realiza en las células epidérmicas. La principal función de la cutícula es evitar la pérdida de agua en los tejidos aéreos (Yeats *et al.*, 2010), también participa en el soporte mecánico en conjunto con la pared celular, protección contra patógenos, y es responsable de controlar el intercambio gaseoso (Segado *et al.*, 2016). La cutícula está conformada por ceras intracuticulares: polímeros de mayor abundancia son monómeros de cutina de 16 a 18 carbonos, y las ceras epicuticulares que están formadas por ácidos grasos de cadena muy larga de hasta 32 carbonos y alcoholes de alto peso molecular que se encuentran incrustados en la matriz de cutina (Kunst, *et al.*, 2006). En frutos frescos como tomate, la cutícula es una estructura poco dinámica durante la formación de los frutos. Ya que en contraste, los cambios que ocurren en la cutícula son basados en la acumulación de compuestos específicos, dichos cambios ya han sido estudiados y caracterizados en diferentes especies y estados de desarrollo de los frutos (Lara, *et al.*, 2015). En el caso del tomate, la masa total de cutícula es mayor

en la etapa de maduración que en la etapa de desarrollo (Lara *et al.*, 2015; Martin & Rose, 2014). Lara *et al.*, (2015) analizaron a detalle la naturaleza de los componentes cuticulares, precisando que los alcanos de 28 carbonos tienen diferente naturaleza química ya que en ellos se pueden encontrar triterpenos unidos a su estructura, dobles enlaces, grupos hidroxilos, alcoholes primarios y secundarios como el ácido trihidroxi 9,10,18- octadecanoico y ácido trihidroxi 9,10,18 octadecenoico. En este sentido, el estudio del tomate *delayed fruit deterioration* (DFD, por sus siglas en inglés) demuestra una asociación entre la composición cuticular (ácidos grasos de cadena larga, ceras epicuticulares) con la pérdida de la firmeza (Saladié *et al.*, 2007). Es importante resaltar que los frutos DFD son resistentes al estrés hídrico, ya que en los reportes de Romero & Rose, 2019 demuestran claramente la participación de la pared celular y la cutícula en la pérdida de firmeza. Los autores demuestran que los frutos DFD tienen un control eficiente de la permeabilidad bajo condiciones de estrés hídrico de hasta un 70% (Romero & Rose, 2019). La vida de anaquel del fruto DFD es el ejemplo claro de la influencia de la cutícula en la vida de anaquel del fruto (Saladié *et al.*, 2007). Interesantemente la re-ingeniería de ambas estructuras (cutícula y pared celular) asociadas a su funcionamiento relacionado con la madurez podría ser dirigido por la hormona etileno ya que los reportes de (Romero & Lafuente, 2022) indican que en algunos cítricos, el etileno podría controlar los genes relacionados con la deposición de la cutícula como transportadores de membrana (ABCG) y su elongación como β -ceto acil coenzima (CER6). Esta hipótesis podría ser más sólida mediante el análisis de los promotores de los genes implicados en la formación de cutícula. Con ayuda de estas evidencias experimentales podemos concluir que la cutícula es una estructura hidrofóbica, menos dinámica que la pared celular y determinante para la firmeza del fruto durante la madurez.

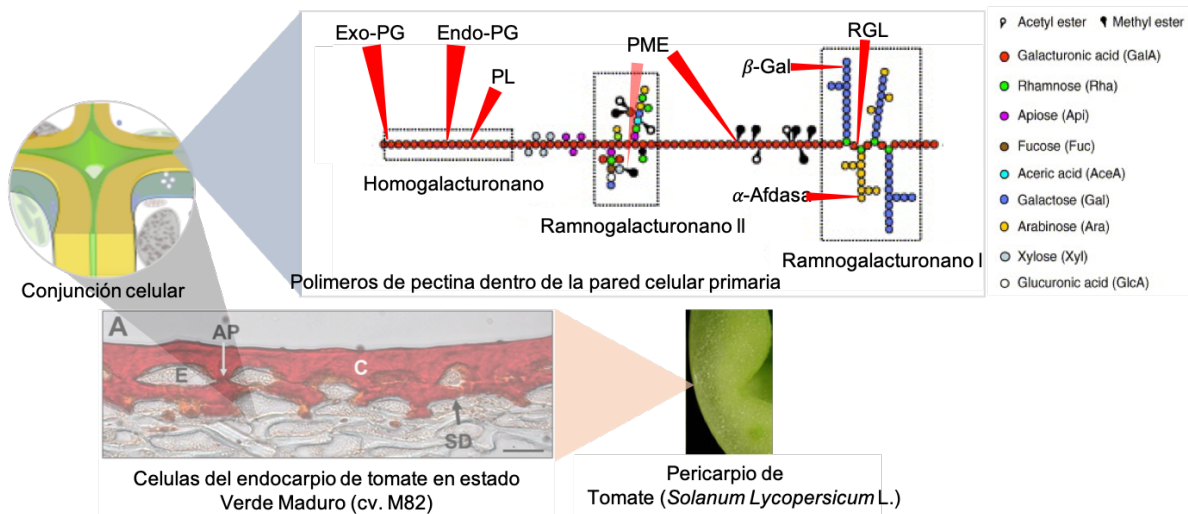


Figura 3. Esquema: polímeros de pectina y las enzimas que actúan sobre su estructura. Los triángulos en rojo indican el lugar donde se lleva a cabo la actividad enzimática. Exo-PG: Exo-poligalacturonasa, Endo-PG: Endo-poligalacturonasa, PL: péctato liasa, PME: pectin-metil-esterasa, β -gal: beta-galacturonasa, RGL: ramnogalacturonano liasa, α -ara: alfa-arabino-furanosidasa. El esquema de los polímeros pécticos fue tomada y adaptada de Willats et al, (2006). La microscopia del endocarpio de tomate fue tomada de Martin & Rose, (2014)

2.5 La Hormona Etileno Induce la Maduración en los Frutos de Tomate

En los frutos climatéricos, la hormona etileno tiene un papel fundamental en el proceso de la maduración (Alexander & Grierson, 2002). Mediante estudios que se han realizado en tomate se ha logrado conocer parte del mecanismo molecular involucrado en la biosíntesis y respuestas moleculares a esta hormona (Seymour, *et al.*, 2013). Para los fines que se persiguen en esta tesis, nos enfocaremos solamente en la transición de desarrollo a la fase de maduración, ya que es ahí donde ocurre la activación de biosíntesis de etileno auto catalítico y se presentan los cambios irreversibles de la maduración que se mencionaron anteriormente (Alós, *et al.*, 2019). En el fruto de tomate, se conocen los genes de respuesta temprana y tardía a la hormona a etileno (Barry & Giovannoni, 2007). Los genes de respuesta tardía son responsables de cambios irreversibles en la pared celular, de manera más específica sobre la pectina.

Además de su relación con la madurez, el etileno tiene funciones en procesos fisiológicos como respuesta al estrés biótico y abiótico, abscisión, floración, desarrollo y maduración de frutos (Seymour, *et al.*, 2013). La hormona etileno es sintetizada mediante el ciclo de Yang, donde el

aminoácido metionina es el sustrato para sintetizar S-Adenosil-Metionina por la enzima SAM sintetasa. Después, la enzima ACC sintetasa (ACS) lo transforma en Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) y finalmente el ACC es transformado en etileno por la enzima ACC Oxidasa (ACO) (Alexander & Grierson, 2002). Durante la ontogenia del fruto se han descrito 2 sistemas de producción de etileno: sistema de biosíntesis uno o sistema basal y sistema de biosíntesis dos o auto-catalítico (Grierson, *et al.*, 1993; Klee & Giovannoni, 2011; Seymour, *et al.*, 2013). El mecanismo de biosíntesis de etileno basal o sistema uno está activo de manera permanente durante el desarrollo de los frutos de tomate (Figura 2A). El sistema de biosíntesis de etileno número uno está activo desde la senescencia de la flor hasta los 41 DDA. En este sistema, los genes ACS6, ACO1 y ACO 4 son los responsables de mantener la síntesis del etileno. Durante el estado de transición, cuando el fruto termina su crecimiento por expansión celular aproximadamente a los 42 DDA (breaker), los genes que participan en la síntesis de etileno, son ACS4 y ACO3. Después de los 42 DDA, se activa el sistema número dos de biosíntesis de etileno se activa, ocasionando un aumento abrupto en la producción de etileno y la activación de los genes ACS1A, ACS2 y ACS3 además de los genes ACO1 y ACO3 (Paul *et al.*, 2012).

2.5.1 Regulación de Etileno

La biosíntesis de etileno se puede activar en respuesta a hormonas como auxinas, citocininas, ácido abscísico, brasino-esteroides, ácido jasmónico, estrés biótico-abiótico como sequía, inundación, daño mecánico, estrés salino, temperatura, patógenos, compuestos químicos y durante diferentes fenómenos fisiológicos como germinación, maduración de la hoja, senescencia de la flor, y abscisión (Vanderstraeten & Van Der Straeten, 2017). El camino metabólico de biosíntesis de etileno, la conversión de SAM a ACC por la enzima ACC sintetasa (ACS) es la etapa limitante. En este trabajo de tesis, se discutirá la regulación de la biosíntesis de etileno a nivel transcripcional por la formación de ACC, sin dejar de lado la regulación post-transcripcional la cual es poco conocida. En el genoma de tomate, se encuentran 4 genes que codifican para ACS (ACS6, ACS1A, ACS4 y ACS2), de los cuales los genes ACS4 y ACS2 se encuentran activos durante la transición y durante el sistema de biosíntesis de etileno número dos (Pattyn, *et al.*, 2021).

Hay varias señales endógenas y exógenas que controlan la síntesis de etileno mediante la modulación de la expresión de ACS (Vandenbussche, *et al.*, 2012). Dugardeyn, *et al.*, (2008), reportaron que los genes ACS con excepción de ACS4 son inducidos por la presencia de giberelinas (Nemhauser *et al.*, 2006). Las hormonas como auxinas y brasinoesteroides e incluso el propio etileno inducen la biosíntesis de etileno mediante la activación de la transcripción del gen ACS. La familia de isoenzimas de ACS ha sido clasificada filogenéticamente en tres grupos, basada en la presencia de un dominio regulador en la región C-terminal. Grupo 1: que contiene los dominios susceptibles a la fosforilación CDPK y MPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos y dependientes de calcio respectivamente), grupo 11: que contiene solo el sitio CDPK y el grupo 111: que no contiene elementos susceptibles a la fosforilación (Depaepe & Straeten, 2020). Los dominios CDPK y MPK en la secuencia del ARNm maduro en los genes ACS pueden ser fosforilados después de la transcripción, ocasionando regulaciones post-transcripcionales que son revisadas y descritas a detalle por Depaepe & Straeten 2020. En *Arabidopsis* la regulación transcripcional de ACS 11 (una ACS tipo dos) es regulada por proteólisis (sistema de ubiquitinas 26) para aumentar la producción de etileno. Este sistema de ubiquitinas 26 ensambla a la proteína ETO1 mediante el sistema BTB (tramtrack/bric-a-brac) en el dominio CDPK localizado en el extremo C-terminal causando un fenotipo sobre productor de etileno (Christians *et al.*, 2009). En tomate, el entendimiento de la regulación de etileno mediante el estudio del sustrato principal para etileno ACC, ha llevado a estudiar mutantes de maduración como el tomate RIN (*ripening-inhibitor*). RIN, tiene una alteración en el factor de transcripción MADS-box RIN el cual reprime la transcripción de ACS 2 y ACS 4 (Vrebalov *et al.*, 2002), pero promueve la transcripción de otros genes (Ito *et al.*, 2017). La falta del factor de transcripción MADS-Box RIN ocasiona niveles bajos de licopeno y beta caroteno, además de mantener la firmeza más tiempo que los tomates silvestres como cv 'Ailsa Craig' (Ito *et al.*, 2017). Otros factores de transcripción que regulan a ACS, en especies como caña de azúcar, manzana, kiwi y ciruela japonesa, son abordados detalladamente por Depaepe & Straeten, (2020) en el Tabla 1.

Pattyn *et al.*, (2021) reportan el hallazgo de formas conjugadas del producto catalítico de la ACS, el 1-amino ciclo propano-1-ácido carboxílico o ACC. Debido a que la localización de la proteína ACO puede ser citosólica o en membrana plasmática (Pattyn *et al.*, 2021) es posible que la reserva citosólica de ACC con frecuencia adquiera formas conjugadas de las cuales se han reportado 3: malonil-ACC (Amrhein, 1981), γ -glutamil-ACC (Martin, *et al.*, 1995) y jasmonil-ACC (Staswick

& Tiryaki, 2004). Estas formas conjugadas de ACC pueden controlar la cantidad de ACC citosólico mediante vías hormonales de control (Depaepe & Straeten, 2020). En este punto, es posible sugerir que la presencia de estas especies conjugadas de ACC sean el enlace para traslapar la respuesta del etileno a una función independiente de la madurez. En síntesis, la regulación de etileno mediante ACC se ha encontrado que ACC no es exclusivo de la biosíntesis de etileno ya que se ha reportado que es mediadora en la señalización para el crecimiento de la raíz, por una vía independiente del etileno (Tsang, *et al.*, 2011).

2.5.2 Receptores de Etileno en Tomate

En el genoma de tomate existen 7 genes receptores de etileno LeETR1, LeETR2, NR, LeETR4, LeETR5, LeETR6 y LeETR7. Estos receptores están divididos en dos familias; en la familia número uno están los receptores que tienen similitud con las histidina-cinasas y en la familia número dos están los receptores que muestran una actividad serina-cinasa (Klee & Giovannoni, 2011). La señalización de etileno involucra una ruta única que incluye como regulador central a la proteína EIN2 (*ethylene insensitive 2*) localizada en el retículo endoplásmico. EIN2 en presencia de etileno, pierde su estructura funcional mediante la liberación del extremo C-terminal, la cual es capaz de ingresar al núcleo de la célula y activar la transcripción de EBF1/2 (Chang, 2016). EBF1/2 induce la transcripción de los factores de transcripción EIN3/EIL1 mismos que activan la transcripción del factor de respuesta a etileno 1 (ERF1), el cual es capaz de unirse a sitios específicos en promotores de genes que participan en la respuesta tardía a etileno (Lorenzo, *et al.*, 2003), entre los que se encuentran genes relacionados con la degradación de pared celular (Tabla 2, Chaves, *et al.*, 2006). El factor de transcripción ERF1 es capaz de inducir la transcripción una gran familia de genes ERF's, no solo aquellos relacionados con la activación de genes relacionados con la maduración como LeERF1 y LeERF4 y SIERF6 (*Solyc06g065820*, *Solyc05g052030* y *Solyc01g065980*), también relacionados con resistencia a enfermedades: *pti4* y *pti5* (*Solyc05g052050* y *Solyc02g077370*), respuesta a factores abióticos como concentraciones altas de sales: TERF1/JERF2, JERF1, JERF3 (*Solyc05g051200*, *Solyc06g063070* y *Solyc03g123500*), y sequía: ERF5 (*Solyc03g093560*), entre otros (Liu *et al.*, 2016). Con esto, queda claro que los

ERF's y su efecto posterior a la señalización de etileno son los mediadores de la transcripción de genes independientes al etileno, como genes que responden de manera inmediata (como ERF1) y otros tardan más en expresarse como los genes involucrados en la modificación de la pared celular.

2.6 El Comportamiento de la Cutícula y la Pared Celular en Mutantes de Maduración

Existen mutantes de tomate cuyo fenotipo afecta al fenómeno de la maduración: un ejemplo es NR (*non-ripening*) el cual no presenta síntomas de maduración retardada por una mutación en un receptor a etileno (Thompson *et al.*, 1999), y de maduración retardada como DFD que muestra un aumento en la expresión del gene GPAT4 (acetiltransferasa glicerol 3 fosfato) (Saladié *et al.*, 2007; Romero & Rose, 2019), el mutante Cnr (*colorless non-ripening*) cuyos cambios epigenéticos alteran la metilación de la proteína de unión SQUAMOSA alterando la biosíntesis y respuesta de etileno ACO1, E8, y NR (Orfila *et al.*, 2001; Thompson *et al.*, 1999). El mutante RIN, tiene un fenotipo similar a los frutos no climatéricos (Herner & Sink, 1973) ya que en en la fase de madurez-senescencia no presenta un climaterio respiratorio. El alelo responsable del fenotipo ya ha sido caracterizado (Vrebalov *et al.*, 2002) se conoce que codifica para un factor de transcripción llamado SEPALLATA (también llamada RIN-MADS), el cual forma parte de la familia MADS-box (Klee & Giovannoni, 2011). RIN tiene una delección en el extremo C-Terminal del RIN-MADS por lo que no puede interactuar con el elemento de respuesta CArG-box, que está presente en los promotores de los genes ACS2 y ACS4 y también en algunas hidrolasas de pared celular primaria. Según los reportes de Ito *et al.*, (2017) su mutación inhibe todos los fenómenos asociados a la maduración, esto incluye la biosíntesis de etileno y la evolución que tiene esta hormona en el fruto, acumulación de carotenoides, producción de compuestos aromáticos y el ablandamiento causado por la maduración. En cuanto a la actividad bioquímica de hidrolasas de pared celular, se demostró que RIN muestra una cantidad de mRNA de poligalacturonasa (PG) 38 veces menor que el tomate silvestre *Lycopersicon esculentum* Mill, cv Rutgers (DellaPenna, *et al.*, 1987). Además, en este mismo mutante de tomate la actividad de la enzima celulasa fue registrada desde los 40 DDA (Poovaiah & Nukaya, 1979). La cutícula del mutante RIN tiene un comportamiento similar al Ailsa Craig, cuando se habla de acumulación total de cera; sin embargo, existen diferencias en el

contenido de ceras epicuticulares las cuales son descritas a detalle por Kosma *et al.*, (2010b) en el Cuadro 1.

Con el estudio de mutantes ha sido posible comprender los procesos que regulan el fenómeno de la maduración y los efectos de este en la pérdida de firmeza de los frutos. Con lo descrito anteriormente y la infomación del Cuadro 1, se puede concluir que los fenótipos de la madurez (RIN, Nr y DFD) refuerzan la idea sobre la interacción coordinada de la pared celular y la cutícula durante el fenómeno de la madurez.

Cuadro 1. Mutantes espontaneos de tomate y sus alteraciones en la pared celular y en cutícula.

Mutante de maduración/ Fenotipo	Alteración en cutícula	Alteración el pared celular	Alteración en biosíntesis, señalización y respuesta de etileno	Locus / gen modificado
RIN (LA3754²) (LA1795⁴) La presencia de factor de transcripción SEPALLATA Detiene la señalización de efectos de la hormona etileno	Aumenta el contenido de ceras epicuticulares desde Verde- hasta completamente rojo (3 días después de Breaker) más de 4 veces relativo a la etapa verde. En la etapa de verde maduro el monómero de cutina 16-hidroxilo hexadecanoico, 9,18-di-hidroxilo octadecanoico, 9,10,18-tri-hidroxilo octadecanoico, m-ácido coumarico aumentaron más del doble en la etapa verde maduro ³	Los genes Poligalacturonas a 2a (Solyc10g08021 0) y Pectato Liasa (Solyc03g11169 0) no se expresan comparada con Ailsa Craig en los tiempos verde maduro, Breaker+4 y Breaker+7 ²	ACS4 (Solyc05g050010) y ACS2 (Solyc01g095080) no se expresan comparada con Ailsa Craig en los tiempos verde, Breaker+4 y Breaker+7 ² Genes de respuesta a etileno como E8 se han reportado reprimidos desde MG hasta el Breaker +20 ⁴	RIN codifica para el gen SEPALATA que es un factor de transcripción tipo MADS-box ¹
DFD/ vida de anaquel prolongada se desconoce la causa	Aumento de la expresión de GPAT4 (acetiltransferasa glicerol 3 fosfato) con estrés hídrico en estado verde maduro, bajos niveles de expresión del gen CD3 (cutin deficient) en estado verde maduro, disminución de delta amirina sintetasa (TTS2) con estrés hídrico en tomate verde maduro. ⁵	Bajos niveles de LePG1 (poligalacturona sa) y LeExp1 (expansina) en estados Breaker, rosa y rojo maduro ⁶	Mayor producción de etileno, 4 nL/g/h con respecto al tomate Ailsa Craig, siendo los días 12 y 13 (después de MG) los niveles máximos de producción ⁶	-

Referencias: ¹Vrebalov *et al.*, 2002, ² Ito *et al.*, 2017, ³ Kosma *et al.*, 2010, ⁴ Kumar, *et al.*, 2012, ⁵ Romero & Rose, 2019, ⁶Saladié *et al.*, 2007. Breaker+N, indica etapa breaker más N días. MG, indica verde maduro.

2.7 Degradación Coordinada del Polímero Ramnogalacturonano tipo I en la Pared Celular Primaria en Frutos.

Ochoa, *et al.*, (2018) reportaron la sobre-expresión del gen *Solyc11g011300*, gen responsable del rompimiento del RG-I. En el análisis de las plantas homocigotas de primera y segunda generación, los autores encontraron cambios significativos en la pérdida de peso del fruto en la línea transgénica de primera generación denominada como L1. Además, en ambas líneas transgénicas se encontró un bajo número de semillas y frutos, mayor longitud en las raíces y una disminución en la viabilidad de polen. Por otro lado, se encontró que los tomates mantuvieron la firmeza durante más tiempo y se observó un retraso en el desarrollo del marchitamiento. Finalmente, los autores reportaron afectaciones durante la maduración, dentro de las cuales está: retrasado de una semana en llegar a la etapa verde maduro con respecto a la línea isogénica (Ochoa, *et al.*, 2018), por lo cual se decidió realizar un análisis más a fondo de los frutos transgénicos.

A lo largo de la ontogenia del fruto de tomate, la pared celular primaria experimenta cambios en los polímeros que la componen (Keegstra, 2010). Para muchos investigadores, la pérdida de adhesión celular determinada por la integridad de la pectina está relacionada con la reducción de la firmeza en frutos de tomate durante la maduración (Liu, *et al.*, 2019). La degradación de la pectina en la maduración inicia con la degradación del HG, que es un polímero lineal presente en la pectina (Figura 3). HG muestra un grupo metilo en su carbono 6 de algunos monómeros y requiere la actividad de la proteína PME para la hidrólisis del metilo. Una vez desmetilado, el polímero HG puede ser cortado por dos tipos de enzimas: poligalacturonasa que hidroliza al HG en modo exo o endo, y pectato liasa que degrada al HG mediante eliminación tipo beta (Barnes & Anderson, 2018). Posteriormente, polímeros de más complejidad como el RG-I son degradados. El RG-I experimenta cambios estructurales en sus cadenas laterales, las cuales están formadas por galactanos y arabinanos, lo cual influencia sobre el control de moléculas pequeñas como el agua (Moore, *et al.*, 2008). Debido a la complejidad del polímero RG-I se han realizado diversos análisis de acumulación de transcritos de las proteínas que actúan sobre el RG-I y sus cadenas laterales (Bartley & Knee 1982; Carey *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2002).

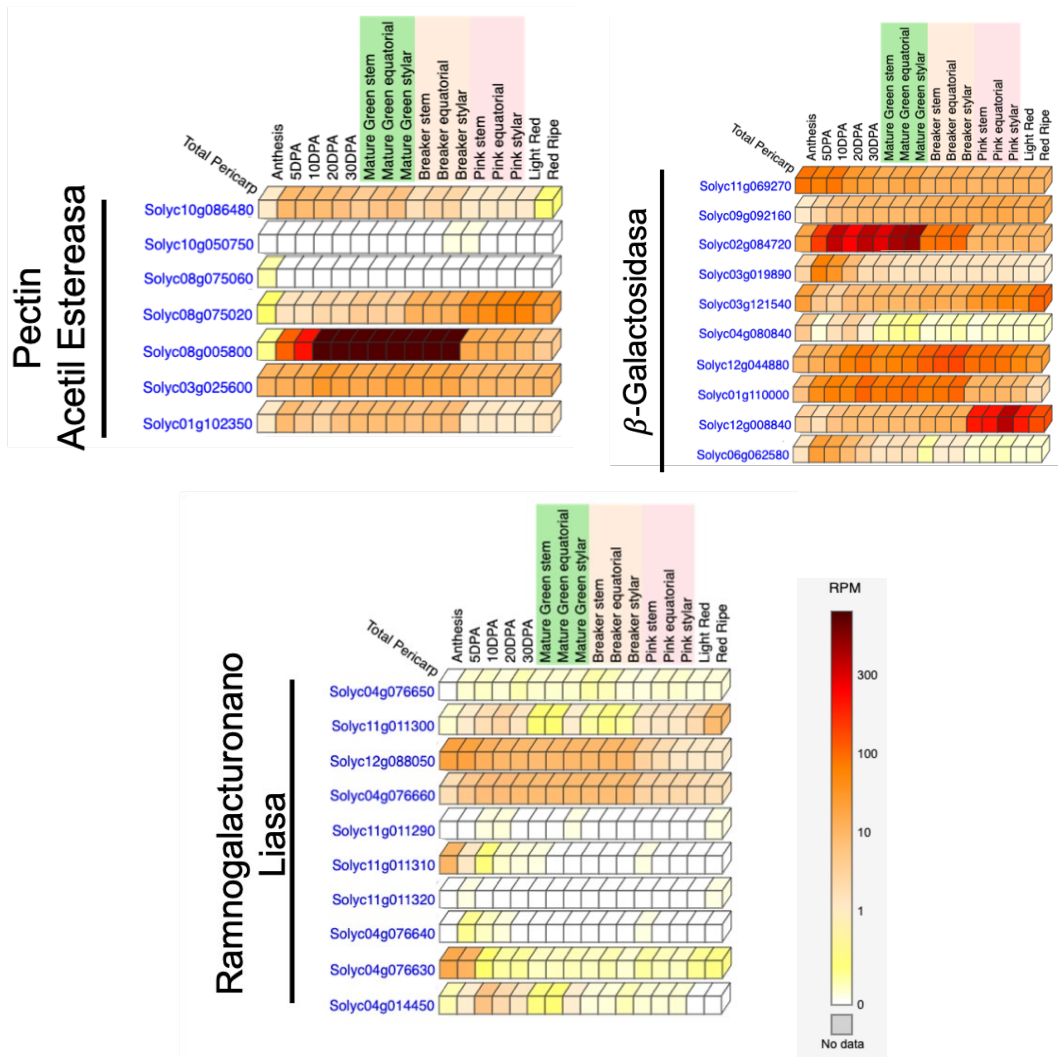


Figura 4. Expresión génica *in silico* de isoenzimas: pectin acetil esterasa, β -galactosidasa y ramnogalacturonano liasa durante el desarrollo y maduración del tomate. Los datos de expresión fueron obtenidos del Sol Genomic Network-Tomato Expression Atlas. RPM significa lecturas por millón, (forma de cuantificar la expresión *in silico*).

Los cambios en cadenas laterales del RG-I ocurren aproximadamente a los 42 DDA (Wang *et al.*, 2018), momento en el cual el desarrollo del fruto ha terminado e inicia la fase de maduración. Las modificaciones de las cadenas laterales del RG-I tiene implicaciones en la permeabilidad de la pared celular (Klaassen & Trindade, 2020), los cuales pueden inducir cambios en la firmeza de los frutos. Sin embargo, las alteraciones sobre su reorganización durante el desarrollo y madurez del fruto no han sido reportadas. Por ello se realizó un análisis *in silico* de la expresión de genes en pericarpio de tomate usando la plataforma del SolGenomicsNetwork, con esto se logró visualizar

un orden cronológico el orden de los eventos que alteran al polímero RG-I y sus ramificaciones, aunque muchos autores sostienen la idea que la degradación de la pectina no es secuencial. En la Figura 4, se muestran los cambios en expresión *in silico* de la familia de isoenzimas de pectin acetil esterasa, β -galactosidasa y ramnogalacturonano liasa durante el desarrollo y maduración del fruto de tomate. Los datos fueron obtenidos de la base de datos Sol Genomic Network-Tomato Expression Atlas (Fernandez, *et al.*, 2017a) que demuestran la degradación coordinada de los diferentes polímeros de la pared celular.

En el caso de la familia de genes de pectina acetil esterasa (PAE), la expresión de PAE durante el desarrollo del tomate se debe a la transcripción de los genes *Solyc08g005800*, *Solyc03g025600* y *Solyc08g075020* mismos que son activados durante la madurez (Figura 4). Aunado a lo anterior, la remodelación de las cadenas laterales del RG-I se realiza por la enzima beta-galactosidasa que puede ser expresada por dos genes que difieren en su tiempo de transcripción. *Solyc02g084720* cuya expresión es durante el desarrollo del fruto y *Solyc12g008840* que se encuentra expresada durante la madurez del fruto. Por otro lado, las modificaciones estructurales del esqueleto base del ramnogalacturonano tipo I es realizado por los genes *Solyc04g076630* y *Solyc11g011310* que codifican para una ramnogalacturonano liasa cuya transcripción es activada durante el desarrollo del fruto para la reingeniería de la pectina (Trillo, *et al.*, 2021) justo cuando éste se encuentra creciendo por división celular. Otros genes que se expresan durante la fase de expansión celular son *Solyc04g076660* y *Solyc12g088050* y por último *Solyc11g011300* cuya expresión se acentúa durante la maduración, como se observa en la Figura 4 y es apoyado por experimentos de expresión génica (Trillo, *et al.*, 2021).

El análisis realizado *in silico* representado en la Figura 4, fue útil para organizar cronológicamente los eventos que ocurren sobre el polímero RG-I. La sobre-expresión del gene *Solyc11g011300* en frutos de tomate podría ser importante para conocer: 1) si las interacciones que lleva a cabo el polímero RG-I mediante sus cadenas laterales son afectadas por la abundancia de RGL, y 2) que sucede con los frutos durante el almacenamiento, ya que según lo reportado previamente (Méndez, 2020; Ochoa, *et al.*, 2018), el gen *Solyc11g011300* se expresa durante la madurez en diversos frutos, las premisas de esta tesis y los hallazgos mas relevantes en la Figura 5.

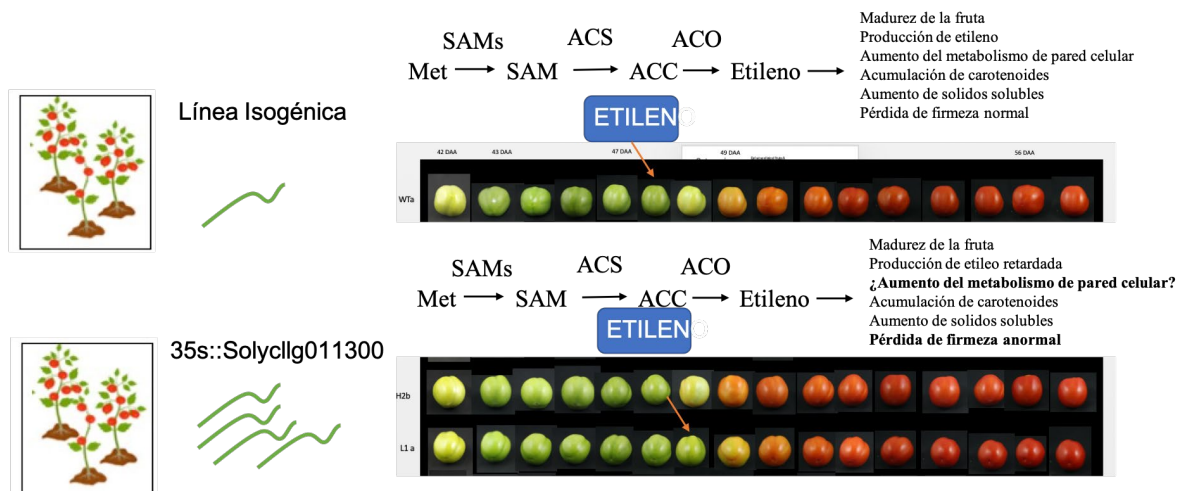


Figura 5. Resumen gráfico. Comportamiento de la línea isogénica vs comportamiento de los frutos transgénicos 35s::*Solyclg011300*. Algunas de las preguntas que impulsan este análisis son: ¿Existe alguna alteración en los genes relacionados con la madurez?, ¿Qué cambios ocasionó la sobre-expresión del gen RGL en los genes que controlan la hormona etileno?

3. HIPÓTESIS

La sobre-expresión del gen *Solyc11g011300* ocasiona la desregulación de genes relacionados la biosíntesis de la hormona etileno y retrasa el proceso de maduración en frutos de tomate *CaMV35s::Solyc11g011300*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Determinar el efecto de la sobre-expresión del gen *Solyc11g011300* en la biosíntesis de etileno durante la post-cosecha del fruto.

4.2. Objetivos Específicos

1. Caracterizar la fisiología y la calidad química de los frutos transgénicos durante post-cosecha.
2. Analizar el perfil transcripcional de genes implicados en la biosíntesis y respuesta de etileno.
3. Analizar *in silico* los promotores de los genes importantes para el ensamble y deposición de cutícula.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material Vegetal

El desarrollo del experimento se llevó a cabo en el invernadero del Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular de Plantas, del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., localizado en la ciudad de Hermosillo Sonora, México, con prácticas estándar de cultivo. Se germinaron semillas de tomate cultivar Ohio 4245 bajo condiciones de invernadero, con riegos semanales de solución Hoagland y aplicaciones de nitrato de calcio 0.5 mM cada 15 días. Las muestras fueron frutos de la línea isogénica, dos líneas transgénicas homocigotas con el constructo CaMV35s::*Solyc11g011300* denominadas como L1 y H2, además de un control positivo CaMV35s::*GUS*. Para la toma de muestra, se marcaron flores totalmente abiertas y se tomaron muestras de acuerdo a los estados de maduración reportados por Osorio *et al.*, (2012). Las muestras se denominaron como: 39 DAA/Verde maduro, 42 DAA/breaker, 49 DAA/Breaker + 7 días y 56 DAA/Breaker + 15 días. Todos los análisis fisiológicos y moleculares se realizaron con tres replicas biológicas, cada replica biológica corresponde a tres frutos provenientes de distintas plantas.

5.2. Cuantificación de Etileno y Tasa de Respiración Mediante Producción de CO₂

Para medir la producción de etileno en los frutos y la velocidad de respiración, se cosecharon los frutos un día antes del muestreo, y se realizó la cuantificación de etileno y CO₂ mediante cromatógrafo de gases con detector de flama y conductividad térmica, utilizando nitrógeno como gas acarreador siguiendo la metodología reportada por Ojeda-Contreras *et al.*, (2008). La incubación de los frutos se realizó a una temperatura de 25 °C durante un periodo de 30 minutos en frascos de plástico con un espacio de cabeza de 0.307 L utilizando una septa adaptada de silicón. Para la muestra se utilizó una jeringa de un volumen de 1 ml, volumen utilizado para la inyección de las muestras. Para los datos de velocidad de respiración y producción de etileno se utilizaron

tres replicas biológicas, cada replica biológica consta de un fruto la cual se midió por triplicado, generando un total de nueve datos.

5.3. Análisis Fisicoquímicos y Manejo de los Datos

Los datos de sólidos solubles ($^{\circ}\text{Bx}$) fueron obtenidos con ayuda de un refractómetro digital, Atago 3810, utilizando como muestra 300 μl de jugo de pericarpio de tomate de cada uno de los tiempos analizados, el refractometro fue enjuagado con agua destilada y secado entre cada medición.

Los datos de acidez titulable y potencial de hidrógeno, se obtuvieron con ayuda con un titulador automático. La muestra se preparó macerando 30 g de pericarpio de tomate de cada una de las muestras.

Los datos obtenidos de la determinación de las variables fisicoquímicas como sólidos solubles totales ($^{\circ}\text{Bx}$), porcentaje de acidez titulable, potencial de hidrógeno y pérdida de peso, fueron obtenidos a partir de cuatro replicas biológicas, cada replica biológica estaba formada por tres frutos, cada uno de los frutos se consideró como una replica técnica dentro de la muestra biológica.

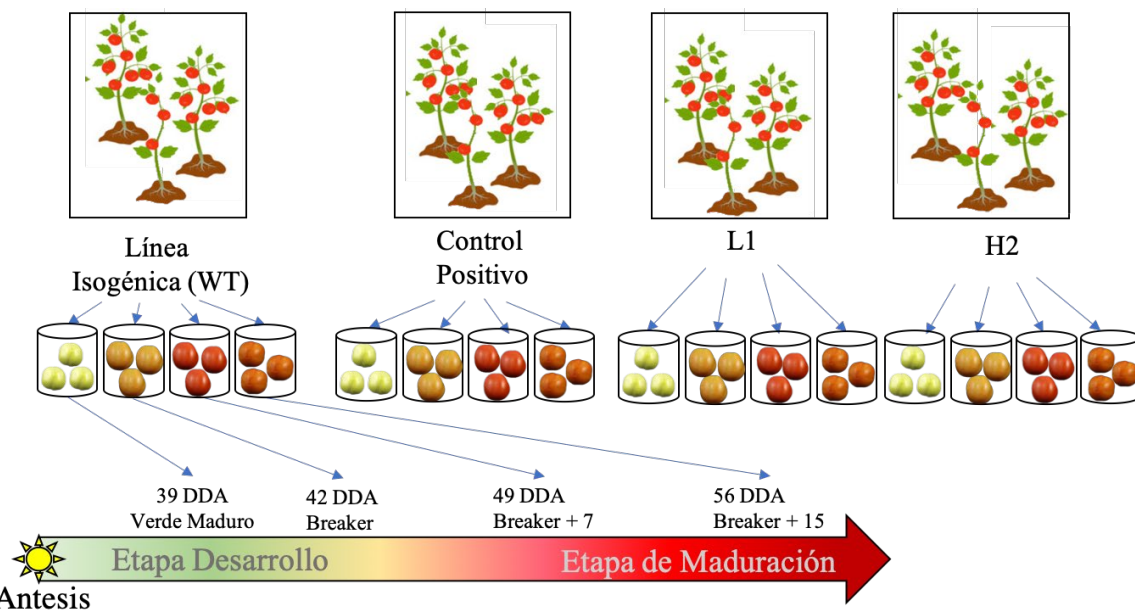


Figura 6. Diagrama de la toma de muestra para el análisis de expresión de genes. DDA: días después de antesis. wt: tipo silvestre o línea isogénica. L1 y H2 líneas transgénicas

5.4. Firmeza

Para la medición de la firmeza se utilizó un penetrómetro manual modelo Chatillon, con ayuda de un punzon de diámetro 8 mm. Los datos de firmeza fueron obtenidos a partir de cuatro replicas biológicas, cosechados durante cada tiempo de muestreo de forma independiente, ejemplo: en el tiempo 39 DDA se cosecharon cuatro frutos de la línea isogénica, cuatro frutos del control positivo y cuatro frutos de cada una de las dos líneas transgénicas. Cada fruto fue perforado en la zona ecuatorial (sección del pericarpio entre el pedúnculo y el pedicelo) una sola vez por la misma persona con un penetrometro manual obteniendo cuatro datos por cada tiempo. En análisis de los datos fue mediante un análisis de medias por Tukey-Kramer con el software excel 2010.

5.5. Genes Analizados por RT-qPCR

Se cuantificó la expresión de los genes relacionados con biosíntesis y respuesta de etileno (*Solyc05g010420*, *Solyc01g095080*, *Solyc05g050010*, *Solyc07g049530*, *Solyc03g111720* y *Solyc09g089580*).

5.6. Análisis de Promotor en Genes de Cutícula

Se obtuvieron 1000 pb de la parte 5' a partir del codón de inicio de la traducción (ATG) del marco abierto de lectura anotado en SolGenomicsNetwork para cada uno de los genes: delta amirin sintasa o TTS2 (*Solyc12g006520*), acil transferasa o CUS1 (*Solyc11g006250*), ácido graso de cadena larga CoA sintasa o LACS1 (*Solyc01g07924*), aciltransferasa-4-glicerol-3-fosfato GPAT4 (*Solyc01g094700*), β -cetoacil-CoA sintasa o CER6 (*Solyc02g085870*) y cutin deficient 3 o CD3 (*Solyc08g081220*). La secuencia de nucleótidos se guardó en fasta y se analizó con la base de datos PlantPan 2.0, sobre la matriz de factores de transcripción, el resultado fue filtrado por Score tomando solo en consideración aquellos con un score <0.99 .

5.7. Extracción de ARN, Síntesis de ADN Complementario y Expresión Génica

La extracción de ARN total se realizó a partir de pericarpio del fruto por cada tiempo de muestreo, y se realizó con el método de borato caliente (Wilkins & Smart, 1994). El ARN se trató con ADNasa RQ1 libre de ARNasas para eliminar trazas de ADN genómico. La síntesis de la cadena complementaria se realizó con retro-transcriptasa de cuarta generación (SS IV Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del proveedor utilizando 1000 µg de ARN limpio para la reacción de retro-transcripción. La expresión de genes se realizó en un equipo QuantStudio 5 (Applied-Biosystem) con el kit comercial Hotstart SYBR green affimetrix máster mix. Para la reacción de PCR, se utilizó un volumen de 10 µl de máster mix y 500 nM de ambos cebadores. El templado se añadió a una concentración de 20 ng totales diluidos en 5 µl y se utilizó agua para llevar la reacción a un volumen final de 20 µl. Las condiciones de PCR fueron desnaturalización inicial 2 min a 95 °C, y 45 ciclos de: 15 seg 95 °C, 30 seg a 55 °C y 30 seg 72 °C. El método para obtener los datos de expresión fue el reportado por Schmittgen & Livak, (2008)

5.8. Vida Post-cosecha y Pérdida de Peso

Para realizar el análisis de vida post-cosecha, se cosecharon 8 tomates de cada una de las líneas analizadas en estado 42 DAA/Br y se dejaron madurar en una cámara a 25 °C con una humedad relativa de 75%. Se documentó la apariencia física de los frutos y se registró el peso de los frutos todos los días después del corte. La proporción de la pérdida de peso en porcentaje fue transformada en ArcSen para su análisis como se describe en la sección 6.9.

5.9. Diseño de experimentos y Análisis Estadístico de los datos

Los datos obtenidos de firmeza, sólidos solubles, porcentaje de acidez titulable, potencial de

hidrógeno, etileno y CO₂ se analizaron mediante un diseño completamente al azar. Se realizaron pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza y los datos fueron analizados bajo un diseño completamente al azar, posteriormente se realizó un ANOVA de 1 vía y en dado caso de existir diferencias significativas entre las medias se realizó la prueba de rangos múltiples de Tukey-Kramer con un nivel de probabilidad del 95 % ($p < 0.05$) utilizando el programa NCSS7.

Para el análisis de expresión génica, los datos fueron normalizados con el gen de referencia actina y calibrados con la determinación de la expresión de genes de la línea isogénica obteniendo un total de nueve datos por cada tiempo como se esquematiza en la Figura 6. Se analizaron los datos bajo un diseño completamente al azar y se les realizó pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza. Para encontrar diferencias entre grupos, se realizó un ANOVA de 1 vía (95% de confianza) y para encontrar diferencias entre grupos se utilizó la prueba de comparación de medias de Tukey-Kramer con un alfa de 0.05 utilizando el programa NCSS 7. La representación de los datos mediante el mapa de calor fue realizado con la herramienta R studio.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la finalidad de conocer los posibles efectos de la transformación del fruto de tomate sobre el fenotipo de los frutos transgénicos y su comportamiento durante la madurez y senescencia, se realizaron análisis fisiológicos y de calidad fisicoquímica.

6.1. Efecto de la sobre-expresión en la respuesta fisiológica y calidad físico-química

En la Figura 7, se muestran los cambios en pérdida de peso fresco durante el desarrollo y maduración de los frutos de tomate analizados. La pérdida de peso diaria indica que en todos los casos se mantuvo una tendencia similar con respecto a la línea isogénica, ya que en un lapso de 14 días de análisis a 25 °C con una humedad controlada de 75%, el porcentaje de pérdida de peso promedio se mantuvo entre el 6% (C+) y el 12% (L1). Es importante destacar que desde el día 55 DDA en adelante, la línea transgénica H2 perdió menos peso que el resto de los grupos analizados, pero esa porción perdida no es significativa.

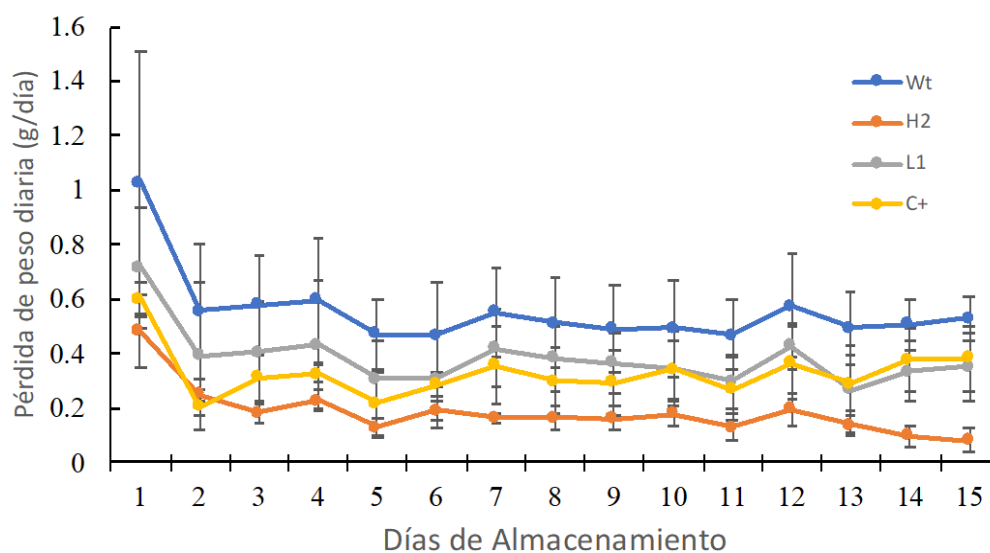


Figura 7. Pérdida de peso fresco diaria durante 14 días de almacenamiento. Condiciones: 25 °C con una humedad relativa de 75% (n=3).

En la Figura 8A se muestran los resultados de la determinación de pH durante el desarrollo y maduración del fruto de tomate. Se encontró que la línea isogénica y el C+ además de los frutos de ambas líneas transgénicas mantuvieron la misma tendencia, mostrando una disminución en el pH de 5.25 en el día 39 DDA a un pH de 4.5 en el día 56 DDA. No se encontraron diferencias significativas entre las distintas líneas analizadas. En la Figura 8 B, los resultados del análisis de sólidos solubles muestran una tendencia que va en aumento y es similar en las líneas analizadas desde 39 DAA hasta 56 DDA, por lo que no se observó diferencias significativas entre ellas. En la Figura 8 C, se muestran los niveles del porcentaje de acidez titulable, los cuales siguen una tendencia al alza tanto en los frutos transgénicos como en la línea isogénica.

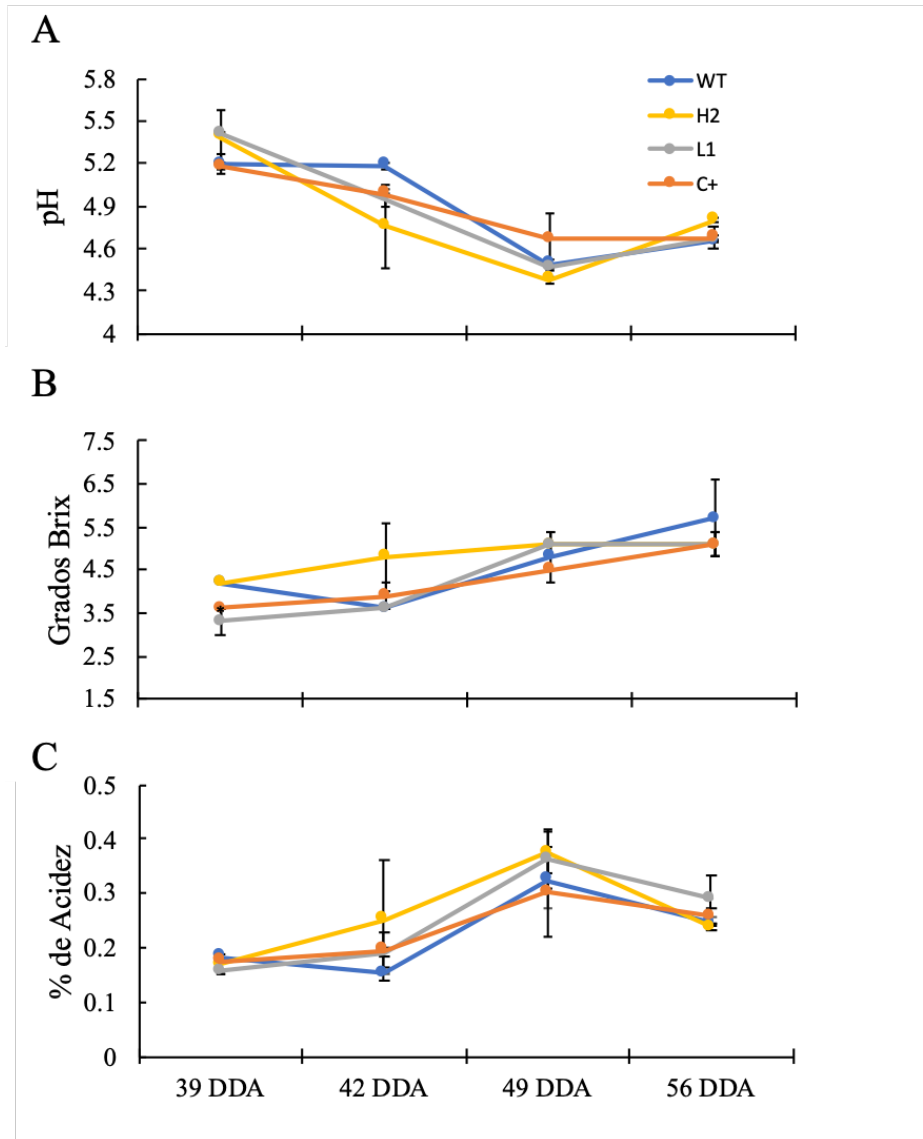


Figura 8. Evaluaciones fisicoquímicas durante la madurez. A) Potencial de hidrógeno, B) Sólidos solubles y C) Porcentaje de acidez titulable de los frutos de la línea isogénica (WT), las líneas transgénicas H2 y L1 y control positivo (C+).

DDA: días después de antesis. No se encontraron diferencias significativas entre los frutos durante cada tiempo analizado ($p > 0.05$) $n=4$.

Tanto el pH, acidez titulable y los sólidos solubles siguieron la misma tendencia tanto en los frutos control como en el transgénico. De acuerdo con esto, Moneruzzaman, *et al.*, (2008) reportan un pH bajo (4.27) en las etapa de rojo maduro, lo cual es similar a lo que fue encontrado en nuestro trabajo ya que el nivel más bajo de pH se encuentra en las etapas de madurez 49 DAA y 56 DAA. El porcentaje de acidez fue en aumento en todos los tiempos analizados, presentando el mayor cambio

durante la etapa de 42 DAA y 49 DAA. Los valores encontrados en nuestro trabajo coinciden con lo que se reportó en el trabajo de Alós, *et al.*, (2019) y Moneruzzaman, *et al.*, (2008). En estos trabajos, se encontraron valores que van de 4.1% a 3.6% en las etapas de madurez, similares a los registrados en nuestro experimento, ya que durante en 49 DAA se registraron valores de 3.2% a 3.8% (Figura 8C). Por último, el parámetro de grados brix o sólidos solubles totales mantuvo la misma tendencia, sin embargo los valores obtenidos en las dos líneas transgénicas fueron iguales (5.1) durante los 49 y 56 DAA. Esto indica una tendencia de incrementar el contenido de azúcares reductores dentro del fruto, lo cual es similar a lo reportado en frutos de tomate *Lycopersicon esculentum* Mill (Dalal, *et al.*, 1965).

6.2. Post-cosecha en los Frutos Transgénicos: Cuantificación de Producción de Etileno y la Tasa de Respiración

La apreciación visual del desarrollo del fruto hasta su madurez de consumo y senescencia, muestra diferencias con la línea isogénica. Tomando como referencia el día 49 DAA, es evidente que las líneas transgénicas H2 y L1 alargan su periodo de transición (Figura 9), esto quiere decir difieren en el tiempo de pasar de la etapa verde maduro a completamente maduro, aunado a lo anterior es importante reasaltar el nivel de firmeza de la línea transgénica H2 el cual es superior que el resto de los frutos analizados (Figura 11).

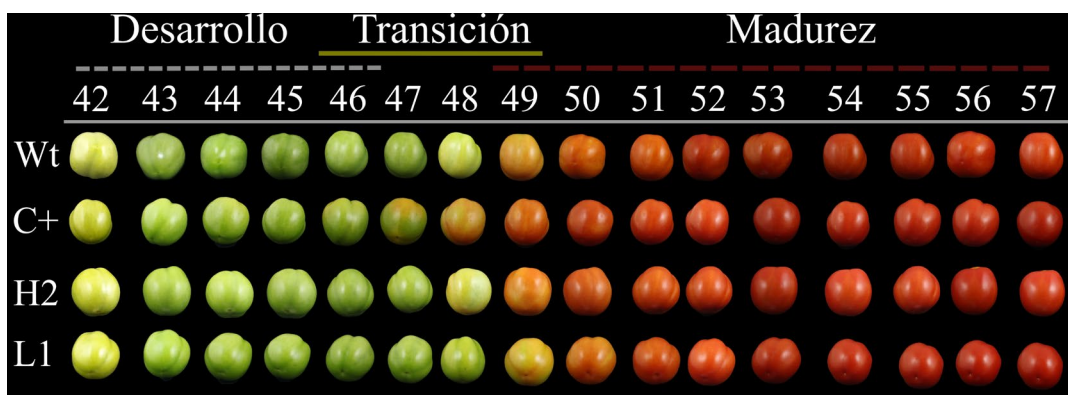


Figura 9. Cambios en color durante el desarrollo y maduración de los frutos de tomate. Wt: línea isogénica, C+: control positivo, H2 y L1 son líneas transgénicas. Los números indican días después de antesis.

En la Figura 10, se muestran los cambios en la producción de etileno y tasa de respiración de los frutos de tomate H2, L1, C+ y línea isogénica durante el desarrollo y maduración. El pico climatérico en los frutos de la línea isogénica ocurrió a los 48 DAA igual que en el C+. Por otro lado, los frutos de la línea H2 tienen el climaterio a los 49 DAA, mientras que la línea L1 tiene un climaterio a los 51 DAA. En la producción de etileno, el punto máximo de producción fue en el día 50 DAA en la línea isogénica, mientras que las líneas transformadas H2 y L1, tienen su nivel máximo de producción de etileno en los días 51 y 52 DAA, respectivamente.

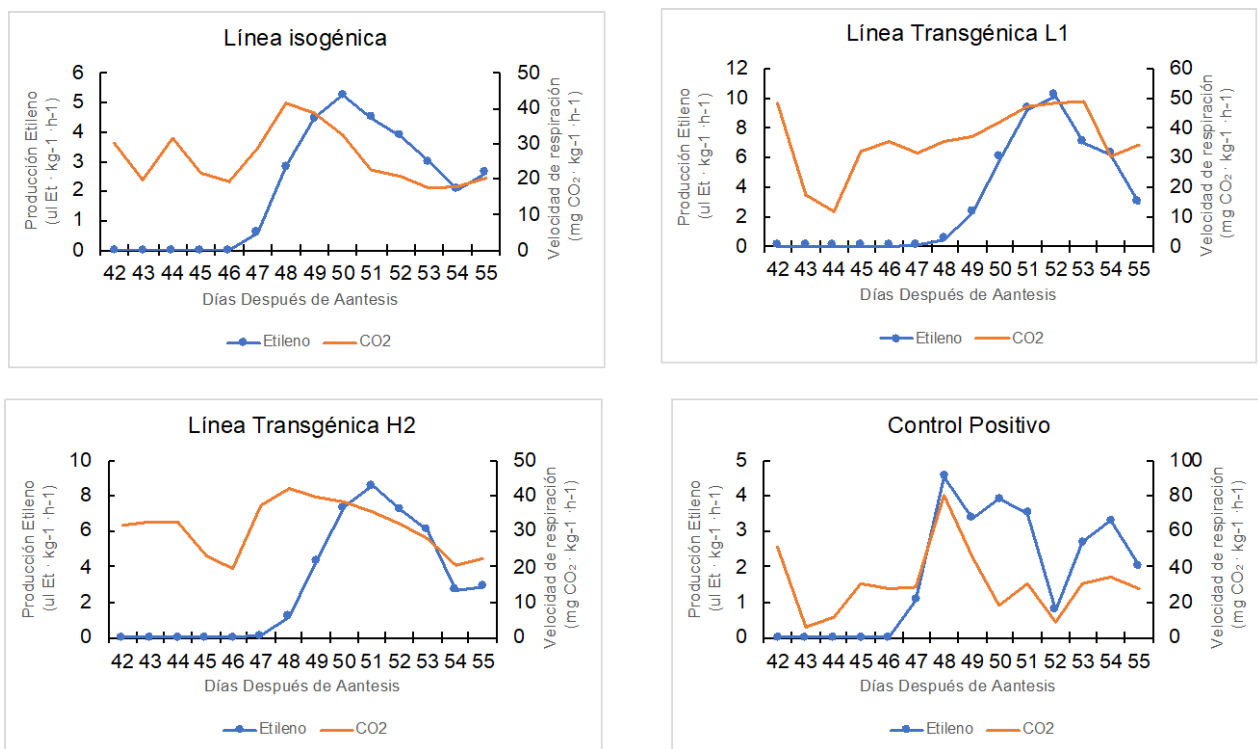


Figura 10. Cuantificación de la velocidad de respiración y producción de etileno en línea isogénica y transgénicos. C+: control positivo, H2 y L1: son transgénicos. Cada punto en la gráfica corresponde promedio de medición 3 frutos individuales (n=3). Las líneas verticales indican la desviación estándar.

En la Figura 11, se muestran los análisis de firmeza realizados en frutos de tomate silvestre y transformados con diferentes días después de antesis. El estado de desarrollo de 39 DDA corresponde con la etapa final del desarrollo del fruto, el tiempo de 42 DDA que corresponde al breaker, el cual es un punto intermedio entre el desarrollo y la madurez comercial. Finalmente, el

tiempo de 49, 56 y 62 DDA corresponden a las etapas de maduración y senescencia. Durante el tiempo de 39 DDA, todos los frutos mantuvieron los mismos niveles de firmeza y este comportamiento se mantuvo hasta los 49 DAA donde H2 mantuvo niveles mas altos de firmeza, mientras que los tomates Wt, L1 y C+ mantuvieron la misma tendencias de pérdida de firmeza. Finalmente, durante la los tiempos de 56 a 62 DDA la línea transgénica H2 fue el que presentó una firmeza mayor comparado con los otro frutos, lo que significa que la velocidad de pérdida de firmeza en este transgénico fue menor.

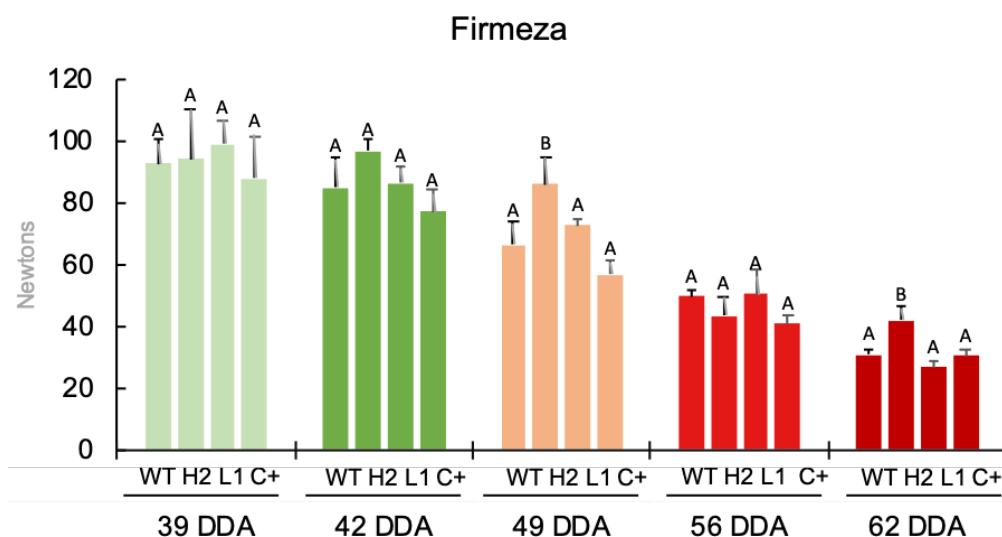


Figura 11. Cambios en la firmeza durante el desarrollo y madurez de los frutos. WT: wild type o línea isogénica, H2 y L1: líneas transgénicas, C+: control positivo, DDA: días después de antes. Las líneas verticales en las barras corresponden a la desviación estándar. Diferentes letras en las barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

El papel central del etileno como regulador del desarrollo, maduración y senescencia de los frutos han sido extensamente revisado (Alexander, *et al.*, 2007; Chaves, *et al.*, 2006). En frutos climatéricos, comunmente la producción abrupta de etileno se produce después del climaterio, esto quiere decir, después de que los frutos presentaron su máxima de producción de CO₂. El pico climatérico puede observarse en la gráfica de línea isogénica (Figura 10) durante los días 48 y 49 DAA. En el experimento, fue posible identificar el climaterio en el día 48 DAA para la línea isogénica. Colombié *et al.*, (2017) reportan el pico climaterico a los 40 días después de antes en tomate *Solanum lycopersicum* L. cv 'Moneymaker' mientras que Adaskaveg, *et al.*, (2021)

determina que los efectos ocasionados después del climaterio en *Solanum lycopersicum* L ‘Aïlsa Craig’ se presentan entre los 37 y los 45 DDA. En nuestro experimento se utilizó *Solanum lycopersicum* L cv ‘Ohio 8245’ y se encontró el climaterio a los 48 DAA en la línea isogénica y en el control positivo (Figura 10). Por otro lado, la línea transgénica H2 presentó el climaterio en el día 49 DAA y la línea L1 en 51 DAA. Es importante resaltar que el pico máximo de producción de etileno se observó después del pico climaterico en la línea isogénica, excepto en ambas líneas transgénicas. En el caso de las líneas transgénicas H2 y L1 se observó que el pico máximo de producción de etileno fue en 51 y 52 DAA, respectivamente. Es interesante mencionar que la producción de etileno de las líneas transgénicas fue dos veces superior a la producción de etileno que se registró en la línea isogénica y en el control positivo, siendo los valores más altos en la línea transgénica L1 a los 52 DAA (Figura 10). En este sentido, este es el primer reporte de frutos transgénicos con alteraciones en genes de pared celular que muestran alteraciones en la producción de etileno.

7.3 Análisis de Expresión Génica en Frutos Transgénicos

Los resultados de los cambios de expresión en los genes que participan en la biosíntesis de etileno (ACO1: *Solyc07g049530*, ACS2: *Solyc01g095080*, SAM: *Solyc05g010420* y ACS4: *Solyc05g050010*), así como en respuesta de etileno (E4: *Solyc03g111720* y E8: *Solyc09g089580*) es representada en las Figuras 11, 12, 13 y 14 para los frutos del control positivo y las líneas transgénicas H2 y L1.

El gen SAM (*Solyc05g010420*) muestra mayor expresión durante 42 DDA y 49 DDA en el control positivo (Figura 13 y 14). Mientras que en la línea transgénica H2, el gen SAM muestra un aumento en expresión desde los 39 DDA (Figura 12) hasta el estado de desarrollo de 49 DDA (Figura 14), mostrando un aumento de 2.11 veces. Posteriormente muestra una reducción en la expresión durante el estado de desarrollo de 56 DDA (Figura 15). Por otro lado, en la línea transgénica L1, SAM se encuentra inducido en todos los tiempos analizados, mostrando un aumento de casi dos veces su expresión (1.92 veces) del 39 al 49 DDA (Figuras 12 y 14 respectivamente). Posteriormente, la expresión de SAM a los 56 DDA (Figura 15) muestra una

reducción 3 veces menor relativo al tiempo 49 DAA.

La biosíntesis de ACC (1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico) se realiza por la enzima ACS. Dentro del estado de transición del fruto de tomate, de verde a maduro, los genes ACS2 (*Solyc01g095080*) y ACS4 (*Solyc05g050010*) se expresan en patrones diferentes, especialmente durante las etapas finales de la maduración. ACS2 (*Solyc01g095080*) y ACS4 (*Solyc05g050010*) codifican para genes independientes de 1 amino-ciclopropano 1-ácido carboxílico sintetasa. En el presente trabajo se encontró que los valores de expresión en el control positivo fueron altos para el gen ACS2 en 39 DAA (Figura 12), pero posteriormente no se muestra expresión en los tiempos subsecuentes. El gen ACS4 no presentó niveles de expresión durante todo el estudio ya que su expresión fue similar a la línea isogénica. En la línea transgénica H2 el comportamiento de ACS2 y ACS4 fue similar, ambos muestran la misma tendencia de expresión alta expresión (valores mayor a 2) en 39 DAA (Figura 12), represión en 42 DAA (Figura 13), un aumento de expresión pequeño en 49 DAA (Figura 14). Finalmente, en el tiempo 56 DAA, ACS2 no muestra actividad mientras que ACS4 se encuentra reprimido (Figura 15). En la línea transgénica L1, el gen ACS4 muestra un ligero aumento en expresión en 49 DAA (Figura 14) y diferentes niveles de represión de la actividad en 39, 42 y 56 DAA (Figura 12, 13 y 15). El gen ACS2 muestra una alta expresión en 39 DAA y valores de baja expresión en 49 y 56 DAA, mientras que en 42 DAA se encuentra completamente reprimido.

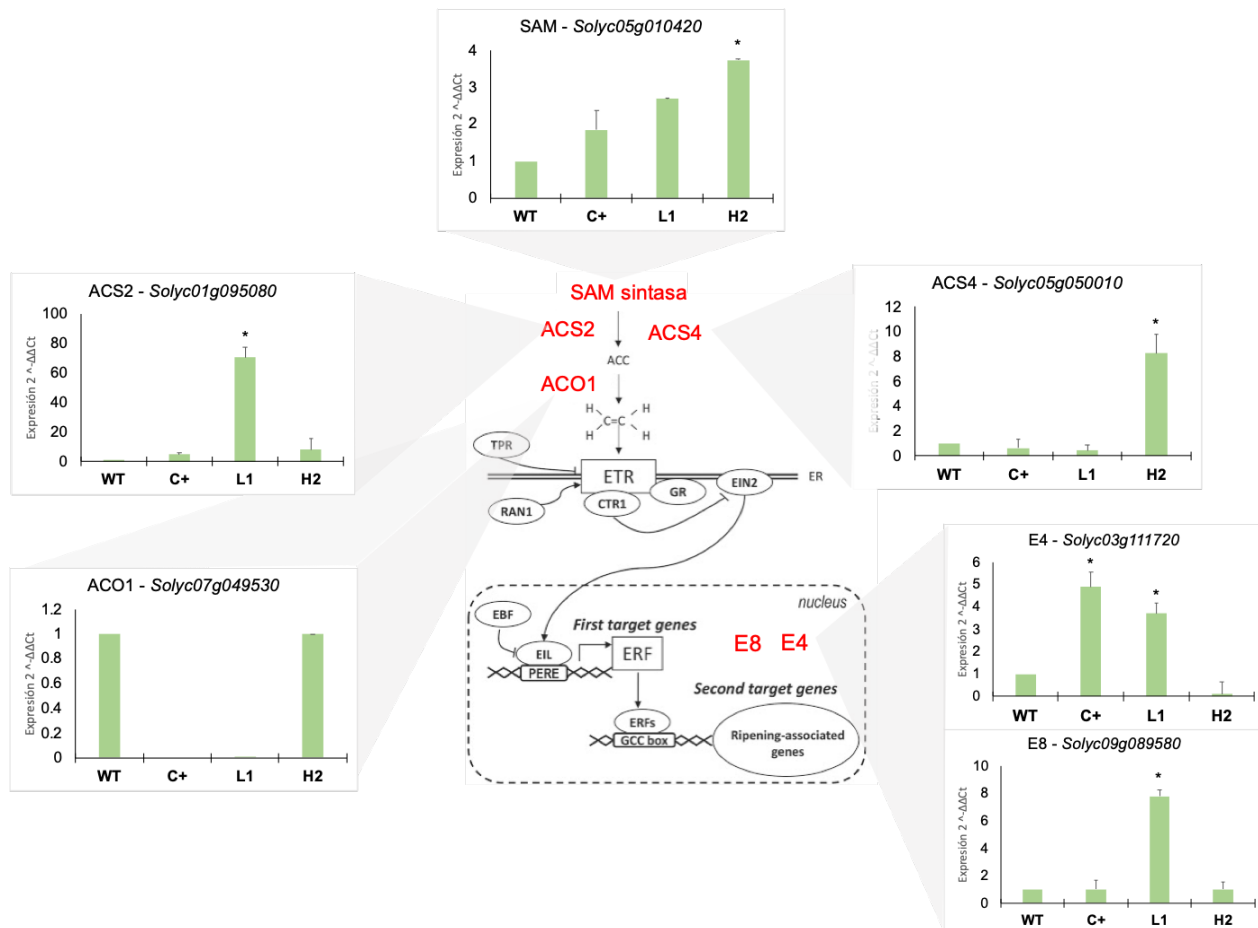


Figura 12. Gráficos de expresión génica en el tiempo 39 DAA. Los datos de expresión se calcularon mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen & Livak, 2008) con un total de 4 réplicas biológicas. Los datos de expresión fueron normalizados con el gen de actina como gen de referencia y calibrados con los valores de expresión encontrados en la línea isogénica.

El último paso para la síntesis de etileno es catalizado por la enzima ACO, la cual cataliza la conversión de ACC a etileno mediante una reacción de oxidación. En el presente trabajo se observó que el gen de ACO1 (*Solyc07g049530*), en el C+ , se muestra reprimido en 39 y 42 DAA (Figura 12 y 13), manteniéndose con valores de expresión igual a los de la línea isogénica a los 49 DAA y expresión nula en 56 DAA (Figura 15). En la línea transgénica H2, la expresión del gen ACO1, no muestra valores de expresión en el día 39 DDA (Figura 12) y se muestra reprimido el resto de los tiempos analizados. En la línea transgénica L1, el gen se encuentra reprimido desde el día 39 (Figura 12) hasta el 49 DAA (Figura 14) pero su transcripción se incrementa ligeramente en el día 56 DDA (Figura 15).

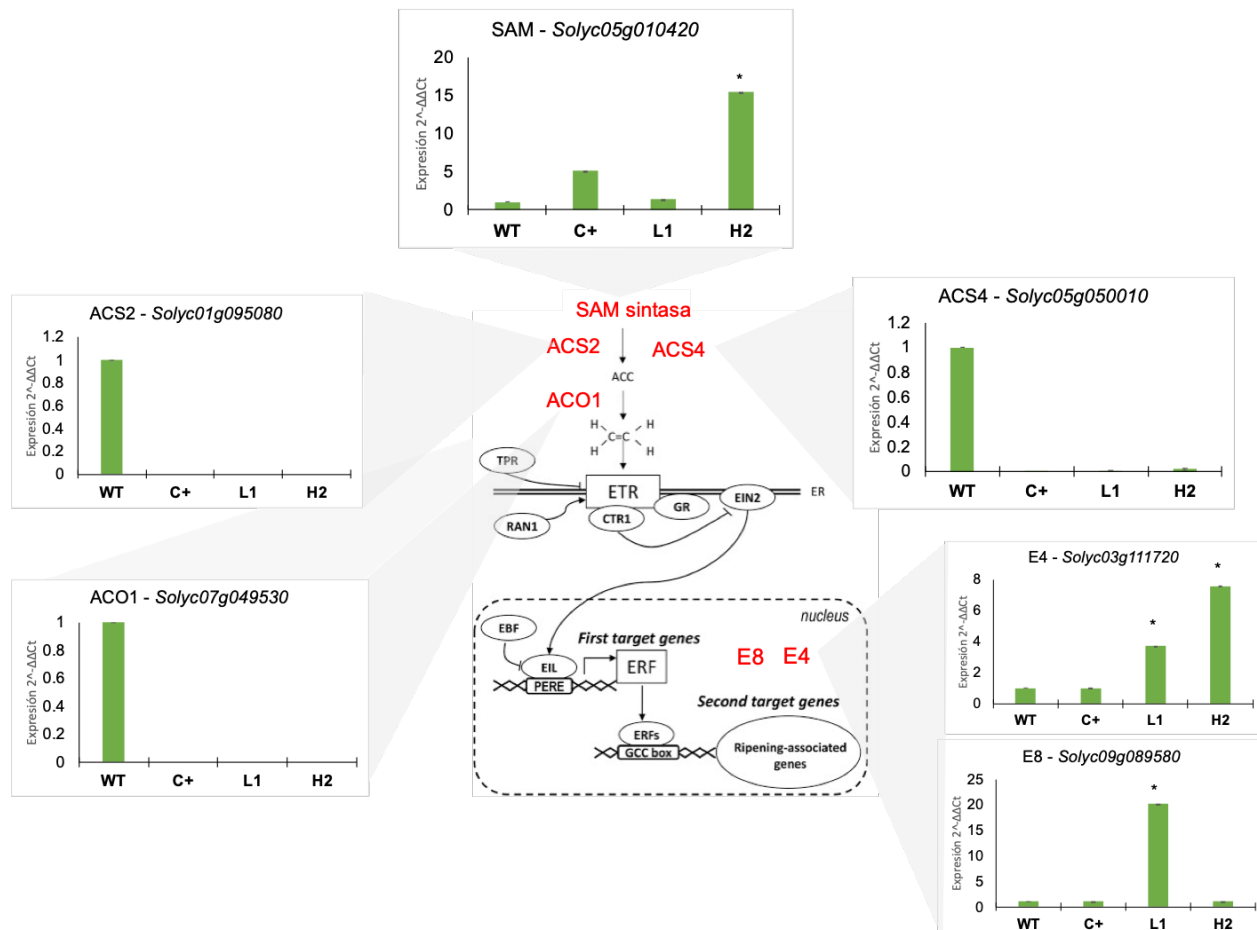


Figura 13. Gráficos de expresión génica en el tiempo 42 DAA. Los datos de expresión se calcularon mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen & Livak, 2008) con un total de 4 réplicas biológicas. Los datos de expresión fueron normalizados con el gen de actina como gen de referencia y calibrados con los valores de expresión encontrados en la línea isogénica.

Existen genes cuya actividad transcripcional es inducida por etileno, como los genes de respuesta E4 (*Solyc03g111720*), y E8 (*Solyc09g089580*). En el control positivo el gen E4 mostró alta expresión en 39DAA (Figura 12) y no observó expresión en los otros estados de desarrollo. En el caso del gen E8, no se observó expresión en ninguno de los estados de desarrollo analizados. En la línea transgénica H2, el gen E4 muestra diferentes niveles de expresión: en 42 DAA (Figura 13) niveles debajo de las cero unidades de expresión y en 49 DAA (Figura 14) valores mayores a seis unidades de expresión, pero se encuentra reprimido en 39 y 56 DAA como se observa en la Figura 12 y 15 respectivamente. El gen E8 no muestra expresión en 39 y 42 DAA pero muestra una alta expresión en 49 DAA (Figura 14) y en 56 DAA se encuentra reprimido. En la línea transgénica L1 el gen E4 tiene un nivel de expresión bajo durante los tiempos de desarrollo que son 39 DDA y 42

DDA pero incrementa su expresión más de dos veces (2.3 veces más relativo al 39 DDA) en la etapa de desarrollo de 49 DDA (Figura 14). Finalmente, en la etapa de 56 DAA el gen E4 muestra valores similares en expresión a los que se registraron en 39 y 42 DAA valores mayor a las tres unidades de expresión. En cuanto al gen E8, su expresión muestra niveles de 4 y 5 unidades de expresión en 39 y 49 DDA, respectivamente y un incremento de expresión en el día 42 DDA de mas de 4 veces relativo al día 39 DAA. Finalmente, en la etapa de desarrollo de 56 DAA, muestra una ligera represión (valores menor a 1) en la expresión (Figura 15).

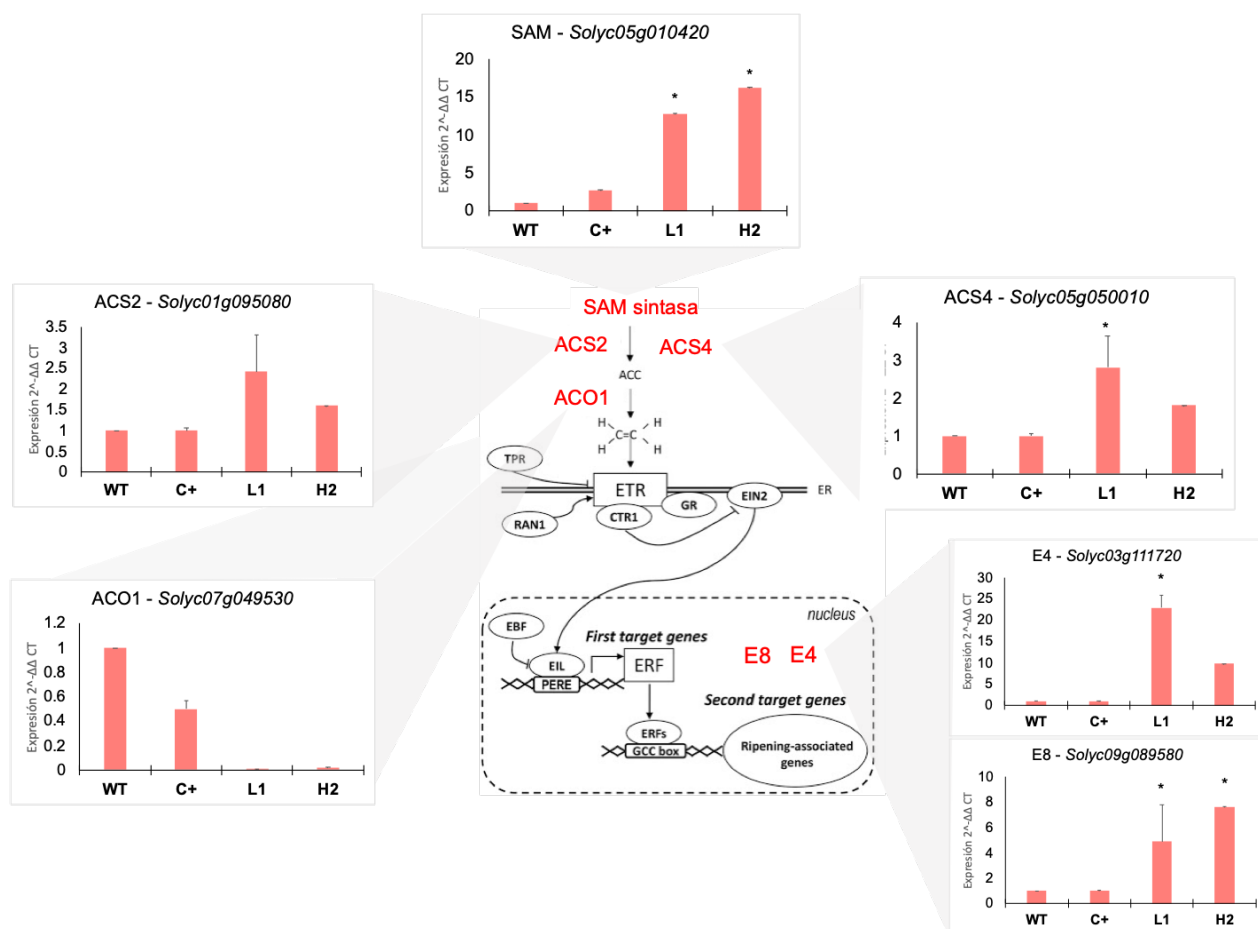


Figura 14. Gráficos de expresión génica en el tiempo 49 DAA. Los datos de expresión se calcularon mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen & Livak, 2008) con un total de 4 réplicas biológicas. Los datos de expresión fueron normalizados con el gen de actina como gen de referencia y calibrados con los valores de expresión encontrados en la línea isogénica.

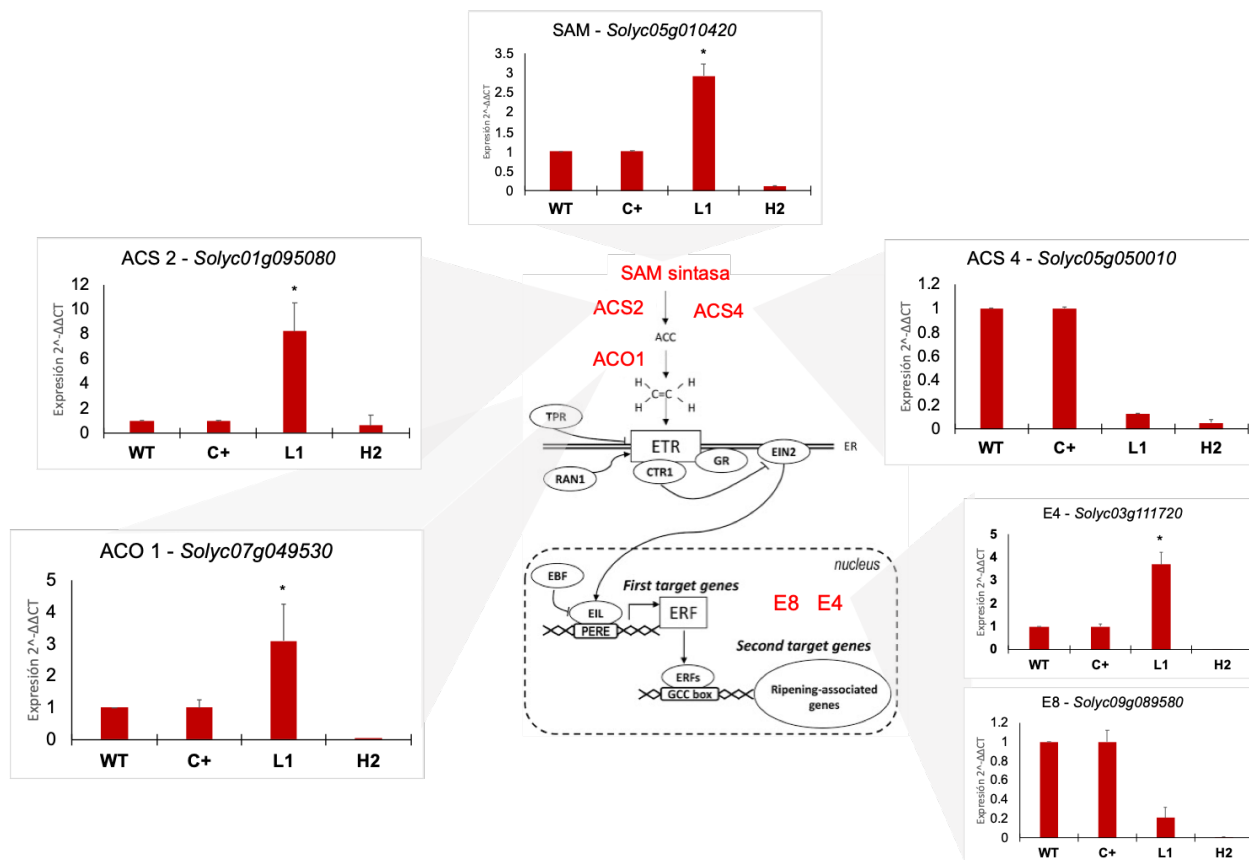


Figura 15. Graficos de expresión génica en el tiempo 56 DAA. Los datos de expresión se calcularon mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen & Livak, 2008) con un total de 4 réplicas biológicas. Los datos de expresión fueron normalizados con el gen de actina como gen de referencia y calibrados con los valores de expresión encontrados en la línea isogénica.

Observando los datos de expresión de los genes de biosíntesis de etileno, no se observan diferencias claras el perfil transcripcional, tanto en los frutos transgénicos como ambos controles (línea isogénica y control positivo) con excepción del gen ACS2 el cual muestra una mayor acumulación de transcritos en los frutos transgénicos con respecto a los frutos control. De acuerdo a esto los datos de expresión generados no permiten explicar adecuadamente la razón por la cual existe una mayor producción de etileno en los frutos transgénicos, pero si no permiten sugerir nuevas hipótesis.

La modificación de la pared celular mediante mutaciones dirigidas a un gen de PL (*Solyc03g111690*) mediante ARNi fue capaz de retardar los efectos de la maduración en los frutos (Yang *et al.*, 2017). En ese trabajo se encontró un retraso en la pérdida de firmeza en tomate hasta 45 días durante el almacenamiento, similar a lo reportado por Ochoa, *et al.*, (2018). Por otro lado

Yang *et al.*, (2017) demostró que el silenciamiento temporal del gen PL (*Solyc03g111690*) alteró la vida de anaquel de los frutos de tomate retardando los efectos de la maduración. Mientras que Wang *et al.*, (2019) realizó el silenciamiento permanente dirigido por CRISPR-Cas9 sobre un gen de PL (*Solyc03g111690*) donde encontró que al afectar la reprimir la transcripción de la PL(*Solyc03g111690*) se podría alterar la firmeza del fruto y prolongar vida de anaquel. En el trabajo mencionado anteriormente, es posible observar como el silenciamiento de una PL (*Solyc03g111690*) altera significativamente la expresión de otras PL: *Solyc05g055510*, *Solyc02g093580* y *Solyc06g083580* (material suplementario de Wang *et al.*, 2019 Figura S5), pero no se reporta la evaluación de otros genes implicados en el fenómeno de la maduración como la ruta del etileno, lo cual nos deja un espacio para proponer nuevas hipótesis basado en el fenotipo observado. En el presente trabajo se demostró que existe un retraso en el desarrollo de los síntomas de la maduración en frutos transgénicos que sobre-expresan *35s::Solyc11g011300* (líneas L1 y H2) además de la prolongación de la vida de anaquel (Ochoa *et al.*, 2018). En este experimento, se ha encontrado que los frutos transgénicos mostraron una producción mayor de la hormona etileno, aunque retrasada con respecto a la línea isogénica, lo que ocasiona un incremento en la vida post-cosecha. La función de la enzima RGL es la degradación del polímero RG-I, sin embargo en el caso de las plantas transgénicas analizadas en este trabajo se tiene documentada una reducción en la expresión del gen *Solyc11g011300* aun y cuando este se encontraba bajo el control transcripcional del promotor *35s* (Ochoa *et al.*, 2018). Este fenómeno de regulación “co-silenciamiento” ya ha sido reportado anteriormente y sus alcances dentro de la regulación de otros genes en sistemas biológicos no es del todo conocido (Smyth, 1997). Por esta razón, es posible sugerir que al ser afectada la descendencia de la planta, debido a las afectaciones sobre los frutos, la planta responde de una forma contundente silenciando el gen *Solyc11g011300* que ya se encontraba en el genoma y el gen *35s::Solyc11g011300* que se encuentra sobre-expresado. Esta respuesta podría traer otro tipo de desregulación, lo cual podría causar los efectos que observamos en los genes de biosíntesis y respuesta a etileno, pero se necesitan hacer más análisis para demostrar esta afirmación. No se tiene una evidencia concreta en frutos de tomate, pero en mutantes de pared celular de plantas de tomate y de *Arabidopsis* existen dos características en las plantas transformadas que son constantes: 1) bajo número de semillas y 2) problemas en órganos reproductivos, flores, tubo polínico, gránulos de polen como se reporta en los frutos transgénicos analizados por Ochoa *et al.*, (2018).

Durante el desarrollo de los frutos, el sistema de biosíntesis de etileno 1 está activo, este sistema no es inducible mediante una aplicación exógena de etileno ya que es regulado por el bloqueo de la expresión del gen ACS, lo que inhibe la biosíntesis de 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (Paul *et al.*, 2011). Mientras que el sistema de biosíntesis de etileno 2 es activado después del climaterio, en el estado de transición de verde maduro a breaker (Figura 9, línea isogénica- etiqueta 49) se ha demostrado que la aplicación exógena de etileno promueve la producción del mismo etileno (Wei, *et al.*, 2021). Ambos sistemas de producción etileno inician su ciclo con la conversión de L-metionina a L-adenosilmetionina, catalizada por la enzima SAM sintasa. En el presente trabajo se muestra que la expresión de SAM, la cual tiene niveles basales a los 39 DAA y en el tiempo 42 DDA y 49 DDA, es inducida en el caso de las plantas control mientras que en las plantas transgénicas muestra menor inducción. Debido a la participación de SAM en la ruta de ciclo de Calvin y en la síntesis de poliaminas, su expresión es necesaria en varios procesos metabólicos (Osorio *et al.*, 2012). Ambas rutas han sido evaluadas durante la maduración de frutos de tomate y asociadas a los cambios de firmeza en frutos de tomate (Nambeesan *et al.*, 2010), por lo que podemos inferir que en el caso de nuestro experimento, la enzima SAM sintasa estaba participando parcialmente en la síntesis de etileno. En el trabajo de Osorio *et al.*, (2012), se dirigió la expresión de SAM de origen fúngico (ySAMdc) mediante el promotor del gen E8 con la finalidad de aumentar la vida útil del fruto y la calidad química. Los investigadores encontraron que los frutos transgénicos pE8::ySAMdc mostraron la expresión de SAM endógena en fruto de tomate hasta las etapas de madurez rosa y rojo-maduro (Osorio *et al.*, 2012). Además, se observó que la acumulación de transcritos ACO fue menor en una de las líneas transgénicas analizadas (Línea HO 579), con estas evidencias podemos inferir que la ruta de biosíntesis de etileno se encuentra regulada por la producción de producto ACC. En contraste, la expresión *in silico* de SAM en el cv 'M82' de la base de datos Expression Atlas se encuentra en magnitudes altas durante todo el desarrollo y madurez-senescencia del fruto (Figura 16). Los resultados documentados en el presente trabajo respecto a la expresión de SAM difieren a lo reportado en la literatura y a la expresión *in silico* lo cual podría deberse al ambiente en el que estaban creciendo las frutas o a la diferencia entre cultivares, como lo reporta Osorio, *et al.*,(2019) en sus análisis con los cv 'M82' y Ailsa Craig, lo que apoya nuestra hipótesis.

Los genes ACS (ACC sintasa) y ACO (1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico oxidasa) son claves en la regulación de etileno dentro del sistema de biosíntesis de etileno dos. Durante el

periodo de transición, que abarca de los 42 DAA a 56 DAA los genes ACS y ACO responden a estímulos como la misma madurez comercial y hormonas como las auxinas inclusive el propio etileno (Abel, *et al.*, 1995). En el presente trabajo, el comportamiento de la expresión del gen ACS2 (*Solyc01g095080*) es el único que muestra mayor actividad en los transgénicos con respecto al fruto control, en especial durante la maduración a los 49 y 56 DAA en la línea transgénica L1. Una compilación de análisis multiómico sobre cultivares de tomate 'Ailsa Craig' y 'M82' (Fernandez *et al.*, 2017b) durante distintos estados de desarrollo y madurez ayuda a tener más referencias de la acumulación de ARNm de todos los genes reportados en este trabajo, además de mutantes de maduración y la caracterización del tomate *dfd*, así como su capacidad para prolongar la firmeza y mantener un control eficiente de la pérdida de agua ya ha sido reportado (Romero & Rose, 2019; Saladié *et al.*, 2007). En el trabajo de Osorio, *et al.*, (2019) los investigadores reportan la expresión del gen ACS4 con tendencia a aumentar desde la etapa denominada como breaker, misma tendencia también se observa en el gen ACS2 en el cv 'Ailsa Craig' y 'M82'. El comportamiento de ACS2 en la etapa de breaker + 2 semanas (equivale a 56 DAA dentro de este trabajo) tiene niveles de expresión iguales a la etapa breaker, sin embargo, este resultado solo se observa en 'Ailsa Craig' y no en 'M82' (Osorio *et al.*, 2019). Esto indica que el comportamiento transcripcional de ACS puede ser diferente entre cultivares. En nuestro trabajo se observó la represión de ambos genes en ambas líneas transgénicas a los 42 DDA. Sin embargo, la tendencia positiva a la acumulación de transcrito fue diferente en el tiempo 56 DDA, ya que la línea transgénica H2 presentó represión de ACS2. H2 presentó valores de firmeza más altos y menor porcentaje de pérdida de agua (Figura 11 y 7) lo que podría ocasionar menor inducción de los genes de respuesta tardía a la presencia de etileno como son los que degradan la pared celular. Finalmente, la expresión del gen ACO1 (*Solyc07g049530*) se ve reprimida durante todo el análisis en la línea transgénica H2, pero no en la línea transgénica L1. Este dato apoya lo mencionado anteriormente, ya que es probable que la síntesis de etileno no estaba ocurriendo activamente en los frutos transgénicos durante los tiempos 39 y 42 DAA (periodo de transición Figura 9) que es donde se esperaba la expresión de los genes del sistema de biosíntesis de etileno (ACS2 y ACS4). También, estos niveles de expresión no justifican la doble producción de la hormona etileno en los frutos.

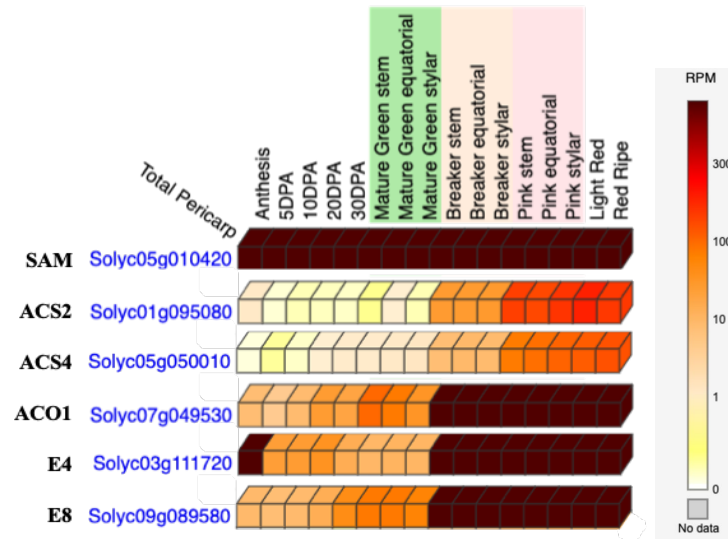


Figura 16. Expresión *in silico* de genes involucrados en biosíntesis y respuesta a etileno en pericarpio de tomate de *Solanum lycopersicum* cv `M82`. Los datos fueron obtenidos con atlas de expresión del sol genomics network. RPM significa lecturas por millón (forma de expresar el nivel expresión genética *in silico*).

Experimentos en tomate verde maduro indican que la expresión de los genes de respuesta a etileno E4 y E8 pueden ser inducidos por etileno exógeno. La expresión de E4 es también inducida en hojas, pero no la expresión de E8, lo cual sugiere que la regulación de etileno es tejido específica (Theologis, *et al.*, 1993; Vandebussche *et al.*, 2012). También se ha documentado que la expresión de E8 es inducida en plantas transgénicas con síntesis de etileno baja, donde los autores concluyen que el etileno es necesario, pero no indispensable para la expresión de E8 en este tejido (Theologis, *et al.*, 1993). En general, en el presente trabajo se observa una mayor expresión en los genes E4 y E8 durante la maduración en los frutos transgénicos con respecto al control, lo cual concuerda con los mayores valores de producción de etileno encontrados en las plantas transgénicas.

7.4 Clusterización de Patrones de Expresión Génica

La agrupación basada en los niveles de expresión genética agrupada en conglomerados por un dendrograma se observa en las imágenes 17, 18 y 19 para el control positivo, H2 y L1 respectivamente. En los mapas de calor correspondiente a los frutos transgénicos H2 y L1 (Figura

18 y 19) podemos observar la formación de dos ramas principales algo opuesto a lo encontrado en el control positivo (Figura 17). En el caso de las dos líneas transgénicas, los genes de biosíntesis de etileno ACO1 y ACS2 se aglomeran en una sola rama dentro del dendograma, quedando ACS4 en el otro extremo del segundo aglomerado. Esta separación dentro del dendograma se debe al patrón de expresión diferente que tienen los dos genes de ACS, y su correlación con la producción abrupta de etileno después de los 42 DAA. Por otro lado, el gen de biosíntesis de etileno SAM y los genes de respuesta a etileno E4 y E8 quedan aglomerados en la segunda rama junto con el gen ACS4. En el caso del control positivo (Figura 17) no se observa la separación de aglomerados, se observa una sola rama que agrupa muy cerca a los genes que participan en la biosíntesis de etileno y deja lejos a los genes que participan en la respuesta a etileno.

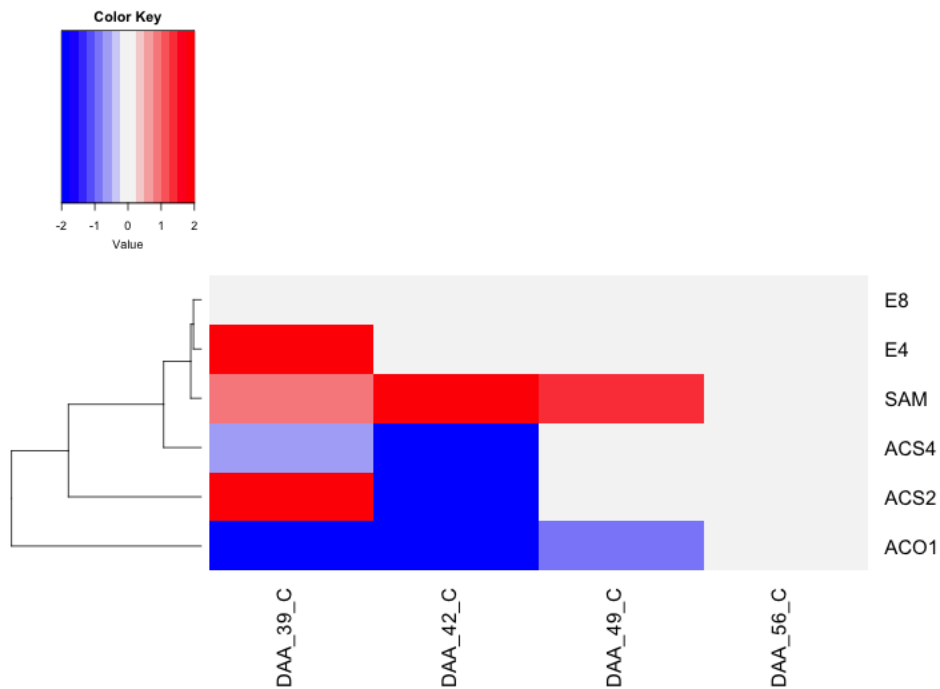


Figura 17. Mapa de calor de los genes relacionados con la biosíntesis de etileno en el control positivo (C+). Los datos de expresión se calcularon mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Schmittgen & Livak, 2008) con un total de 4 réplicas biológicas. Los datos fueron normalizados con actina como gen de referencia y calibrados con los valores encontrados en la línea isogénica. El mapa de calor representa el \log_2 del promedio de expresión. Color rojo indica expresión inducida mientras que el azul indica lo opuesto. DDA: Días después de antesis.

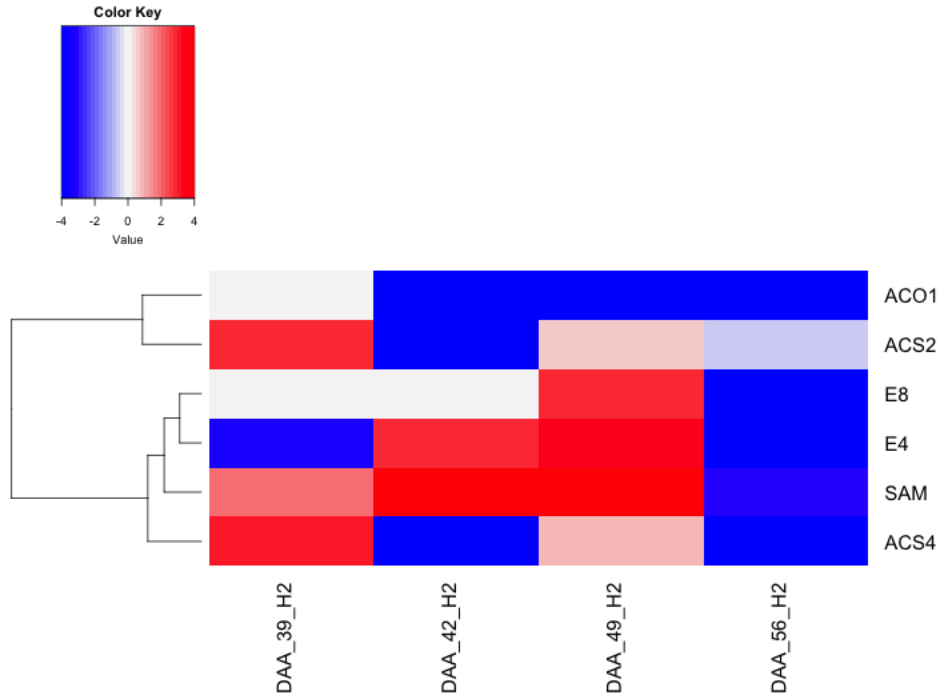


Figura 18. Mapa de calor de los genes relacionados con la biosíntesis de etileno en la línea transgénica H2. Los datos de expresión se calcularon mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Schmittgen & Livak, 2008) con un total de 4 réplicas biológicas. Los datos fueron normalizados con actina como gen de referencia y calibrados con los valores encontrados en la línea isogénica. El mapa de calor representa el \log_2 del promedio de expresión. Color rojo indica expresión inducida mientras que el azul indica lo opuesto. DDA: Días después de antesis, C: control positivo.

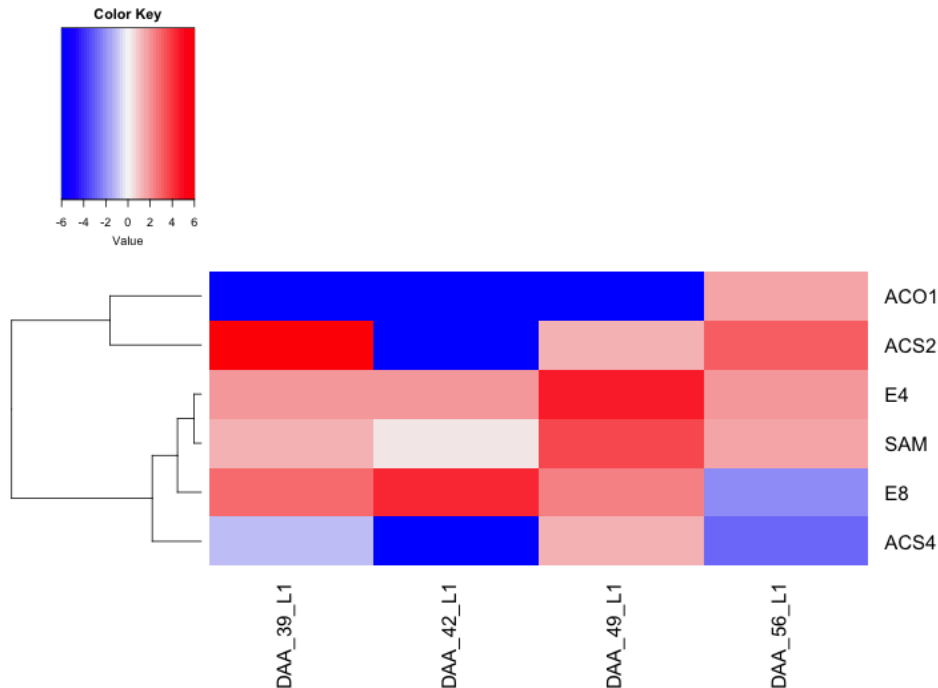


Figura 19. Mapa de calor de los genes relacionados con la biosíntesis de etileno en la línea transgénica L1. Los datos de expresión se calcularon mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen & Livak, 2008) con un total de 4 réplicas biológicas. Los datos fueron normalizados con actina como gen de referencia y calibrados con los valores encontrados en la línea isogénica. El mapa de calor representa el \log_2 del promedio de expresión. Color rojo indica expresión inducida mientras que el azul indica lo opuesto. DDA: Días después de antesis.

7.5 Análisis de Promotores de Genes de Cutícula

Una herramienta útil para inferir sobre la función de ciertos genes y su relación con fenómenos fisiológicos es el análisis de la secuencia promotora. En el Cuadro 2 se muestran los resultados del análisis de elementos reguladores en cis de algunos promotores de genes importantes para la biosíntesis, elongación y regulación de cutícula. La percepción de la hormona etileno en frutos involucra al receptor de membrana localizado en el lumen del retículo endoplásmico ER1/EIN2 mediante la activación de CTR1 que se encuentra en el citoplasma (Chang, 2016). Interesantemente, el análisis de los promotores de los genes que participan en la biosíntesis de cutícula, elongación y transporte de componentes cuticulares contienen al menos dos de los elementos de respuesta a etileno: EIN3, EIL (ETHYLENE-INSENSITIVE3-LIKE/ETHYLENE-INSENSITIVE3), AP2, ERF (APETALA2/ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR) y

AP2,RAV,B3. Dentro del análisis fue posible encontrar que solo el factor de transcripción CD3 contiene los tres elementos de respuesta a etileno EIN3,EIL; AP2,ERF y AP2,RAV,B3 como se observa en el Cuadro 2. Esto sugiere que CD3 particularmente puede responder de forma rápida al estrés, ya que las secuencias consenso como CAATs, TGACG, cajas TATA, sitios MYB y STREs se encuentran en todos los genes EIN3,EIL(Salih *et al.*, 2020). Por otro lado, el resto de los genes analizados que solo contenían dos elementos reguladores: AP2,ERF y AP2,RA,B3, su transcripción podría ser activada por condiciones medioambientales u hormonales. En el caso AP2,ERF, los genes que alberguen esta secuencia podrían responder a fitohormonas como ácido abscísico y etileno, como genes que responden al estrés independientes y dependientes de etileno y ácido abscísico. También podrían estar ligados a procesos de crecimiento y desarrollo como se documentó en Algodón Americano (Sengupta *et al.*, 2020).

Cuadro 2. Elementos reguladores encontrados en promotores de genes importantes en el transporte, regulación y elongación de componentes cuticulares.

Gen/ID	TFBS id	Posición	Cadena	Score	Sitio de unión	Familia de TF
CD3/Solyc08g081220	TFmatrixID_0255	825	-	0.992	atgATACat	EIN3;EIL
	TFmatrixID_0256	819	+	0.99	atATGCAtga	EIN3;EIL
	TFmatrixID_0256	819	-	0.99	ataTGCATga	EIN3;EIL
	TFmatrixID_0258	825	+	0.996	atgATACAta	EIN3;EIL
	TF_motif_seq_0254	82	-	1	TAGAT	AP2;ERF
	TF_motif_seq_0254	460	+	1	ATCTA	AP2;ERF
	TF_motif_seq_0254	1127	+	1	ATCTA	AP2;ERF
	TF_motif_seq_0255	273	+	1	CAACA	AP2;RAV;B3
	TF_motif_seq_0255	756	-	1	TGTTG	AP2;RAV;B3
	TF_motif_seq_0255	931	+	1	CAACA	AP2;RAV;B3
CER6/Solyc02g085870	TFmatrixID_0255	794	+	0.992	aTGTATcgt	EIN3;EIL
	TFmatrixID_0258	793	-	0.995	aaTGTATcgt	EIN3;EIL
	TF_motif_seq_0254	129	+	1	ATCTA	AP2;ERF
	TF_motif_seq_0254	378	-	1	TAGAT	AP2;ERF
	TF_motif_seq_0254	420	-	1	TAGAT	AP2;ERF
	TF_motif_seq_0255	348	+	1	CAACA	AP2;RAV;B3
CUS1/Solyc11g006250	TF_motif_seq_0254	377	+	1	ATCTA	AP2;ERF
	TF_motif_seq_0255	895	+	1	CAACA	AP2;RAV;B3
GPAT4/Solyc01g094700	TFmatrixID_0066	1098	-	0.999	cgtCGGTGa	AP2;ERF
	TFmatrixID_0119	1097	-	0.99	ccGTCGGtga	AP2;ERF
	TF_motif_seq_0254	714	-	1	TAGAT	AP2;ERF
	TF_motif_seq_0255	700	+	1	CAACA	AP2;RAV;B3
	TF_motif_seq_0255	736	+	1	CAACA	AP2;RAV;B3
	TF_motif_seq_0292	1099	-	1	GTCGGt	AP2;ERF
LACS1/Solyc01g07924	TF_motif_seq_0254	284	-	1	TAGAT	AP2;ERF
	TF_motif_seq_0254	930	-	1	TAGAT	AP2;ERF
	TF_motif_seq_0255	435	-	1	TGTTG	AP2;RAV;B3
	TF_motif_seq_0255	492	-	1	TGTTG	AP2;RAV;B3
	TF_motif_seq_0255	804	+	1	CAACA	AP2;RAV;B3
	TF_motif_seq_0255	1079	-	1	TGTTG	AP2;RAV;B3
	TF_motif_seq_0299	1031	-	1	cAGGTG	AP2;RAV;B3
	TF_motif_seq_0421	987	-	1	tggAAGTG	AP2;ERF
TTS2/Solyc12g006520	TF_motif_seq_0254	197	+	1	ATCTA	AP2;ERF
	TF_motif_seq_0254	223	-	1	TAGAT	AP2;ERF
	TF_motif_seq_0254	316	-	1	TAGAT	AP2;ERF
	TF_motif_seq_0254	773	+	1	ATCTA	AP2;ERF
	TF_motif_seq_0254	904	+	1	ATCTA	AP2;ERF
	TF_motif_seq_0255	572	-	1	TGTTG	AP2;RAV;B3
	TF_motif_seq_0255	715	-	1	TGTTG	AP2;RAV;B3

CD3: cutin deficient, CER6: β -cetoacil-CoA sintasa, CUS1, acil-transferasa, GPAT4: aciltransferasa-4-glicerol-3-fosfato, LACS1: ácido graso de cadena larga CoA sintasa y TTS2: delta amirina sintasa.

El factor de transcripción EIN3;EIL induce la expresión de genes de respuesta a etileno mediante

el control de factores de transcripción (Theologis *et al.*, 1993). EIN3 es parte de la cascada de señalización por la vía de CTR (triple respuesta constitutiva). La señalización de etileno induce la fosforilación de EIN2 ocasionando la respuesta primaria de etileno, activando genes como ERF1/APETALLA2, que a su vez inducen genes cuyo promotor contiene el elemento de respuesta E4 (2[T/A]) (Solano *et al.*, 1998). Dentro de la respuesta primaria a etileno, están los genes que activan los cambios ya conocidos de la madurez-senescencia del fruto, por ejemplo: el ablandamiento del fruto, cambio de color, aumento de sólidos solubles, producción de compuestos volátiles, entre otros. Sin embargo, el etileno y su señalización por la vía del CTR esta involucrada en otros fenómenos como la formación de raíces adventicias y la respuesta al estrés (An *et al.*, 2010). La respuesta a estrés forma parte de la activación por la vía del CTR fosforilación de EIN3, la respuesta por la activación de ERF/APETALLA2 -RAV (ERF/AP2-RAV) involucra la activación de genes relacionados a la patogénesis (PR) entre los que se encuentran osmotina, quitinasa y β -1, 3-glucanasa (Licausi, *et al.*, 2013).

Mutaciones que ocasionan un EIN3 deficiente, producen fenotipos insensibles a etileno bloqueando el proceso de maduración por la ruta de EIN3 (Tieman, *et al.*, 2001). Como resultados de los análisis *in silico*, encontramos que los genes CD3 y CER6 contienen el sitio de unión ATATGCATGA y ATGTATCGT respectivamente. Estos sitios de unión se encuentra en las regiones -819 y -793 respectivamente en la cadena positiva de ambos genes, por lo cual la familia de factores de transcripción EIN3;EIL podría estar regulando la transcripción de estos dos genes. La eliminación del gen CD3 en tomate, ocasiona un fenotipo deficiente en monómeros de cutina, con una reducción de hasta 25 veces comparado con el cultivar 'M82' en la etapa de rojo maduro, sin embargo, esta deficiencia en monómeros de cutina no afecta la transpiración del fruto y pierde peso normalmente (Isaacson *et al.*, 2009). Por otro lado CER6, es un gen que codifica para β -cetoacil CoA sintasa de ácidos grasos de cadena muy larga (<29C) que se ha demostrado que puede ser controlado por la hormona etileno (Romero & Lafuente, 2022). Romero & Lafuente, (2022) reportan que diferentes genes relacionados con la elongación, deposición y transporte de cutícula pueden ser regulados por la hormona etileno lo cual justifica el hallazgo de los elementos de respuesta a la hormona etileno dentro de los promotores de los genes analizados.

8. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se analizó la sobre-expresión del gen *Solyc11g011300* en dos líneas independientes, encontrando que la producción de la hormona etileno y la velocidad de respiración fue desplazada en ambas líneas transgénicas. También se documentó la desregulación de los genes implicados en la producción de la hormona etileno, como los ACS2 y ACO1, por lo que este es el primer reporte donde la sobre-expresión de un gen propio de la fruta ocasiona desregulación hormonal. Aunado a lo anterior, se encontró que los genes relacionados con la biosíntesis y regulación de cutícula CER6, CD3, CUS1, GPAT4, LACS1 y TTS2 tienen los elementos de respuesta a etileno EIN3,EIL; AP2,ERF y AP2,RAV,B3 lo que abre la posibilidad a que sean controlados por la hormona etileno.

9. PERSPECTIVAS

La ruta de biosíntesis de etileno es muy conocida en la planta de *Arabidopsis T.* ya que se han realizado experimentos de sobre-expresión en los genes responsables de su biosíntesis como los ACS, SAM y ACO logrando caracterizar fenotipos de cada uno de los genes mencionados anteriormente. En este sentido, también se han realizado experimentos de sobre-expresión y silenciamiento génico dirigido a la disminución o nula transcripción de genes que codifican proteínas degradadoras de pared celular, estos experimentos han permitido dilucidar la función fisiológica de una cantidad enorme de genes y concluir respecto a ello. En este camino hacia la comprensión del fenómeno de la maduración, el análisis de los experimentos de sobre-expresión génica han sido abordados desde una perspectiva limitada ya que su análisis se centra solo a efectos contiguos, sin embargo en algunas investigaciones de grupos grandes es posible observar mas apertura de análisis permitiendo documentar fenotipos a detalle. En el caso de la sobre-expresión del gen de RGL-*Solyc11g011300*, ocasionó la desregulación a nivel transcripcional de genes responsables de producir la hormona etileno (como se demuestra en la presente tesis), algo que no se esperaba al igual que la prolongación de la firmeza en los frutos transgénicos. Y una posible hipótesis para entender esto sugiere que la planta al ser un ser viviente tiene un objetivo, “mantener su descendencia y perpetuar la especie”. Es aquí donde entra el fenómeno de la maduración, fenómeno donde la semilla queda lista para dar lugar a una nueva planta, continuando con la idea entonces al verse en riesgo el ciclo reproductivo de la planta, es posible que los posibles escenarios fenotípicos no se conozcan como lo describen algunos autores (Prelich, 2012; Smyth, 1997). Por lo anterior, se hipotetiza y plantean dos escenarios: 1: El bajo número de semillas encontrado en los frutos transgénicos, el acortamiento del tubo polínico y el tamaño pequeño podría ser indicativo de que la sobre-expresión del gen *Solyc11g011300* repercutió en el fenómeno de reproducción y 2: La co-supresión y sus efectos no son del todo conocidos, entonces, el hecho de encontrar represión en el transcrito sobre expresado y el transcrito endógeno sugiere que la planta manejó la transformación por la vía de la co-supresión, desregulando genes importantes de una vía hormonal como lo es el etileno. De ser así, los resultados del presente estudio sugieren un mecanismo de co-supresión alternativos a los que ya se conocen.

10. REFERENCIAS

- Abel, S., Nguyen, M. D., Chow, W., & Theologis, A. (1995). ASC4, a Primary Indoleacetic Acid-responsive Gene Encoding 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate Synthase in *Arabidopsis thaliana*: STRUCTURAL CHARACTERIZATION, EXPRESSION IN *ESCHERICHIA COLI*, AND EXPRESSION CHARACTERISTICS IN RESPONSE TO AUXIN *. *Journal of Biological Chemistry*, 270(32), 19093–19099. <https://doi.org/10.1074/JBC.270.32.19093>
- Adaskaveg, J. A., Silva, C. J., Huang, P., & Blanco-Ulate, B. (2021). Single and Double Mutations in Tomato Ripening Transcription Factors Have Distinct Effects on Fruit Development and Quality Traits. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2021.647035>
- Airianah, O. B., Vreeburg, R. A. M., & Fry, S. C. (2016). Pectic polysaccharides are attacked by hydroxyl radicals in ripening fruit: Evidence from a fluorescent fingerprinting method. *Annals of Botany*, 117(3), 441–455. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv192>
- Alba, R., Cordonnier-Pratt, M. M., & Pratt, L. H. (2000). Fruit-localized phytochromes regulate lycopene accumulation independently of ethylene production in tomato. *Plant Physiology*, 123(1), 363–370. <https://doi.org/10.1104/pp.123.1.363>
- Alexander, L., & Grierson, D. (2002). Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*, 53(377), 2039–2055. <https://doi.org/10.1093/jxb/erf072>
- Alós, E., Rodrigo, M. J., & Zacarias, L. (2019). Ripening and Senescence. In *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables* (pp. 131–155). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813278-4.00007-5>
- Amrhein, N. (1981). *Identification of a major metabolite of the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in higher plants.*
- An, F., Zhao, Q., Ji, Y., Li, W., Jiang, Z., Yu, X., ... Guo, H. (2010). Ethylene-induced stabilization of ETHYLENE INSENSITIVE3 and EIN3-LIKE1 is mediated by proteasomal degradation of EIN3 binding F-box 1 and 2 that requires EIN2 in arabidopsis. *Plant Cell*, 22(7), 2384–2401. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.076588>
- Ariizumi, T., Shinozaki, Y., & Ezura, H. (2013). Genes that influence yield in tomato. *Breeding Science*, 63(1), 3–13. <https://doi.org/10.1270/JSBBS.63.3>
- Azzi, L., Deluche, C., Gévaudant, F., Frangne, N., Delmas, F., Hernould, M., & Chevalier, C. (2015). Fruit growth-related genes in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 66(4), 1075–1086. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru527>
- Barnes, W. J., & Anderson, C. T. (2018, January 8). Release, Recycle, Rebuild: Cell-Wall Remodeling, Autodegradation, and Sugar Salvage for New Wall Biosynthesis during Plant Development. *Molecular Plant*, Vol. 11, pp. 31–46. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.08.011>
- Barry, C. S., & Giovannoni, J. J. (2007). Ethylene and Fruit Ripening Ethylene and Fruit Ripening. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26(2), 143–159. <https://doi.org/10.1007/s00344-007->

- Bartley, I. M., & Knee, M. (1982). The chemistry of textural changes in fruit during storage. *Food Chemistry*, 9(1–2), 47–58. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(82\)90068-1](https://doi.org/10.1016/0308-8146(82)90068-1)
- Bennett, A. B., & Labavitch, J. M. (2008). Ethylene and ripening-regulated expression and function of fruit cell wall modifying proteins. *Plant Science*, 175(1–2), 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.03.004>
- Berumen-Varela, G., Ochoa-Jiménez, V.-A. V. A., Burgara-Estrella, A., Trillo-Hernández, E. A. E.-A., Ojeda-Contreras, Á. J. Á.-J., Orozco-Avitia, A., ... Tiznado-Hernández, M.-E. M. E. (2018). Functional analysis of a tomato (*Solanum lycopersicum* L.) rhamnogalacturonan lyase promoter. *Journal of Plant Physiology*, 229, 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.08.002>
- Berumen-Varela, G., Rivera-Dominguez, M., Troncoso-Rojas, R., Baez-Sanudo, R., & Tiznado-Hernandez, M.-E. (2017). Physiological function of rhamnogalacturonan lyase genes based in the analysis of cis-acting elements located in the promoter region. *RESEARCH JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*, 12(6), 77–108.
- Brady, C., Macalpine, G., McGlasson, W., & Veda, Y. (1982). Polygalacturonase in Tomato Fruits and the Induction of Ripening. *Functional Plant Biology*, 9(2), 171. <https://doi.org/10.1071/pp9820171>
- Cara, B., & Giovannoni, J. J. (2008). Molecular biology of ethylene during tomato fruit development and maturation. *Plant Science*, 175(1–2), 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.03.021>
- Carey, A. T., Smith, D. L., Harrison, E., Bird, C. R., Gross, K. C., Seymour, G. B., & Tucker, G. A. (2001). Down-regulation of a ripening-related β -galactosidase gene (TBG1) in transgenic tomato fruits. *Journal of Experimental Botany*, 52(357), 663–668. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.357.663>
- Chang, C. (2016). Q and A: How do plants respond to ethylene and what is its importance? *BMC Biology*, 14(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0230-0>
- Chaves, A. L. S., & de Mello-Farias, P. C. (2006). Ethylene and fruit ripening: From illumination gas to the control of gene expression, more than a century of discoveries. *Genetics and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572006000300020>
- Christians, M. J., Gingerich, D. J., Hansen, M., Binder, B. M., Kieber, J. J., & Vierstra, R. D. (2009). The BTB ubiquitin ligases ETO1, EOL1 and EOL2 act collectively to regulate ethylene biosynthesis in Arabidopsis by controlling type-2 ACC synthase levels. *The Plant Journal*, 57(2), 332–345. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2008.03693.X>
- Colombié, S., Beauvoit, B., Nazaret, C., Bénard, C., Vercambre, G., Gall, S. Le, ... Gibon, Y. (2017). Respiration climacteric in tomato fruits elucidated by constraint-based modelling. *New Phytologist*, 213(4), 1726–1739. <https://doi.org/10.1111/NPH.14301>
- Crookes, P. R., & Grierson, D. (1983). Ultrastructure of Tomato Fruit Ripening and the Role of Polygalacturonase Isoenzymes in Cell Wall Degradation. *Plant Physiology*, 72(4), 1088–1093. <https://doi.org/10.1104/pp.72.4.1088>
- DALAL, K. B., SALUNKHE, D. K., BOE, A. A., & OLSON, L. E. (1965). Certain Physiological

and Biochemical Changes in the Developing Tomato Fruit (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Journal of Food Science*, 30(3), 504–508. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.1965.TB01793.X>

- DellaPenna, D., Kates, D. S., & Bennett, A. B. (1987). Polygalacturonase Gene Expression in Rutgers, rin, nor, and Nr Tomato Fruits. *Plant Physiology*, 85(2), 502–507. <https://doi.org/10.1104/pp.85.2.502>
- Depaepe, T., & Straeten, D. Van Der. (2020). Tools of the Ethylene Trade: A Chemical Kit to Influence Ethylene Responses in Plants and Its Use in Agriculture. *Small Methods*, 4(8), 1900267. <https://doi.org/10.1002/SMTD.201900267>
- Dugardeyn, J., Vandebussche, F., & Van Der Straeten, D. (2008). To grow or not to grow: What can we learn on ethylene-gibberellin cross-talk by in silico gene expression analysis? *Journal of Experimental Botany*, 59(1), 1–16. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm349>
- FAO. (2021). La calidad en frutas y hortalizas. Retrieved September 10, 2019, from <http://www.fao.org/3/Y4893S/y4893s08.htm>
- Fernandez-Pozo, N., Zheng, Y., Snyder, S. I., Nicolas, P., Shinozaki, Y., Fei, Z., ... Mueller, L. A. (2017a). The Tomato Expression Atlas. *Bioinformatics*, 33(15), 2397–2398. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTX190>
- Fernandez-Pozo, N., Zheng, Y., Snyder, S. I., Nicolas, P., Shinozaki, Y., Fei, Z., ... Mueller, L. A. (2017b). The Tomato Expression Atlas. *Bioinformatics*, 33(15), 2397–2398. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTX190>
- Gierson, D., & Kader, A. A. (1986). Fruit ripening and quality. *The Tomato Crop*, 241–280. https://doi.org/10.1007/978-94-009-3137-4_6
- Grierson, D., Schuch, W., Bevan, M., Harrison, D., & Leaver, C. (1993). Control of ripening. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 342(1301), 241–250. <https://doi.org/10.1098/rstb.1993.0153>
- Guillermo, B.-V., Marisela, R.-D., Rosalba, T.-R., Reginaldo, B.-S., & Martín-Ernesto, T.-H. (2017). Physiological function of rhamnogalacturonan lyase genes based in the analysis of cis-acting elements located in the promoter region. *Research Journal of Biotechnology*, 12(6).
- Hall, L. N., Tucker, G. A., Smith, C. J. S., Watson, C. F., Seymour, G. B., Bundick, Y., ... Grierson, D. (1993). Antisense inhibition of pectin esterase gene expression in transgenic tomatoes. *Plant Journal*, 3(1), 121–129. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1993.tb00015.x>
- Herner, R. C., & Sink, K. C. (1973). Ethylene Production and Respiratory Behavior of the rin Tomato Mutant. *Plant Physiology*, 52(1), 38–42. <https://doi.org/10.1104/pp.52.1.38>
- Hyodo, H., Terao, A., Furukawa, J., Sakamoto, N., Yurimoto, H., Satoh, S., & Iwai, H. (2013). Tissue specific localization of pectin-Ca²⁺ cross-linkages and pectin methyl-esterification during fruit ripening in tomato (*Solanum lycopersicum*). *PLoS ONE*, 8(11), e78949. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078949>
- Isaacson, T., Kosma, D. K., Matas, A. J., Buda, G. J., He, Y., Yu, B., ... Rose, J. K. C. (2009). Cutin deficiency in the tomato fruit cuticle consistently affects resistance to microbial infection and biomechanical properties, but not transpirational water loss. *Plant Journal*,

60(2), 363–377. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03969.x>

- Ito, Y., Nishizawa-Yokoi, A., Endo, M., Mikami, M., Shima, Y., Nakamura, N., ... Toki, S. (2017). Re-evaluation of the rin mutation and the role of RIN in the induction of tomato ripening. *Nature Plants*, 3(11), 866–874. <https://doi.org/10.1038/s41477-017-0041-5>
- Jung, J. K. H., & McCouch, S. (2013, June 18). Getting to the roots of it: Genetic and hormonal control of root architecture. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 4, p. 186. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00186>
- Keegstra, K. (2010). Plant cell walls. *Plant Physiology*, 154(2), 483–486. <https://doi.org/10.1104/pp.110.161240>
- Kierzkowski, D., Nakayama, N., Routier-Kierzkowska, A. L., Weber, A., Bayer, E., Schorderet, M., ... Smith, R. S. (2012). Elastic domains regulate growth and organogenesis in the plant shoot apical meristem. *Science*, 335(6072), 1096–1099. <https://doi.org/10.1126/science.1213100>
- Klaassen, M. T., & Trindade, L. M. (2020). RG-I galactan side-chains are involved in the regulation of the water-binding capacity of potato cell walls. *Carbohydrate Polymers*, 227, 115353. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115353>
- Klee, H. J., & Giovannoni, J. J. (2011). Genetics and Control of Tomato Fruit Ripening and Quality Attributes. *Annual Review of Genetics*, 45(1), 41–59. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132507>
- Kosma, D. K., Parsons, E. P., Isaacson, T., Lü, S., Rose, J. K. C. C., & Jenks, M. A. (2010a). Fruit cuticle lipid composition during development in tomato ripening mutants. *Physiologia Plantarum*, 139(1), 107–117. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01342.x>
- Kosma, D. K., Parsons, E. P., Isaacson, T., Lü, S., Rose, J. K. C., & Jenks, M. A. (2010b). Fruit cuticle lipid composition during development in tomato ripening mutants. *Physiologia Plantarum*, 139(1), 107–117. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01342.x>
- Kumar, R., Sharma, M. K., Kapoor, S., Tyagi, A. K., & Sharma, A. K. (2012). Transcriptome analysis of rin mutant fruit and in silico analysis of promoters of differentially regulated genes provides insight into LeMADS-RIN-regulated ethylene-dependent as well as ethylene-independent aspects of ripening in tomato. *Molecular Genetics and Genomics*, 287(3), 189–203. <https://doi.org/10.1007/s00438-011-0671-7>
- Kunst, L., Jetter, R., & Samuels, A. L. (2006). Biosynthesis and Transport of Plant Cuticular Waxes. In *Annual Plant Reviews Volume 23: Biology of the Plant Cuticle* (pp. 182–215). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9780470988718.ch5>
- Lara, I., Belge, B., & Goulao, L. F. (2015). *A Focus on the Biosynthesis and Composition of Cuticle in Fruits*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00013>
- Licausi, F., Ohme-Takagi, M., & Perata, P. (2013, August 1). APETALA2/Ethylene Responsive Factor (AP2/ERF) transcription factors: mediators of stress responses and developmental programs. *The New Phytologist*, Vol. 199, pp. 639–649. <https://doi.org/10.1111/nph.12291>
- Liu, B., Wang, K., Shu, X., Liang, J., Fan, X., & Sun, L. (2019). Changes in fruit firmness, quality traits and cell wall constituents of two highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) during postharvest cold storage. *Scientia Horticulturae*, 246, 557–562.

<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.042>

- Liu, M., Gomes, B. L., Mila, I., Purgatto, E., Peres, L. E. P., Frasse, P., ... Pirrello, J. (2016). Comprehensive Profiling of Ethylene Response Factor Expression Identifies Ripening-Associated ERF Genes and Their Link to Key Regulators of Fruit Ripening in Tomato. *Plant Physiology*, 170(3), 1732–1744. <https://doi.org/10.1104/PP.15.01859>
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J. J., & Solano, R. (2003). ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell*, 15(1), 165–178. <https://doi.org/10.1105/tpc.007468>
- Lunn, D., Phan, T. D., Tucker, G. A., & Lycett, G. W. (2013). Cell wall composition of tomato fruit changes during development and inhibition of vesicle trafficking is associated with reduced pectin levels and reduced softening. *Plant Physiology and Biochemistry*, 66, 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.02.005>
- Martin, L. B. B., & Rose, J. K. C. (2014). There's more than one way to skin a fruit: formation and functions of fruit cuticles. *Journal of Experimental Botany*, 65(16), 4639–4651. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru301>
- Martin, M. N., Cohen, J. D., & Saftner, R. A. (1995). A New 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid-Conjugating Activity in Tomato Fruit. *Plant Physiology*, 109(3), 917–926. <https://doi.org/10.1104/PP.109.3.917>
- Méndez-Yañez, A., González, M., Carrasco-Orellana, C., Herrera, R., & Moya-León, M. A. (2020). Isolation of a rhamnogalacturonan lyase expressed during ripening of the Chilean strawberry fruit and its biochemical characterization. *Plant Physiology and Biochemistry*, 146, 411–419. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.11.041>
- Moneruzzaman Khandaker, M., Sharif Hossain, A., Sani, W., & Saifuddin, M. (2008). *Effect of Stages of Maturity and Ripening Conditions on the Biochemical Characteristics of Tomato Horticulture*. <https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2008.336.344>
- Moore, J. P., Farrant, J. M., & Driouich, A. (2008). A role for pectin-associated arabinans in maintaining the flexibility of the plant cell wall during water deficit stress. *https://doi.org/10.4161/Psb.3.2.4959*, 3(2), 102–104. <https://doi.org/10.4161/PSB.3.2.4959>
- Nambeesan, S., Datsenka, T., Ferruzzi, M. G., Malladi, A., Mattoo, A. K., & Handa, A. K. (2010). Overexpression of yeast spermidine synthase impacts ripening, senescence and decay symptoms in tomato. *The Plant Journal*, 63(5), 836–847. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2010.04286.X>
- Nemhauser, J. L., Hong, F., & Chory, J. (2006, August 4). Different Plant Hormones Regulate Similar Processes through Largely Nonoverlapping Transcriptional Responses. *Cell*, Vol. 126, pp. 467–475. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.050>
- Ochoa-Jiménez, V. A., Berumen-Varela, G., Burgara-Estrella, A., Orozco-Avitia, J. A., Ojeda-Contreras, Á. J., Trillo-Hernández, E. A., ... Tiznado-Hernández, M. E. (2018). Functional analysis of tomato rhamnogalacturonan lyase gene Solyc11g011300 during fruit development and ripening. *Journal of Plant Physiology*, 231, 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.09.001>

- Ochoa-Jiménez, V. A., Berumen-Varela, G., Fernández-Valle, R., Martín-Ernesto, & Hernández, T. (2018, November 1). Rhamnogalacturonan lyase: A pectin modification enzyme of higher plants. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, Vol. 30, pp. 910–917. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2018.v30.i11.1858>
- Ojeda-Contreras, A.-J., Hernández-Martínez, J., Domínguez, Z., Mercado-Ruiz, J.-N., Troncoso-Rojas, R., Sánchez-Estrada, A., & Tiznado-Hernández, M.-E. (2008). Utilization of Caffeic Acid Phenethyl Ester to Control *Alternaria alternata* Rot in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Fruit. *Journal of Phytopathology*, 156(3), 164–173. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01325.x>
- Orfila, C., Seymour, G. B., Willats, W. G. T., Huxham, I. M., Jarvis, M. C., Dover, C. J., ... Knox, J. P. (2001). Altered middle lamella homogalacturonan and disrupted deposition of (1→5)- α -L-arabinan in the pericarp of Cnr, a ripening mutant of tomato. *Plant Physiology*, 126(1), 210–221. <https://doi.org/10.1104/pp.126.1.210>
- Osorio, S., Alba, R., Nikoloski, Z., Kochevenko, A., Fernie, A. R., & Giovannoni, J. J. (2012). Integrative Comparative Analyses of Transcript and Metabolite Profiles from Pepper and Tomato Ripening and Development Stages Uncovers Species-Specific Patterns of Network Regulatory Behavior. *Plant Physiology*, 159(4), 1713–1729. <https://doi.org/10.1104/PP.112.199711>
- Osorio, S., Carneiro, R. T., Lytovchenko, A., McQuinn, R., Sørensen, I., Vallarino, J. G., ... Rose, J. K. C. (2019). Genetic and metabolic effects of ripening mutations and vine detachment on tomato fruit quality. *Plant Biotechnology Journal*. <https://doi.org/10.1111/pbi.13176>
- Paniagua, C., Posé, S., Morris, V. J., Kirby, A. R., Quesada, M. A., & Mercado, J. A. (2014). Fruit softening and pectin disassembly: an overview of nanostructural pectin modifications assessed by atomic force microscopy. *Annals of Botany*, 114(6), 1375–1383. <https://doi.org/10.1093/AOB/MCU149>
- Pattyn, J., Vaughan-Hirsch, J., & Van De Poel, B. (2021). The regulation of ethylene biosynthesis: a complex multilevel control circuitry. *New Phytologist*, 229, 770–782. <https://doi.org/10.1111/nph.16873>
- Paul, V., Pandey, R., & Srivastava, G. C. (2011). Tomato fruit ripening: regulation of ethylene production and its response. *Indian Journal of Plant Physiology*, 16(2), 117–131.
- Paul, V., Pandey, R., & Srivastava, G. C. (2012, February 11). The fading distinctions between classical patterns of ripening in climacteric and non-climacteric fruit and the ubiquity of ethylene-An overview. *Journal of Food Science and Technology*, Vol. 49, pp. 1–21. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0293-4>
- Poovaiah, B. W., & Nukaya, A. (1979). Polygalacturonase and Cellulase Enzymes in the Normal Rutgers and Mutant rin Tomato Fruits and Their Relationship to the Respiratory Climacteric. *Plant Physiology*, 64(4), 534–537. <https://doi.org/10.1104/pp.64.4.534>
- Prelich, G. (2012). Gene Overexpression: Uses, Mechanisms, and Interpretation. *Genetics*, 190(3), 841. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.111.136911>
- Rivera-Domínguez, M., Troncoso-Rojas, R., & Tiznado-Hernández, M.-E. (2008). *A Transgenic Approach in Plant Biochemistry and Physiology*. Kerala India: Transworld Research Network.

- Romero, P., & Lafuente, M. T. (2022). Ethylene-driven changes in epicuticular wax metabolism in citrus fruit. *Food Chemistry*, 372, 131320. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.131320>
- Romero, P., & Rose, J. K. C. (2019). A relationship between tomato fruit softening, cuticle properties and water availability. *Food Chemistry*, 295, 300–310. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.118>
- Roongsattham, P., Morcillo, F., Jantasuriyarat, C., Pizot, M., Moussu, S., Jayaweera, D., ... Tranbarger, T. J. (2012). Temporal and spatial expression of polygalacturonase gene family members reveals divergent regulation during fleshy fruit ripening and abscission in the monocot species oil palm. *BMC Plant Biology*, 12(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-150/FIGURES/6>
- Saladié, M., Matas, A. J., Isaacson, T., Jenks, M. A., Goodwin, S. M., Niklas, K. J., ... Rose, J. K. C. (2007). A reevaluation of the key factors that influence tomato fruit softening and integrity. *Plant Physiology*, 144(2), 1012–1028. <https://doi.org/10.1104/pp.107.097477>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Segado, P., Domínguez, E., & Heredia, A. (2016). Ultrastructure of the epidermal cell wall and cuticle of tomato fruit (*Solanum lycopersicum* L.) during development. *Plant Physiology*, 170(2), 935–946. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01725>
- Seymour, G. B., Chapman, N. H., Chew, B. L., & Rose, J. K. C. (2013). Regulation of ripening and opportunities for control in tomato and other fruits. *Plant Biotechnology Journal*, 11(3), 269–278. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2012.00738.x>
- Seymour, G. B., Ostergaard, L., Chapman, N. H., Knapp, S., & Martin, C. (2013, April 2). Fruit development and ripening. *Annual Review of Plant Biology*, Vol. 64, pp. 219–241. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120057>
- Shakya, R., & A. Lal, M. (2018). Fruit Development and Ripening. *Plant Physiology, Development and Metabolism*, 857–883. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2023-1_27
- Sheehy, R. E., Kramer, M., & Hiatt, W. R. (1988). Reduction of polygalacturonase activity in tomato fruit by antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(23), 8805–8809. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.23.8805>
- Smith, C. J. S., Watson, C. F., Ray, J., Bird, C. R., Morris, P. C., Schuch, W., & Grierson, D. (1988). Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. *Nature*, 334(6184), 724–726. <https://doi.org/10.1038/334724a0>
- Smith, D. L., Abbott, J. A., & Gross, K. C. (2002). Down-regulation of tomato β -galactosidase 4 results in decreased fruit softening. *Plant Physiology*, 129(4), 1755–1762. <https://doi.org/10.1104/pp.011025>
- Smyth, D. R. (1997). Gene silencing: Cosuppression at a distance. *Current Biology*, 7(12), 793–795. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(06\)00407-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(06)00407-6)
- Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q., & Ecker, J. R. (1998). Nuclear events in ethylene signaling: A transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes and Development*, 12(23), 3703–3714.

<https://doi.org/10.1101/gad.12.23.3703>

- Sozzi, G. O., Frascina, A. A., Navarro, A. A., Cascone, O., Greve, L. C., & Labavitch, J. M. (2002). α -L-Arabinofuranosidase Activity during Development and Ripening of Normal and ACC Synthase Antisense Tomato Fruit. *HortScience HortSci*, 37(3), 564–566. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.37.3.564>
- Staswick, P. E., & Tiryaki, I. (2004). The Oxylinin Signal Jasmonic Acid Is Activated by an Enzyme That Conjugates It to Isoleucine in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 16(8), 2117–2127. <https://doi.org/10.1105/TPC.104.023549>
- Theologis, A., Oeller, P. W., Wong, L., Rottmann, W. H., & Gantz, D. M. (1993). Use of a tomato mutant constructed with reverse genetics to study fruit ripening, a complex developmental process. *Developmental Genetics*, 14(4), 282–295. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/dvg.1020140406>
- Thole, V., Vain, P., Yang, R.-Y., Silva, J. A. B. da, Enfissi, E. M. A., Nogueira, M., ... Martin, C. (2020). Analysis of Tomato Post-Harvest Properties: Fruit Color, Shelf Life, and Fungal Susceptibility. *Current Protocols in Plant Biology*, 5(2), e20108. <https://doi.org/10.1002/CPPB.20108>
- Thompson, A. J., Tor, M., Barry, C. S., Vrebalov, J., Orfila, C., Jarvis, M. C., ... Seymour, G. B. (1999). Molecular and genetic characterization of a novel pleiotropic tomato-ripening mutant. *Plant Physiology*, 120(2), 383–389. <https://doi.org/10.1104/pp.120.2.383>
- Thompson, D. S., Davies, W. J., & Ho, L. C. (1998). Regulation of tomato fruit growth by epidermal cell wall enzymes. *Plant, Cell & Environment*, 21(6), 589–599. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00308.x>
- Tieman, D. M., Ciardi, J. A., Taylor, M. G., & Klee, H. J. (2001). Members of the tomato LeEIL (EIN3-like) gene family are functionally redundant and regulate ethylene responses throughout plant development. *Plant Journal*, 26(1), 47–58. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.01006.x>
- Trillo-Hernández, E. A., Orozco-Avitia, J., Ojeda-Contreras, Á. J., Berumen-Varela, G., Ochoa-Jiménez, V., Troncoso-Rojas, R., ... Tiznado-Hernández, M. (2021). EXPRESSION ANALYSIS OF GENES ENCODING RHAMNOGALACTURONAN LYASE ISOENZYMES DURING TOMATO FRUIT DEVELOPMENT AND RIPENING. *Revista Fitotécnica Mexicana*, 44(4), 529–536. Retrieved from <https://revistafitotecniamexicana.org/documentos/44-4/5a.pdf>
- Tsang, D. L., Edmond, C., Harrington, J. L., & Nühse, T. S. (2011). Cell Wall Integrity Controls Root Elongation via a General 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid-Dependent, Ethylene-Independent Pathway. *Plant Physiology*, 156(2), 596–604. <https://doi.org/10.1104/PP.111.175372>
- Ulusik, S., Chapman, N. H., Smith, R., Poole, M., Adams, G., Gillis, R. B., ... Seymour, G. B. (2016). Genetic improvement of tomato by targeted control of fruit softening. *Nature Biotechnology*, 34, 950. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nbt.3602>
- Vandenbussche, F., Vaseva, I., Vissenberg, K., & Straeten, D. Van Der. (2012). Ethylene in vegetative development: a tale with a riddle. *New Phytologist*, 194(4), 895–909. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.2012.04100.X>

- Vanderstraeten, L., & Van Der Straeten, D. (2017). Accumulation and Transport of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid (ACC) in Plants: Current Status, Considerations for Future Research and Agronomic Applications. *Frontiers in Plant Science*, 8, 38. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00038>
- Verhertbruggen, Y., & Knox, J. P. (2007). Pectic polysaccharides and expanding cell walls. *Plant Cell Monographs*, 6(5), 139–158. https://doi.org/10.1007/7089_2006_074
- Vrebalov, J., Ruezinsky, D., Padmanabhan, V., White, R., Medrano, D., Drake, R., ... Giovannoni, J. (2002). A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (rin) locus. *Science*, 296(5566), 343–346. <https://doi.org/10.1126/science.1068181>
- Wang, D., Samsulrizal, N. H., Yan, C., Allcock, N. S., Craigon, J., Blanco-Ulate, B., ... Seymour, G. B. (2019). Characterization of CRISPR mutants targeting genes modulating pectin degradation in ripening tomato. *Plant Physiology*, 179(2), 544–557. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01187>
- Wang, D., Yeats, T. H., Uluisik, S., Rose, J. K. C., & Seymour, G. B. (2018, April 1). Fruit Softening: Revisiting the Role of Pectin. *Trends in Plant Science*, Vol. 23, pp. 302–310. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.01.006>
- Wang, M., Yuan, D., Gao, W., Li, Y., Tan, J., & Zhang, X. (2013). A Comparative Genome Analysis of PME and PME1 Families Reveals the Evolution of Pectin Metabolism in Plant Cell Walls. *PLoS ONE*, 8(8), 72082. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072082>
- Wen, B., Zhang, F., Wu, X., & Li, H. (2020). Characterization of the Tomato (*Solanum lycopersicum*) Pectin Methyl-esterases: Evolution, Activity of Isoforms and Expression During Fruit Ripening. *Frontiers in Plant Science*, 0, 238. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.00238>
- Wilkins, T. A., & Smart, L. B. (1994). A Laboratory Guide to RNA: Isolation, Analysis, and Synthesis. In P. A. Krieg (Ed.), *A Laboratory Guide to RNA: Isolation, Analysis, and Synthesis* (pp. 21–40). Retrieved from <https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=rBdWGrvC85oC&oi=fnd&pg=PA21&dq=hot+borate+for+plant+RNA+method+RNA&ots=L--W1XnQ5B&sig=fCrBQIC27U90NKeVZLE0HbbCHBw#v=onepage&q=hot borate for plant RNA method RNA&f=false>
- Wolf, S., Mouille, G., & Pelloux, J. (2009). Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. *Molecular Plant*, 2(5), 851–860. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp066>
- Wu, H. C., Bulgakov, V. P., & Jinn, T. L. (2018a). Pectin methyl-esterases: Cell wall remodeling proteins are required for plant response to heat stress. *Frontiers in Plant Science*, 871, 1612. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.01612/BIBTEX>
- Wu, H. C., Bulgakov, V. P., & Jinn, T. L. (2018b, November 6). Pectin methyl-esterases: Cell wall remodeling proteins are required for plant response to heat stress. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 871, p. 1612. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01612>
- Yang, L., Huang, W., Xiong, F., Xian, Z., Su, D., Ren, M., & Li, Z. (2017). Silencing of SIPL, which encodes a pectate lyase in tomato, confers enhanced fruit firmness, prolonged shelf-life and reduced susceptibility to grey mould. *Plant Biotechnology Journal*, 15(12), 1544–1555. <https://doi.org/10.1111/pbi.12737>

- Yeats, T. H., Howe, K. J., Matas, A. J., Buda, G. J., Thannhauser, T. W., & Rose, J. K. C. (2010). Mining the surface proteome of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit for proteins associated with cuticle biogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 61(13), 3759–3771. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq194>
- Yeats, T. H., & Rose, J. K. C. (2013, September 1). The formation and function of plant cuticles. *Plant Physiology*, Vol. 163, pp. 5–20. <https://doi.org/10.1104/pp.113.222737>.