



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

**ANÁLISIS *in silico* Y EXPRESIÓN GÉNICA DE FACTORES DE
TRANSCRIPCIÓN RELACIONADOS CON LA BIOSÍNTESIS DE
CUTÍCULA DURANTE LA MADURACIÓN DE FRUTOS DE
GUANÁBANA (*Annona muricata* L.)**

Por

Héctor Adán Ruiz Ortega

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

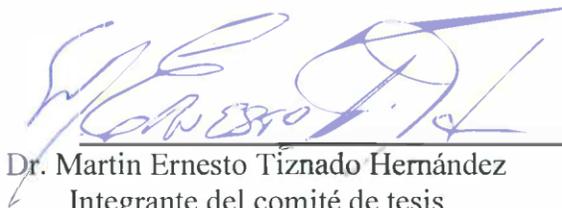
MAESTRO EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Héctor Adán Ruiz Ortega, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que se aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



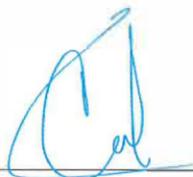
Dr. Miguel Ángel Hernández Oñate
Director de tesis



Dr. Martín Ernesto Tiznado Hernández
Integrante del comité de tesis



Dra. María Auxiliadora Islas Osuna
Integrante del comité de tesis



Dr. Carlos Ligne Calderón Vázquez
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Análisis *in silico* y Expresión Génica de Factores de Transcripción Relacionados con la Biosíntesis de Cutícula Durante la Maduración de Frutos de Guanábana (*Annona muricata* L.)" 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 Hector Adán Ruiz Ortega, 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 director(a) de tesis.



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

Dra. Graciela Caire Juvera
Directora General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado que me permitió realizar mis estudios de maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD) por abrirme sus puertas a sus instalaciones y permitirme formar parte de su institución para realizar mis estudios de maestría.

Al proyecto del programa de Investigadores por México del CONACyT (Cátedras) número 2463: "Transcriptómica de la cutícula de frutos tropicales" y al proyecto P00744003 (SH202208) "Genómica funcional y comparativa de la biosíntesis de la cutícula en plantas y frutos: hacia el entendimiento de su interacción con el ambiente" cuyo financiamiento permitió que se desarrollara este trabajo.

Al Dr. Miguel Ángel Hernández Oñate por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto, por creer en mí, por su infinita paciencia, por su comprensión, por su apoyo, por los consejos, por las enseñanzas, por siempre recordarme porque me gusta la ciencia, por siempre motivarme a seguir esforzándome y finalmente por su amistad. Muchas gracias por todo.

A mi comité de tesis por aceptarme como su alumno, por su tiempo, sus correcciones y sus consejos, los cuales fueron una valiosa contribución a este trabajo. Gracias.

Al Dr. José Manuel Villalobos Escobedo por su apoyo en la realización de este proyecto.

Al M.C Javier Ojeda por su amistad, compañía, sus consejos y por siempre estar dispuesto a ayudarme con cualquier duda que me surgiera.

A la Maestra Laura García por siempre haber respondido pacientemente todas mis preguntas desde mi ingreso al posgrado. Muchas gracias.

A todos los miembros del Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular de Plantas por hacerme sentir bienvenido, por su amistad, y el apoyo. Edmundo, Eduardo, Heriberto, Nallely, Jorge, Miranda, Paulina, Sergio, José y Dalilla.

A todo el personal de CIAD que directa o indirectamente me apoyaron durante mis estudios de maestría.

A mis compañeros de generación de maestría.

DEDICATORIA

A mis padres Irma y Leonardo. Por su apoyo incondicional, su cariño, su apoyo, sus consejos y su ejemplo...No solo durante esta etapa, sino durante todo el camino. Los quiero mucho.

A mis hermanos Ibor y Daniela. Por siempre apoyarme, aconsejarme y mostrarme su cariño a pesar de la distancia. Los quiero mucho y los extraño.

A Denisse Alejandra por haberme acompañado en esta aventura. Por siempre escucharme, comprenderme y apoyarme.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
CONTENIDO	7
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE CUADROS	14
RESUMEN	16
ABSTRACT	17
1. INTRODUCCIÓN	18
2. ANTECEDENTES	20
2.1. Generalidades de la Guanábana	20
2.2. Importancia Nutricional y Farmacológica de los Frutos de Guanábana	21
2.3. Cultivo de Guanábana en México y sus Limitaciones	22
2.3.1. Estrategias para Prolongar la Vida Poscosecha de Guanábana	24
2.4. La Cutícula y sus Implicaciones en la Vida Poscosecha de Frutos	25
2.4.1. Biosíntesis de Componentes Cuticulares	26
2.4.1.1. Síntesis <i>de novo</i> de ácidos grasos.....	26
2.4.1.2. Elongación de ácidos grasos.	27
2.4.1.3. Depósito de monómeros en el exterior celular.	28
2.4.2. Composición de Cutícula en Plantas y Frutos	29
2.5. Regulación de la Biosíntesis de la Cutícula	32
2.5.1. Factores de Transcripción, Reguladores Transcripcionales y su Relación con la Biosíntesis de Cutícula	34
2.6. Redes de Co-expresión Génica	39
2.6.1. Redes de Co-expresión Génica en Plantas Modelo	41
2.6.2. Redes de Regulación Génica en Frutos Tropicales	42
2.7. Genoma y Transcriptoma de Guanábana (<i>Annona muricata</i> L.).....	43
3. HIPÓTESIS	45
4. OBJETIVOS	46
4.1. Objetivo General.....	46
4.2. Objetivos Específicos	46
5. MATERIALES Y MÉTODOS	47
5.1. Datos Genómicos y Transcriptómicos Disponibles de Frutos de Guanábana.....	47
5.2 Identificación de Factores de Transcripción y Reguladores Transcripcionales	47

CONTENIDO (continuación)

5.2.1. Identificación de Factores de Transcripción y Reguladores Transcripcionales a Partir de Transcritos Ensamblados <i>de novo</i> , Guiados por Referencia y Proteínas Deducidas en el Genoma.....	48
5.2.2. Evaluación de la Cobertura y Redundancia de cada Set de Datos.....	49
5.2.3. Anotación Funcional de Factores de Transcripción y Reguladores Transcripcionales Identificados en Frutos de Guanábana.....	50
5.3. Clasificación de los Factores de Transcripción y Reguladores Transcripcionales Identificados en Frutos de Guanábana.....	50
5.4. Identificación de genes Ortólogos de Guanábana a Genes Relacionados con la Biosíntesis y Transporte de Componentes de la Cutícula.....	50
5.5. Agrupamiento Jerárquico de los Patrones de Expresión y Análisis de Expresión Diferencial.....	52
5.5.1 Análisis de los Patrones de Expresión de los Factores de Transcripción Relacionados con la Biosíntesis de Componentes de la Cutícula.....	52
5.5.2 Identificación de Genes Expresados Diferencialmente Durante la Vida Poscosecha de Frutos de Guanábana.....	53
5.6 Reconstrucción de la Red de Co-Expresión Génica del Transcriptoma de Frutos de Guanábana.....	53
6. RESULTADOS.....	55
6.1 Identificación de Factores de Transcripción y Reguladores Transcripcionales en el Transcriptoma de Frutos de Guanábana.....	55
6.1.1. Identificación de Factores de Transcripción y Reguladores Transcripcionales A Partir de las Proteínas Deducidas en el Genoma de Guanábana.....	55
6.1.2. Identificación de Factores de Transcripción y Reguladores Transcripcionales A Partir de Transcritos Ensamblados <i>de novo</i>	56
6.1.3. Identificación de Factores de Transcripción y Reguladores Transcripcionales A Partir de Transcritos Ensamblados con Genoma de Referencia.....	58
6.1.4. Evaluación de la Cobertura y Redundancia de Secuencias que Codifican para Factores de Transcripción en los Tres Grupos de Datos Analizados.....	59
6.1.5. Caracterización y Anotación Funcional de Transcritos que Codifican para Factores de Transcripción y Reguladores Transcripcionales.....	60
6.2. Clasificación por Familias de los Factores de Transcripción y Reguladores Transcripcionales Identificados en el Transcriptoma de Frutos de Guanábana.....	63
6.3. Identificación de Transcritos de Guanábana Ortólogos a los Genes Involucrados en la Biosíntesis de Cutícula.....	66
6.4. Análisis de los Patrones de Expresión de Factores de Transcripción y Reguladores Transcripcionales Durante la Maduración de Frutos de Guanábana.....	76
6.4.1. Análisis Exploratorio de los Patrones de Expresión de los Transcritos Ensamblados Durante la Maduración de los Frutos de Guanábana.....	76
6.4.1.1. Patrón de expresión de factores de transcripción.....	78
6.4.1.2. Patrón de expresión de los reguladores transcripcionales.....	79

CONTENIDO (continuación)

6.4.1.3. Patrón de expresión de los genes relacionados con la biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares.	81
6.4.2. Análisis de Expresión Diferencial de los Transcritos Ensamblados.....	84
6.4.2.1. Identificación de factores de transcripción expresados diferencialmente durante la maduración poscosecha de guanábana.....	84
6.4.2.2. Identificación de reguladores transcripcionales expresados diferencialmente durante la maduración poscosecha de los frutos de guanábana.	85
6.4.2.3. Identificación de genes de biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares expresados diferencialmente durante la maduración poscosecha de frutos de guanábana.	86
6.5. Análisis de la Red de Co-Expresión Génica del Transcriptoma de Frutos de Guanábana Durante la Maduración en Poscosecha	89
7. DISCUSIÓN.....	104
8. CONCLUSIONES.....	120
9. RECOMENDACIONES.....	121
10. REFERENCIAS	122

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Frutos de guanábana (<i>Annona muricata</i> L.) (Tomado de Janick y Paull, 2008).....	20
2. Síntesis <i>de novo</i> de ácidos grasos. El Acetil-CoA se convierte a Malonil-CoA por la enzima ACETIL-COA CARBOXILASA, después este pasa al complejo ÁCIDO GRASO SINTASA, donde una serie de reacciones formaran ácidos grasos de 16 o 18 carbonos. Modificado de Fatiha, 2019.....	27
3. Elongación de ácidos grasos para producir ácidos grasos de cadena muy larga.....	28
4. Ruta de biosíntesis de cutícula en plantas. La biosíntesis <i>de novo</i> de ácidos grasos se lleva a cabo en los plastos para formar ácidos grasos de 16 o 18 carbonos. Estos son transportados al retículo endoplasmático para ser elongados y producir ácidos grasos de cadena muy larga. Después, estos son transportados por proteínas de unión a ácidos grasos (FABP), transportadores ABC y proteínas transportadoras de lípidos (LTP).....	29
5. Ubicación y estructura de la cutícula. (Tomado de Tafolla-Arellano et al., 2013).....	30
6. Representación de una matriz (M) compuesta por G filas y N columnas, en donde G representa el número de genes y N el número de muestras (Weirauch, 2011).....	40
7. Diagrama de flujo. Curado manual de transcritos con hit a base de datos CuticulaDB.....	52
8. Comparación del número de proteínas deducidas en el genoma de guanábana consideradas como factores de transcripción en los tres análisis. BLAST (E-value < 1e-5) a las bases de datos de iTAK y PlanTFDB. HMM, predicción de FT usando las herramientas de predicción de las bases de datos iTAK (http://itak.feilab.net/cgi-bin/itak/online_itak.cgi) y PlanTFDB (http://plantfdb.gao-lab.org/prediction.php), las cuales usan Modelos Ocultos de Markov. InterPro, identificación de dominios funcionales comparando en la base de datos de InterPro.....	56
9. Comparación del número de transcritos ensamblados <i>de novo</i> que codifican para factores de transcripción identificados en cada uno de los tres análisis. BLAST (E-value < 1e-5) a las bases de datos de iTAK y PlanTFDB. HMM, predicción de FT usando las herramientas de predicción de las bases de datos iTAK (http://itak.feilab.net/cgi-bin/itak/online_itak.cgi) y PlanTFDB (http://plantfdb.gao-lab.org/prediction.php), las cuales usan Modelos Ocultos de Markov. InterPro, identificación de dominios funcionales comparando en la base de datos de InterPro...	57
10. Comparación del número de transcritos ensamblados con genoma de referencia que codifican para factores de transcripción identificados con las bases de datos iTAK y PlanTFDB.....	58

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura	Página
11. Factores de transcripción y reguladores transcripcionales identificados a partir de transcritos ensamblados con genoma de referencia. A) muestra el número de genes e isoformas. B) muestra el número de isoformas por gen que codifican para factores de transcripción. C) número de isoformas por gen que codifican para reguladores transcripcionales.....	61
12. Procesos biológicos en los que están involucrados los transcritos que se identificaron como factores de transcripción.....	62
13. Procesos biológicos en los que están involucrados los transcritos que se identificaron como reguladores transcripcionales.....	63
14. Los transcritos <i>evm.model.scaf_243.396</i> y <i>evm.model.scaf_116.35</i> fueron cercanos filogenéticamente con los factores de transcripción WIN1 y SHINE3 respectivamente (A). Además, presentaron un tamaño de secuencia similar y contienen el dominio AP2 que es característico de los factores de transcripción de la familia AP2 (B).....	76
15. Análisis de expresión de los transcritos ensamblados en donde se muestra la distribución de los niveles de expresión de los transcritos expresados (A) y los transcritos expresados en todos los estados de maduración poscosecha y los transcritos expresados en un estado de maduración en específico (B). MF = Maduración fisiológica, MC = Maduración comercial y SM = Sobremaduro.....	78
16. Factores de transcripción y reguladores transcripcionales expresados durante la maduración poscosecha de frutos de guanábana. Número total de factores de transcripción expresados en cada uno de los tres estados de maduración poscosecha de los frutos de guanábana (A). Número de factores de transcripción expresados en todos los estados de maduración y en un estado de maduración en específico (B). Número total de reguladores transcripcionales expresados en cada uno de los tres estados de maduración poscosecha de los frutos de guanábana (C). Número total de reguladores transcripcionales expresados en todos los estados de maduración y un estado de maduración poscosecha en específico (D). MF = Maduración fisiológica, MC = Maduración comercial y SM = Sobremaduro.....	80
17. Genes de biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares durante la maduración poscosecha de frutos de guanábana. Número total de genes expresados en cada uno de los tres estados de maduración poscosecha de los frutos de guanábana (A). Número de genes expresados en todos los estados de maduración y en un estado de maduración en específico (B). MF = Maduración fisiológica, MC = Maduración comercial y SM = Sobremaduro.....	82
18. Nivel de expresión de genes relacionados con la regulación, biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares durante la maduración poscosecha de frutos de guanábana.....	84

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura	Página
<p>19. Identificación de factores de transcripción y reguladores transcripcionales expresados diferencialmente durante la maduración poscosecha de frutos de guanábana. A) Número de factores de transcripción y reguladores transcripcionales inducidos y reprimidos en cada cambio de estado de maduración poscosecha. B) Número de factores de transcripción expresados diferencialmente en cada cambio de estado de maduración poscosecha. C) Número de reguladores transcripcionales expresados diferencialmente en cada cambio de estado de maduración poscosecha. MF_MC = Cambio de maduración fisiológica a maduración comercial; MC_SM = Cambio de maduración comercial a sobremaduro; MF_SM = Cambio de maduración fisiológica a sobremaduro.....</p>	86
<p>20. Número de genes de biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares expresados diferencialmente durante la maduración poscosecha de frutos de guanábana. A) Número de genes inducidos y reprimidos en cada cambio de estado de maduración poscosecha. B) Número de genes expresados diferencialmente en cada cambio de estado de maduración. MF_MC = Maduración fisiológica a maduración comercial; MC_SM = Maduración comercial a sobremaduro; MF_SM = Maduración fisiológica a sobremaduro; MCvsMF = Maduración fisiológica a maduración comercial; SMvsMC = Maduración comercial a sobremaduro; SMvsMF = Maduración fisiológica a sobremaduro.....</p>	87
<p>21. Mapa de calor de los transcritos relacionados con la regulación, biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares expresados diferencialmente durante la maduración poscosecha de frutos de guanábana. MF-MC: Madurez comercial vs Madurez fisiológica, MC-SM: Sobremaduro vs Madurez comercial, MF-SM: Sobremaduro vs Madurez fisiológica.....</p>	89
<p>22. Agrupamiento jerárquico de transcritos expresados durante la maduración poscosecha de frutos de guanábana ($cpm \geq 0.5$) de acuerdo con su patrón de expresión. Estos fueron agrupados en 22 grupos distintos. Las barras de diferentes colores entre el dendograma y el mapa de calor representan los diferentes grupos formados.....</p>	90
<p>23. Análisis de la topología de la red para varias potencias del softthreshold.....</p>	92
<p>24. Árbol creado en el paquete de R WGCNA para la agrupación jerárquica de los transcritos de acuerdo con su nivel de correlación. Cada “hoja” del árbol representa un transcrito y las diferentes ramificaciones del árbol fueron agrupadas en 110 módulos distintos.....</p>	93
<p>25. Agrupamiento jerárquico de acuerdo con el patrón de expresión durante la maduración poscosecha del fruto de guanábana de los transcritos presentes en el módulo greenyellow. Los genes en verde son reguladores transcripcionales, los genes en azul son factores de transcripción y los genes en negritas son genes de cutícula. MF = maduración fisiológica, MC = maduración comercial y SM = sobremaduro.....</p>	99

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura	Página
26. Agrupamiento jerárquico de acuerdo con el patrón de expresión durante la maduración poscosecha del fruto de guanábana de los transcritos presentes en el módulo yellow. Los genes en verde son reguladores transcripcionales, los genes en azul son factores de transcripción y los genes en negritas son genes de cutícula. MF = maduración fisiológica, MC = maduración comercial y SM = sobremaduro....	100
27. Agrupamiento jerárquico de acuerdo con el patrón de expresión durante la maduración poscosecha del fruto de guanábana de los transcritos presentes en el módulo darkgreen. Los genes en morado son genes de remodelación de pared celular y los genes en negritas son factores de transcripción. MF = maduración fisiológica, MC = maduración comercial y SM = sobremaduro.....	101
28. Red de co-expresión génica de los vecinos directos del factor de transcripción SHINE3 (nodo amarillo) dentro del módulo darkgreen. SHINE3 se co-expresa con 23 genes distintos, incluyendo una pectato liasa (nodo morado).....	102
29. Red de co-expresión génica de los vecinos directos del factor de transcripción MYB31 (nodo amarillo) dentro del módulo darkgreen. El factor de transcripción MYB31 se co-expresa con 38 genes distintos, incluyendo una pectato liasa (nodo azul), un transportador ABC (nodo rojo) y una poligalacturonasa (nodo morado).....	103
30. Modelo propuesto de la regulación de la remodelación de pared celular durante la maduración poscosecha de frutos de guanábana.....	118

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Producción de guanábana por entidad federativa en 2019 (SIAP, 2019).....	23
2. Factores de transcripción relacionados con biosíntesis de componentes cuticulares.....	37
3. Número de transcritos y proteínas que codifican para factores de transcripción y reguladores transcripcionales en cada uno de los tres grupos de datos y el porcentaje de factores de transcripción de Arabidopsis y tomate al que dieron hit.....	60
4. Número de factores de transcripción identificados para las 20 familias más representadas en el transcriptoma de frutos de guanábana.....	64
5. Número de reguladores transcripcionales identificados para las familias representadas en el transcriptoma de frutos de guanábana.....	65
6. Genes de biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares incluidos en la base de datos CuticulaDB.....	67
7. Factores de transcripción incluidos en la base de datos CuticulaDB.....	72
8. Genes que regulan la biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares a nivel postranscripcional y postraduccionales incluidos en la base de datos CuticulaDB.....	73
9. Lista de transcritos de guanábana ortólogos a factores de transcripción.....	74
10. Lista de transcritos de guanábana ortólogos a genes de biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares.....	75
11. Procesos biológicos en los que están involucrados los factores de transcripción que se expresan específicamente en uno de los estados de maduración poscosecha de los frutos de guanábana. MF = Maduración fisiológica, MC = Maduración comercial y SM = sobremaduro.....	80
12. Procesos biológicos en los que están involucrados los reguladores transcripcionales que se expresan específicamente en uno de los estados de maduración poscosecha de los frutos de guanábana. MF = Maduración fisiológica, MC = Maduración comercial...	81
13. Número de transcritos, factores de transcripción, reguladores transcripcionales y genes de cutícula presentes en los agrupamientos donde se presentaron los posibles nuevos reguladores de la biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares.....	91
14. Número de transcritos presentes en los 110 módulos de la red de co-expresión génica del transcriptoma de guanábana.....	94
15. Enriquecimiento funcional de módulos que contienen factores de transcripción y reguladores transcripcionales. El módulo Darkorange2 y Blue2 no presentaron enriquecimiento en proceso biológico, pero sí en función molecular y componente celular.....	98

LISTA DE CUADROS (continuación)

Cuadro	Página
16. Número de transcritos que codifican para factores de transcripción comparado con lo reportado para otras plantas en la base de datos iTAK.....	105
17. Número de transcritos que codifican para reguladores transcripcionales comparado con lo reportado para otras plantas en la base de datos iTAK.....	105
18. Número de miembros de factores de transcripción de las familias bHLH, MYB, AP2/ERF, bZIP y C2H2 identificadas en guanábana (<i>Annona muricata</i>) comparado con lo reportado en la base de datos iTAK para <i>Arabidopsis thaliana</i> , tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) y uva (<i>Vitis vinífera</i>).....	106
19. Número de factores de transcripción identificados para las familias bHLH, MYB, AP2/ERF, bZIP y C2H2 en guanábana (<i>Annona muricata</i>), <i>Arabidopsis</i> y tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) en estudios previos.....	106

RESUMEN

La guanábana (*Annona muricata* L.) es un fruto climatérico con un gran atractivo para su consumo debido a su alto valor nutricional y efectos positivos en la salud. México es uno de los principales productores de guanábana a nivel mundial. Sin embargo, nuestro país no es un importante exportador de este fruto en mercados internacionales, entre otras razones, debido a que este fruto presenta una corta vida poscosecha. Se ha reportado que la estructura y composición de la cutícula de frutos tiene un papel importante en la calidad y vida poscosecha de estos y que su biosíntesis está regulada a varios niveles, incluyendo el transcripcional, en donde los factores de transcripción participan en redes de regulación génica. No obstante, a pesar de que el conocimiento generado en un fruto o planta no necesariamente se puede generalizar a otros frutos, este tipo de estudios se han llevado a cabo principalmente en organismos modelo como *Arabidopsis* y tomate. Por lo tanto, es necesario llevar a cabo este tipo de estudios en frutos menos estudiados, como es el caso de la guanábana. Debido a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar factores de transcripción (FTs) y reguladores transcripcionales (RTs) que participan en la red de regulación que modula la biosíntesis de cutícula durante la maduración de los frutos de guanábana. Para esto, se realizó una búsqueda por homología en el genoma y transcriptoma de guanábana usando las bases de datos iTAK y PlanTFDB como referencia. Asimismo, se identificaron los ortólogos de guanábana a genes de cutícula y se determinaron sus cambios en los niveles de expresión durante la vida poscosecha de los frutos de guanábana. Se identificaron 1,887 FTs y 611 reguladores transcripcionales (RT) en el transcriptoma de frutos de guanábana, de los cuales 1,164 FT y 394 RT se expresaron diferencialmente durante la maduración poscosecha de los frutos, sugiriendo su posible rol regulatorio en los cambios fisiológicos y bioquímicos que sufren los frutos durante su maduración poscosecha. El análisis de la red de co-expresión mostró que el FT SHINE3 se co-expresa con genes que catalizan cambios en los polímeros de la pared celular, incluyendo una pectato liasa, lo cual sugiere una posible relación entre la biosíntesis de cutícula y la remodelación de la pared celular en frutos de guanábana. Este trabajo generó información que será útil para elucidar el mecanismo de biosíntesis de cutícula y el diseño de estrategias que ayuden a prolongar la vida poscosecha de la guanábana.

Palabras clave: guanábana, cutícula, vida poscosecha, co-expresión, regulación transcripcional

ABSTRACT

The soursop (*Annona muricata* L.) is a climacteric fruit with a great appeal for its consumption because of its high nutritional and pharmacological value. Mexico is one of the main global soursop producers. However, our country has not been able to position itself as an important exporter of this crop in international markets, mainly due to its short postharvest life. It has been reported that the structure and composition of cuticle in fruits plays an important role in the quality and postharvest life and that the biosynthesis of cuticle components is regulated at different levels, including the transcriptional level, where transcription factors are involved in gene regulatory networks. Nevertheless, studies focused on the elucidation of these gene regulatory networks have been carried out mainly in model fruits such as tomatoes. Due to the differences in the biochemical and physiological characteristics between fruits, the knowledge generated in model fruits cannot be generalized to other fruits. Therefore, it is necessary to perform studies oriented in less studied fruits, such as the soursop fruit. Because of this, the goal of the study is to identify and characterize transcription factors (TFs) involved in the cuticle biosynthesis in soursop fruits, to elucidate the gene regulatory network in which the TF identified participate and to determine changes in the expression of these TF during the ripening of the fruits. For this, the genome and transcriptome of soursop was compared with the databases iTAK and PlanTFDB by homology search using BLAST, then soursop orthologs to cuticle genes were identified and the expression changes of these genes through the ripening of the fruits was determined. We identified 1,887 TFs in the soursop transcriptome, of which 1,164 were differentially expressed through the postharvest ripening of soursop, suggesting their regulatory role in the biochemical and physiological changes that the fruit undergoes during their ripening. Moreover, SHINE3 TF is co-expressed along with various genes, including a pectate lyase, suggesting a possible relationship between cuticle biosynthesis and cell wall remodeling in soursop fruit. This study contributed to the knowledge generation of soursop fruits that will be useful to design strategies that will extend the postharvest life of soursop fruits.

Keywords: cuticle, co-expression, transcriptional regulation, postharvest life

1. INTRODUCCIÓN

La guanábana (*Annona muricata* L.) es un fruto climatérico originario de América, aunque fue introducido en las zonas tropicales de Asia y África (Jiménez-Zurita *et al.*, 2017). Este fruto tiene una amplia aceptación para su consumo debido a sus sabores y aromas agradables. Adicionalmente, existe un creciente interés en la guanábana en mercados como Europa o Estados Unidos debido a sus propiedades nutricionales y efectos positivos a la salud humana, ya que se ha reportado que este fruto presenta actividad antioxidante, antiviral, anticancerígena y antimicrobiana (Badrie y Schauss, 2010; Anaya-Dyck *et al.*, 2021).

México es uno de los principales productores de guanábana a nivel mundial. En 2019 se obtuvo una producción anual de más de 30 mil toneladas con un valor de 248 millones de pesos, siendo Nayarit el principal productor, con el 75% de la producción nacional (SIAP, 2019). Sin embargo, este fruto además de ser susceptible a daño físico y al ataque de patógenos, presenta una vida poscosecha corta debido a su alta tasa de respiración y producción de etileno, la cual se reduce aún más cuando no se realiza el manejo poscosecha apropiado (Tovar-Gómez *et al.*, 2011; De los Santos-Santos *et al.*, 2020). Por esta razón, aunque México es un importante productor de guanábana, no ha logrado consolidarse como un proveedor importante en mercados internacionales (Anaya-Dyck *et al.*, 2021). Por lo que es necesario llevar a cabo estudios dirigidos a aportar información para diseñar estrategias que aseguren una vida poscosecha de la guanábana más prolongada que permita su comercialización en mercados internacionales.

La vida poscosecha de los frutos depende de varios factores, incluyendo el manejo de los frutos y aspectos fisiológicos intrínsecos de los frutos, entre otros. Estudios en la composición y propiedades físicas de la cutícula han demostrado que esta estructura tiene un papel importante en la calidad del fruto y su vida en postcosecha (Lara *et al.*, 2015). La cutícula es una estructura hidrofóbica que separa al fruto del medio externo, protegiéndolo de la desecación, daño mecánico y el ataque de patógenos (Samuels *et al.*, 2008). Además, la cutícula tiene un rol importante en procesos como el desarrollo y la fisiología del fruto y la interacción con otros organismos. La biosíntesis de la cutícula de los frutos involucra a grandes rasgos la producción *de novo* de ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA) en células epidermales, su posterior transporte y acumulación en la capa externa de los frutos (Samuels *et al.*, 2008; Tafolla-Arellano *et al.*, 2013). Este es un proceso

altamente coordinado y regulado a varios niveles, incluyendo la regulación a nivel transcripcional mediada por proteínas denominadas factores de transcripción, las cuales regulan en qué momento y a qué nivel se expresan los genes relacionados con la biosíntesis de los componentes de la cutícula. En organismos modelo como *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) y tomate (*Solanum lycopersicum*) se han identificado algunos factores de transcripción de la familia AP2/ERF que controlan la expresión de diversos genes implicados en la acumulación de ceras como CER1, KCS1, ACLA2, entre otros (Broun 2004; Hen-Avivi *et al.*, 2013).

Con el constante avance de las tecnologías de secuenciación masiva de DNA y el surgimiento de herramientas computacionales cada vez más poderosas, se han identificado varios genes relacionados con la cutícula y se ha sugerido la presencia de una red de regulación génica que modula la biosíntesis de los componentes de la cutícula, la cual en su mayoría es desconocida, sobre todo en plantas no modelo (Adato *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2016). Identificar y caracterizar los factores de transcripción, reguladores transcripcionales y los genes relacionados a estas redes de regulación génica generará información relevante sobre la elucidación de los mecanismos que controlan la biosíntesis de los componentes de la cutícula en plantas no modelo como la guanábana. En un futuro, esta información ayudará a diseñar estrategias que permitan mejorar la calidad de los frutos, la resistencia a estrés biótico y abiótico y la vida poscosecha de este cultivo. A la fecha son pocos los estudios de este tipo realizados en frutos tropicales y aún más escasos en frutos del género *Annona*, como la guanábana. Por lo tanto, debido a la importancia económica que representa este fruto para México, es necesario llevar a cabo estudios que permitan identificar los factores de transcripción y reconstruir la red de regulación génica que modula el mecanismo molecular de la biosíntesis de cutícula de los frutos de guanábana.

2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades de la Guanábana

La guanábana (*Annona muricata* L.) es un árbol clasificado como angiosperma, perteneciente a la familia Annonaceae y género *Annona* que alcanza una altura de entre 3 a 10 m. Este árbol es originario de las zonas tropicales de América, aunque fue introducido en Asia y África (Jiménez-Zurita *et al.*, 2017). Los frutos de la guanábana son en su mayoría más largos que anchos, con forma irregular o semejante a la de un corazón y con un peso entre 0.5 hasta los 5 kg que depende en gran medida del grado de polinización de la flor (Janick y Paull, 2008). Una vez que el fruto llega a su estado maduro, la parte exterior adquiere un color verde con consistencia blanda y la pulpa posee una tonalidad blanca, jugosa, suave, aromática y contiene un gran número de semillas negras de aproximadamente 2 cm de longitud (Figura 1) (Janick y Paull, 2008; Jiménez-Zurita *et al.*, 2017).

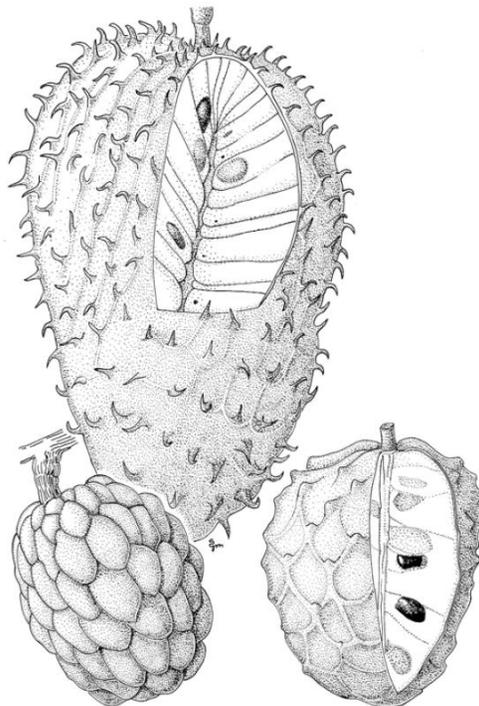


Figura 1. Frutos de guanábana (*Annona muricata* L.) (Tomado de Janick y Paull, 2008).

El fruto de guanábana es climatérico, por lo que durante la poscosecha muestra un valor máximo claramente definido de respiración y producción de etileno (Jiménez-Zurita *et al.*, 2017). Una vez que la polinización de la flor del árbol de guanábana se llevó a cabo, estas pasan a un periodo de inactividad que dura entre 6 a 15 semanas que se caracteriza por un oscurecimiento de los estigmas. Después comienza la maduración del fruto y tarda entre 15 y 21 semanas en llegar a la maduración fisiológica que es cuando el fruto es cosechado (Worrell *et al.*, 1994). Inmediatamente después de ser cosechado se puede detectar una producción de CO₂ de 100 mL/kg*h seguido de un incremento de más de 250 mL/kg*h de CO₂ en el cuarto día de poscosecha y un segundo incremento hasta 350 mL/kg*h de CO₂ en el sexto día poscosecha. En cuanto a la producción de etileno, esta presenta su valor máximo después del primer incremento en la producción de CO₂, alcanzando una producción mayor a 250 mL/Kg*h acompañado de un ablandamiento del fruto de guanábana (Worrell *et al.*, 1994). Esta tasa de respiración y producción de etileno tan altas tiene implicaciones fisiológicas importantes, como por ejemplo un acelerado cambio en la textura, consistencia, color y el sabor de la pulpa del fruto.

2.2. Importancia Nutricional y Farmacológica de los Frutos de Guanábana

El fruto de la guanábana posee sabores y aromas característicos agradables que hacen al fruto atractivo para su consumo. La parte comestible de la guanábana es la pulpa y consta del 67.5% de la fruta, esta posee un 80% de agua, 18% de carbohidratos, y 1% de proteína (Janick y Paull, 2008). Después del agua, los azúcares son el componente principal en la pulpa del fruto de guanábana, constituyendo casi el 70% de los sólidos totales presentes en la pulpa, siendo la glucosa y fructosa la gran mayoría de azúcares presentes (Badrie y Schauss, 2010). Además, se han encontrado diversos aminoácidos libres presentes en la guanábana como la prolina, ácido glutámico, ácido aspártico, serina, glicina, alanina, cisteína, arginina y lisina (Badrie y Schauss, 2010). También se ha reportado que la guanábana es fuente de vitamina B y C, además de aportar una alta cantidad de potasio (Janick y Paull, 2008). Por lo tanto, además de su sabor agradable, el fruto de guanábana presenta un valor nutricional alto, lo cual la convierte en una fruta atractiva para su consumo. Los compuestos volátiles presentes en el fruto de guanábana juegan un papel importante en el olor

característico y agradable del fruto de guanábana. Se han reportado alrededor de 114 compuestos volátiles distintos, donde los mayores participantes en la determinación del sabor del fruto de guanábana en su estado maduro son el metil butenoato, metil hexanoato, metil (E)-2-butenoato y metil (E)-2-hexanoato (Cheong *et al.*, 2010).

Por otro lado, la otra razón por la cual existe un gran interés en el consumo de guanábana se debe a que se le atribuyen diversas propiedades benéficas para la salud del ser humano. Este fruto ha sido utilizado en diferentes partes del mundo en la medicina tradicional para el tratamiento de fiebre, problemas de riñón y diversos síntomas relacionados con infecciones gastrointestinales (Badrie y Schauss, 2010). Existen reportes que indican que la guanábana posee propiedades farmacológicas como antioxidante, bactericida, antimutagénico, antiviral, anticancerígeno, entre otras; debido a la presencia de acetogeninas y de otros metabolitos secundarios (Naik y Sellappan, 2020; Nguyen *et al.*, 2020).

2.3. Cultivo de Guanábana en México y Sus Limitaciones

El cultivo de guanábana es una actividad de gran relevancia para México ya que es uno de los principales países productores de esta fruta. Según datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (2019), en el año 2019 la producción en México fue de aproximadamente 30,790 toneladas de guanábana, representando un valor de producción de 248 millones de pesos. La producción nacional de guanábana se lleva a cabo en 9 estados de la república, siendo Nayarit el líder con el 75% de la producción total del país, seguido de Colima representando el 9%, Michoacán 9% y Guerrero, Veracruz, Puebla, Tabasco, Jalisco y Campeche representando el restante 7% de la producción (Cuadro I) (SIAP, 2019). En el estado de Nayarit, la producción de guanábana se concentra en los municipios de Santiago, Tepic y Compostela (SIAP, 2019). Debido a lo anterior, el cultivo de la guanábana representa una importante fuente de ingresos para quienes se dedican a su cultivo y comercialización.

Cuadro 1. Producción de guanábana por entidad federativa en 2019 (SIAP, 2019).

Estado	Producción anual (Toneladas)	Producción nacional
Nayarit	23,230	75%
Colima	2,832	9%
Michoacán	2,781	9%
Otros	1,076	7%

Debido a su comportamiento como fruto climatérico, la guanábana es un fruto altamente perecedero, ya que cuando es cosechado en madurez fisiológica y almacenado a temperatura ambiente, alcanza la maduración comercial en 6 días y debe ser consumido en los siguientes 4 a 8 días posterior a su cosecha (Jiménez-Zurita *et al.*, 2017; De los Santos-Santos *et al.*, 2020). Aunado a esto, la guanábana es un fruto susceptible a daño físico y ataque de patógenos, por lo que un manejo poscosecha inadecuado reduce de manera significativa la vida poscosecha del fruto (Tovar-Gómez *et al.*, 2011; De los Santos-Santos *et al.*, 2020). De hecho, como consecuencia del inadecuado manejo poscosecha de la guanábana, se estima que se producen pérdidas de casi el 60% del valor de la cosecha (Tovar-Gómez *et al.*, 2011). Debido a lo anterior, el transporte de la guanábana, así como su exportación resultan sumamente complicadas.

Como consecuencia de la difusión de las propiedades medicinales que se le atribuyen a la guanábana, este fruto ha ganado popularidad en mercados internacionales muy lucrativos como Estados Unidos y Europa (Anaya-Dyck *et al.*, 2021). Sin embargo, a pesar de ser uno de los principales productores a nivel mundial, México no ha logrado consolidarse como un proveedor importante de guanábana en mercados internacionales (Anaya-Dyck *et al.*, 2021). Por lo mencionado anteriormente, resulta evidente la necesidad de llevar a cabo estudios dirigidos a aportar información que aseguren una vida poscosecha de la guanábana más prolongada que permita su comercialización en mercados internacionales.

El desarrollo de los frutos se puede dividir en tres etapas: crecimiento y desarrollo, maduración, y senescencia (Martínez-González *et al.*, 2017). Este es un proceso coordinado y programado genéticamente que involucra una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos irreversibles que al final dan como resultado frutos comestibles con características organolépticas deseables (Prasanna

et al., 2007). El periodo de desarrollo se caracteriza por un aumento en el tamaño del fruto hasta alcanzar un punto máximo, considerado como la etapa de maduración fisiológica y el momento en el cual muchos frutos son cosechados. A partir de este momento los frutos comienzan a experimentar cambios en cuanto a la coloración, la textura, contenido de azúcares y aumento en la susceptibilidad al ataque de patógenos; estos cambios continuarán hasta el inicio de la senescencia (Martínez-González *et al.*, 2017).

Los cambios en coloración de los frutos se deben a la degradación de clorofilas, además de la síntesis y acumulación de carotenoides, antocianinas y otros compuestos volátiles en la cutícula de los frutos, lo cual tiene una gran importancia nutricional, ya que estos dos pigmentos son fuente de vitamina A y antioxidantes (Prasanna *et al.*, 2007; Martínez-González *et al.*, 2017). La modificación de la textura del fruto es uno de los principales cambios que se asocia al deterioro poscosecha de los frutos. Este proceso sucede durante la maduración de los frutos y es causado por la actividad de enzimas modificadoras de la pared celular como las expansinas, poligalacturonasa, pectinmetilesterasa, β -galactosidasa, entre otras enzimas hidrolíticas (Martínez-González *et al.*, 2017).

El etileno es la hormona encargada de regular los cambios que experimentan los frutos en la etapa de maduración. Esta hormona se produce en bajas cantidades durante el proceso de maduración fisiológica. Sin embargo, en frutos climatéricos, hay un aumento en la producción de esta hormona que induce cambios morfológicos y fisiológicos en los frutos relacionados con su maduración, entre los cuales se puede mencionar cambio en el color, textura, aroma y sabor (Yang y Oetiker, 1994). No obstante, como se mencionó anteriormente, algunos de estos cambios reducen la vida poscosecha de los frutos. Debido a esto, los efectos de esta hormona son de gran importancia en la agricultura y se han implementado diversas estrategias para controlar la biosíntesis o acción de etileno por parte del fruto y de esta forma alargar la vida poscosecha y disminuir las pérdidas.

2.3.1. Estrategias para Prolongar la Vida Poscosecha de Guanábana

Actualmente existen diversas estrategias que han sido implementadas para disminuir las pérdidas poscosecha de diversos frutos, así como para prolongar su vida de anaquel. Entre estas estrategias se encuentra el almacenamiento a bajas temperaturas y la aplicación de ceras o emulsiones

(Berumen-Varela *et al.*, 2019). Estas estrategias también han sido implementadas en guanábana y han prolongado con éxito la vida poscosecha de este fruto.

En un estudio lograron retrasar la maduración entre 4 y 5 días después de almacenar frutos de guanábana a 16°C (Espinosa *et al.*, 2013). Mientras que, en otros estudios se ha reportado daños por frío en frutos de guanábana almacenados a temperaturas menores de 12°C (Castillo-Ánimas *et al.*, 2005). Por otro lado, el uso de compuestos que inhiben la acción del etileno ha mostrado efectos positivos en el incremento de la vida poscosecha de los frutos, tal es el caso del 1-metilciclopropeno (1-MCP). Un ejemplo de esto es un estudio donde se demostró que la aplicación de 1-MCP a frutos de guanábana disminuye la tasa de respiración y producción de etileno, sin embargo, este tratamiento mostró una disminución en la capacidad antioxidante y el contenido de flavonoides y fenoles (Siang *et al.*, 2019). Por otra parte, la aplicación simultánea de emulsiones a base de ceras de candelilla y 1-MCP resultó en frutos de guanábana con 9 días más de vida poscosecha en comparación con frutos de guanábana sin tratamiento (Tovar-Gómez *et al.*, 2011; González *et al.*, 2014). Adicionalmente, se ha reportado que frutos de guanábana tratados simultáneamente con ceras de candelilla y 1-MCP presentaron una vida poscosecha más prolongada sin mostrar afectaciones en sus parámetros nutricionales (Moreno-Hernández *et al.*, 2014). Por tanto, la combinación de bajas temperaturas con la aplicación simultánea de 1-MCP y ceras son estrategias que pueden ser utilizadas para prolongar la vida poscosecha de la guanábana.

No obstante, aunque las estrategias mencionadas anteriormente han demostrado ser efectivas para la prolongación de la vida poscosecha de la guanábana, estas no aportan información acerca de los mecanismos implicados en el proceso de maduración de los frutos. Comprender de mejor manera estos mecanismos permitirá profundizar en el proceso de desarrollo y maduración de este fruto, lo cual será importante para el diseño de estrategias para mejorar la calidad y la vida poscosecha de los frutos de guanábana.

2.4. La Cutícula y Sus Implicaciones en la Vida Poscosecha de Frutos

Las primeras plantas terrestres aparecieron hace aproximadamente 500 millones de años, provenientes de plantas acuáticas ancestrales (Kong *et al.*, 2020). El cambio de un ambiente

acuático a uno terrestre provocó que estas plantas estuvieran expuestas a una serie de factores de estrés como la desecación, daño mecánico, una mayor radiación ultravioleta y la exposición a ataques por patógenos (Kong *et al.*, 2020). Para protegerse de los factores de estrés presentes en los ambientes terrestres, las plantas desarrollaron la capacidad de sintetizar una cutícula, la cual es una estructura hidrofóbica que separa los órganos aéreos no leñosos de la planta con el medio externo (Kong *et al.*, 2020; García-Coronado *et al.*, 2022).

2.4.1. Biosíntesis de Componentes Cuticulares

La biosíntesis de componentes de la cutícula es una tarea de gran relevancia para las plantas. Evidencia de lo anterior es el gran número de genes y la alta cantidad de energía que las células epidermales invierten en la producción de cutícula, por ejemplo, en *Arabidopsis*, más de la mitad de los ácidos grasos sintetizados por las células epidermales va dirigido a la producción de lípidos cuticulares (Samuels *et al.*, 2008; Yeats y Rose, 2013). Se han propuesto diversas hipótesis en cuanto a la biosíntesis de los compuestos cuticulares y aunque aún no se conocen a profundidad los mecanismos de transporte involucrados, se sabe que es un trabajo coordinado de múltiples enzimas que requieren ATP y CoA (Tafolla-Arellano *et al.*, 2013). En general, el proceso de biosíntesis de cutícula se puede dividir en tres pasos principales que ocurren exclusivamente en las células epidermales; síntesis *de novo* de ácidos grasos, elongación de los ácidos grasos y el depósito de monómeros en el exterior de la pared celular (Tafolla-Arellano *et al.*, 2013). A continuación, se abordará con un poco más detalle cada una de las etapas.

2.4.1.1. Síntesis de novo de ácidos grasos. De manera general, el primer paso en el proceso de biosíntesis de cutícula es la síntesis *de novo* de los ácidos grasos, para ello se necesita la enzima ACETIL-COA CARBOXILASA y el complejo enzimático llamado ÁCIDO GRASO SINTASA. La enzima ACETIL-COA CARBOXILASA se encarga de formar malonil-CoA a partir de acetil-CoA, mientras que el complejo enzimático ÁCIDO GRASO SINTASA, conformado por enzimas como la β -CETOACIL-ACP SINTASA, β -CETOACIL-ACP REDUCTASA, 3-HIDROXIACIL-

ACP DESHIDRATASA y ENOIL-ACP REDUCTASA, se encarga de llevar a cabo sucesivas reacciones de condensación y reducción para añadir 2 átomos de carbono en una cadena de acilos, proceso que se llevará a cabo de manera cíclica hasta obtener ácidos grasos de 16 o 18 carbonos (Figura 2) (Samuels *et al.*, 2008; Fatiha, 2019). Este proceso se lleva a cabo en los plastos de las células epidermales (Fatiha, 2019).

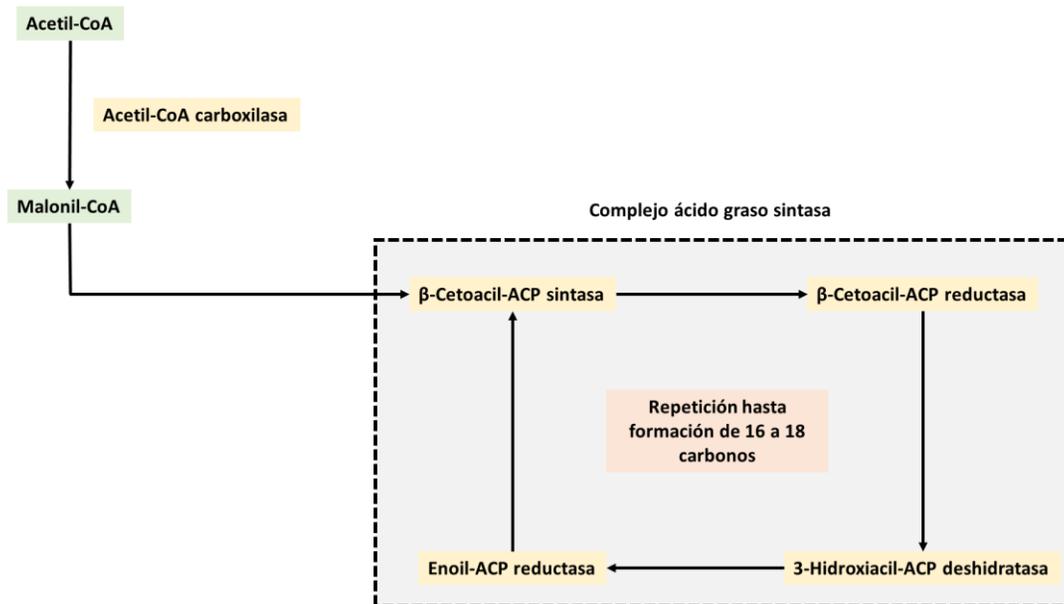


Figura 2. Síntesis *de novo* de ácidos grasos. El Acetil-CoA se convierte a Malonil-CoA por la enzima ACETIL-COA CARBOXILASA, después este pasa al complejo ÁCIDO GRASO SINTASA, donde una serie de reacciones formaran ácidos grasos de 16 o 18 carbonos. Modificado de Fatiha, 2019.

2.4.1.2. Elongación de ácidos grasos. Una vez que los ácidos grasos de 16 y 18 carbonos son sintetizados en los plastos, estos son transportados al retículo endoplasmático para su elongación y formar ácidos grasos de cadena muy larga con una longitud de entre 20 y 34 carbonos. Este proceso es realizado por un complejo enzimático llamado ÁCIDO GRASO ELONGASA, que de manera muy similar a la síntesis *de novo* de ácidos grasos, se lleva a cabo un ciclo de cuatro reacciones enzimáticas en donde por cada ciclo se añaden dos carbonos a la cadena de acilo (Samuels *et al.*, 2008). Primeramente, el malonil-CoA se condensa con la acción de las enzimas β-CETOACIL-COA SINTASAS (KCS), después ocurre una reducción de la β -cetoacil-CoA por la acción de las enzimas β-CETOACIL-COA REDUCTASA (KCR), la síntesis de enoil-CoA por la enzima β-

HIDROXIACIL-COA DESHIDRATASA (HDC) y, por último, la reducción del enoil-CoA por la enzima ENOIL-COA REDUCTASA (ECR) (Figura 3) (García-Coronado *et al.*, 2022). Adicionalmente, se ha reportado que algunos genes del grupo ECERIFERUM (CER) como CER2 y CER26 están involucrados en la elongación de los ácidos grasos a una longitud superior a 28 carbonos (Kong *et al.*, 2020). Posterior a la elongación, ocurren reacciones de reducción y descarboxilación, las cuales modifican a los ácidos grasos de cadena muy larga para dar lugar a alcoholes, aldehídos, alcanos, ésteres y cetonas (Shepherd y Wynne, 2006).

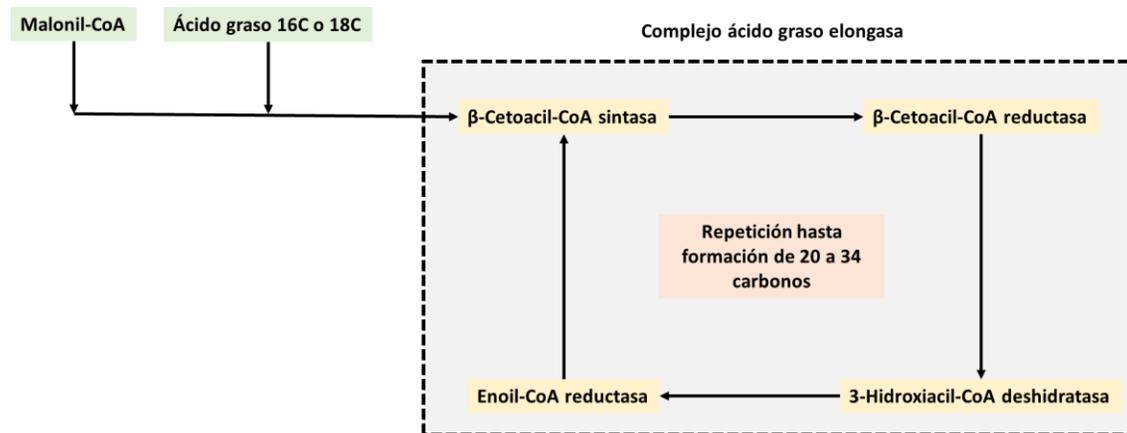


Figura 3. Elongación de ácidos grasos para producir ácidos grasos de cadena muy larga.

2.4.1.3. Depósito de monómeros en el exterior celular. En esta etapa los compuestos sintetizados son transportados fuera de la célula, el mecanismo de transporte aún no está completamente descrito; sin embargo, se propone que posterior a la elongación y modificación de los ácidos grasos en el retículo endoplasmático, estos se unen a proteínas llamadas proteínas de unión a ácidos grasos (FABP), las cuales los transporta a la membrana plasmática, uniendo a los ácidos grasos a transportadores tipo ABC (Tafolla-Arellano *et al.*, 2013). Estos transportadores se encargarán de transportar los ácidos grasos hacia fuera de la célula, dando paso a la unión de estos a proteínas de transferencia de lípidos (LTP) que se encargará de depositar los ácidos grasos en la cutícula (Figura 4) (Tafolla-Arellano *et al.*, 2013).

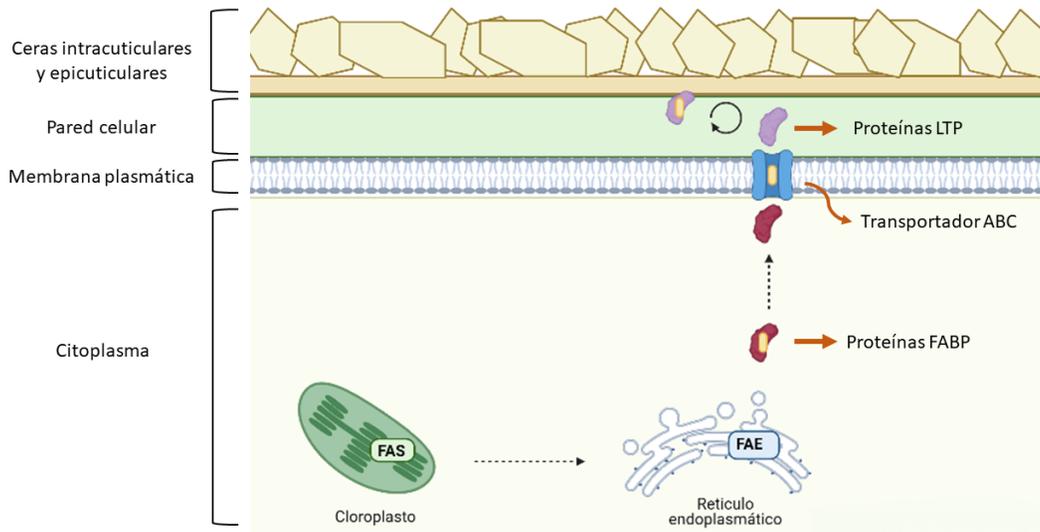


Figura 4. Ruta de biosíntesis de cutícula en plantas. La biosíntesis *de novo* de ácidos grasos se lleva a cabo en los plastos para formar ácidos grasos de 16 o 18 carbonos. Estos son transportados al retículo endoplasmático para ser elongados y producir ácidos grasos de cadena muy larga. Después, estos son transportados por proteínas de unión a ácidos grasos (FABP), transportadores ABC y proteínas transportadoras de lípidos (LTP).

2.4.2. Composición de Cutícula en Plantas y Frutos

Aunque pueden existir variaciones en la composición de la cutícula de una planta debido a diversos factores como la especie, el tipo de órgano, su estado de desarrollo o las condiciones ambientales, la gran mayoría de las distintas cutículas están conformadas en general por cutina y ceras cuticulares (Samuels *et al.*, 2008). La cutina es el mayor componente que constituye a la cutícula de las plantas, representando entre el 40 y 80% del peso total de la cutícula. Esta es un polímero que consta de ácidos grasos mayores a 16 carbonos y glicerol y debido a que forma uniones covalentes, la protección contra el daño mecánico que la cutícula le ofrece a la planta es debido principalmente a la presencia de cutina (Samuels *et al.*, 2008). Por otro lado, las ceras cuticulares que componen el resto de la masa total de la cutícula están formadas por compuestos lipofílicos de cadena muy larga (más de 20 carbonos) como ácidos grasos, alcoholes, aldehídos, alcanos, ésteres y cetonas (Samuels *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2020). Adicionalmente, se ha visto que las ceras cuticulares pueden incluir metabolitos secundarios como terpenoides, compuestos fenólicos y flavonoides (Samuels *et al.*, 2008).

Las ceras cuticulares se pueden dividir en ceras epicuticulares y ceras intracuticulares, estas poseen diferencias en cuanto a sus componentes químicos y su ubicación en la cutícula. Mientras que las ceras intracuticulares presentan ácidos grasos de cadena corta y se encuentran intercaladas dentro del polímero de cutina, las ceras epicuticulares presentan ácidos grasos de cadena larga y se encuentran ubicados en la superficie exterior de la cutina, formando una capa de cristales discontinuos (Figura 5) (Tafolla-Arellano *et al.*, 2013).

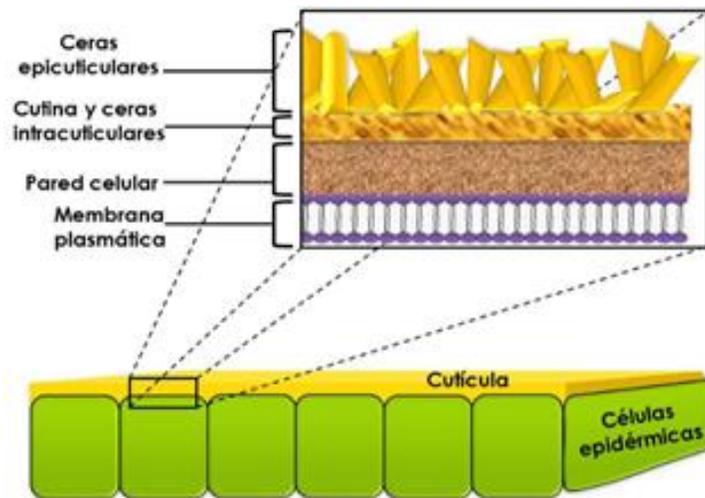


Figura 5. Ubicación y estructura de la cutícula. (Tomado de Tafolla-Arellano *et al.*, 2013).

Como se mencionó anteriormente, una de las principales funciones de la cutícula en las plantas y frutos es protegerlas de diversos factores de estrés tanto bióticos como abióticos, por lo que se puede ver a la cutícula como una barrera que separa a las plantas y frutos del medio externo y los protege de diversos factores de estrés bióticos y abióticos, como el ataque de patógenos, desecación, radiación UV, entre otros. En este sentido, debido a que las plantas pueden habitar en una gran variedad de ambientes con factores de estrés bióticos y abióticos específicos, es común que existan diferencias entre distintas especies en cuanto a la composición de los monómeros que forman la cutina, así como del contenido y características de las ceras epicuticulares e intracuticulares y el contenido de compuestos fenólicos, alcoholes, cetonas, flavonoides, entre otros compuestos (Tafolla-Arellano *et al.*, 2013; Lara *et al.*, 2015).

En *Arabidopsis thaliana* se reporta que el mayor componente de las ceras cuticulares en hojas y tallos son los alcanos (Tafolla-Arellano *et al.*, 2013). Con respecto al tomate (*Solanum*

lycopersicum), se ha reportado que las ceras cuticulares de este fruto consisten principalmente de triterpenoides y alcanos de cadena muy larga, en particular el hentriacontano, el cual presenta 31 carbonos (Lara *et al.*, 2015). En cuanto al pimiento (*Capsicum* sp.) el principal componente de la cutícula son monómeros de cutina de 16 carbonos, además de hentriacontano como componente fundamental en las ceras cuticulares, aunque diversas variedades de pimiento también presentan triterpenoides como componente dominante en las ceras cuticulares (Lara *et al.*, 2015).

En el caso de los frutos, además de presentar diferencias en la composición de los componentes cuticulares entre diferentes especies, también se ha visto que en frutos de la misma especie se pueden presentar variaciones en los componentes cuticulares durante su proceso de maduración. Esto debido a que durante este proceso ocurren varios fenómenos como la producción de pigmentos antioxidantes, la producción de compuestos volátiles, la producción de azúcares y la depolimerización de la pared celular, provocando cambios morfológicos en los frutos como el cambio de color y el ablandamiento, lo cual, aunque es deseado en los frutos comestibles, estos cambios favorecen la pérdida de agua y la susceptibilidad al ataque por patógenos, lo cual en última instancia, disminuye el tiempo de almacenamiento del fruto (Lara *et al.*, 2019; García-Coronado *et al.*, 2022).

En mandarina, se ha reportó que en frutos inmaduros existe una mayor abundancia de ácidos grasos en ceras epicuticulares e intracuticulares en comparación con frutos maduros en donde además aumenta el contenido de alcanos, lo cual provoca una disminución en la pérdida de agua de los frutos, demostrando como la composición de la cutícula tiene un efecto en la permeabilidad de los frutos durante su proceso de maduración (Báez-Sañudo *et al.*, 1992). En tomate (*Solanum lycopersicum*), se reportó un aumento en el contenido de cutina y triterpenoides durante la maduración del fruto (Kosma *et al.*, 2010), contrario a lo que se ha reportado en frutos de cereza (*Prunus avium*), donde se ha visto que el contenido de cutina y triterpenos disminuye durante la maduración de este fruto (Peschel *et al.*, 2007). En el caso del mango (*Mangifera indica*), se reportó que el contenido de cutina y ceras epicuticulares aumenta durante la maduración del fruto (Petit-Jiménez, *et al.*, 2007). Por esta razón, en los últimos años se han relacionado las características de la cutícula de los frutos con el proceso de maduración de estos. De hecho, existe un trabajo en donde se propone que la señal que inicia la maduración de los frutos proviene de la cutícula (Hernández-Oñate, en revisión).

Aunado a lo anterior, la composición y estructura de la cutícula de los frutos tienen un papel importante en la calidad y vida poscosecha de estos. Mediante estudios con frutos de tomate

(*Solanum lycopersicum*) se ha correlacionado la producción de etileno, degradación de la pared celular y el color con cambios en la composición cuticular (Tafolla-Arellano *et al.*, 2018). Asimismo, se identificó una variedad de tomate denominada Deterioro Lento del Fruto (Delayed Fruit Deterioration, DFD, por sus siglas en inglés), donde se observó que esta variedad de tomate presenta un ablandamiento del fruto más lento comparado con la variedad de tomate Ailsa Craig, llegando a permanecer almacenados a temperatura ambiente por hasta seis meses en condiciones óptimas de consumo (Saladie *et al.*, 2007). Al comparar la expresión de genes relacionados con la remodelación de la pared celular y las características cuticulares en tomates de la variedad Ailsa Craig y DFD, se observó que, aunque la expresión de los genes de remodelación de la pared celular son similares en ambas variedades de tomate, el tomate DFD presenta una mayor acumulación de ceras en su cutícula (Saladie *et al.*, 2007). Esto demostró que el ablandamiento de los frutos y a su vez la vida poscosecha de los frutos está influenciada por la composición de la cutícula. Igualmente, se ha observado que existen cambios en la composición de la cutícula del pimiento (*Capsicum annum*) relacionados con la pérdida de agua en el periodo poscosecha (Tafolla-Arellano *et al.*, 2013). Estos reportes indican que la cutícula no solo protege a los frutos durante su desarrollo, sino que también tiene un rol importante durante su maduración, en la calidad y el mantenimiento de estos durante su vida de anaquel. Por lo tanto, los estudios dirigidos a estudiar tanto las características de la cutícula de los frutos, así como los mecanismos que controlan los cambios durante la vida poscosecha de estos permitirá el diseño de estrategias que ayuden a prolongar la vida poscosecha de los frutos.

2.5. Regulación de la Biosíntesis de la Cutícula

Las plantas son organismos sésiles que constantemente se enfrentan a diversos factores de estrés tanto abióticos como bióticos, además de que, a lo largo de su ciclo de vida, deben llevar a cabo tareas específicas para asegurar su supervivencia. Por lo tanto, estas se vieron obligadas a desarrollar mecanismos para responder a su ambiente con el fin de asegurar un crecimiento óptimo. La biosíntesis de componentes cuticulares en frutos es un proceso complejo que está siendo regulado a distintos niveles incluyendo el nivel transcripcional, en el cual se encuentran involucrados distintos factores de transcripción y reguladores transcripcionales. Lo interesante es

que a pesar de que los frutos presentan variaciones en cuanto a sus características cuticulares debido a las diferencias fisiológicas de cada fruto, parece ser que la biosíntesis de los componentes cuticulares es un proceso evolutivamente conservado en el cual en la mayoría de los frutos actúa un mecanismo de regulación similar entre ellos (García-Coronado *et al.*, 2022).

Debido a la importancia que tiene la cutícula como protección de las plantas y tomando en cuenta las diferentes tareas que deben cumplir durante su desarrollo, es de esperarse que la biosíntesis de componentes cuticulares se regula constantemente durante el crecimiento y desarrollo de las plantas y frutos mediante la acción de diversas hormonas como el etileno, el ácido abscísico y las giberelinas (Hen-Avivi *et al.*, 2013). Como se mencionó anteriormente, la aplicación de etileno incrementa la producción y acumulación de ceras en frutos de naranja y manzana (Ju y Bramlage, 2001; Cajuste *et al.*, 2010). Por otro lado, se ha demostrado que el ácido abscísico regula la biosíntesis de cutícula en hojas de tomate, no solo como respuesta a estrés hídrico, sino que también durante el desarrollo de la planta (Martin *et al.*, 2017). De la misma forma, aunque el mecanismo molecular por el cual las giberelinas influyen en la biosíntesis de la cutícula sigue sin ser entendido a profundidad, existen reportes que mencionan como la aplicación de giberelinas resultó en un incremento en la biosíntesis de cutícula en frutos de tomate y manzana (Knoche y Peschel, 2007; Barandoozi y Talaie, 2009).

Además de la regulación por hormonas durante el desarrollo de las plantas y frutos, la composición de la cutícula también presenta variaciones en respuesta a escenarios de estrés tanto bióticos como abióticos. El estrés por sequía es uno de los principales obstáculos para la producción agrícola mundial y debido al cambio climático, se espera que, en próximos años, esto limita aún más la producción de alimentos en el mundo (Tafolla-Arellano *et al.*, 2018). En este contexto, hay reportes que indican cómo la cutícula juega un rol importante en la adaptación de las plantas a este tipo de factor de estrés abiótico. Por ejemplo, se ha estudiado el impacto que tiene el estrés por sequía en las características de la cutícula de hojas de trigo (*Triticum aestivum*), donde se reportó una cutícula más gruesa y un aumento en el contenido de alcanos (Bi *et al.*, 2017). Este comportamiento en respuesta a estrés por sequía también se ha reportado en otras plantas como la planta de té (*Camellia sinensis*) y la flor *Chrysanthemum morifolium* (Chen *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2022). Otra de las causas de la disminución de la productividad agrícola es el ataque de patógenos, el cual es un tipo de estrés biótico. La cutícula de las plantas y frutos sirve como una primera barrera para combatir el ataque por diversos patógenos como insectos, bacterias y hongos (Tafolla-Arellano *et al.*, 2018). Por ejemplo, utilizando como modelo la planta de canola (*Brassica napus*) un aumento en la

expresión de genes de biosíntesis de ceras y en el contenido de ceras epicuticulares en respuesta a la infección del hongo (*Sclerotinia sclerotiorum*) (Ni et al., 2014). De la misma manera, en el estudio del tomate DFD, infectaron frutos de tomate de la variedad Ailsa Craig y DFD con el hongo *Botrytis cinerea*, observando cómo las diferencias en cuanto a la composición de la cutícula del tomate de la variedad DFD le permite resistir de mejor manera a la infección de este patógeno (Saladie et al., 2007). Asimismo, frutos mutantes de tomate que presentan deficiencia de cutina son más susceptibles al ataque del hongo *Botrytis cinerea*, demostrando la importancia de la cutina en la resistencia al ataque de este hongo patógeno (Isaacson et al., 2009).

Estos estudios demuestran como la composición de la cutícula está regulada por diferentes mecanismos como las hormonas en respuesta a diferentes etapas de desarrollo y en respuesta a estrés biótico y abiótico con el objetivo de adaptarse a los cambios que ocurren en el ambiente donde estas plantas se desarrollan. Estas variaciones en la composición de la cutícula, en la mayoría de los casos se debe a cambios en la expresión de genes involucrados en la biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares, los cuales, a su vez, están siendo regulados en su mayoría a nivel transcripcional, aunque también se han reportado mecanismos de regulación a nivel postranscripcional (Hen-Avivi et al., 2013). A nivel postranscripcional, se encontró a CER7, el cual se encarga de la degradación del mRNA de un represor de CER3, el cual está involucrado en la biosíntesis de ceras en *Arabidopsis* (Hen Avivi et al., 2013). Otro de los genes que se reporta que regulan la biosíntesis de cutícula a nivel postranscripcional es CER9, que codifica para una ligasa de ubiquitina (Hen-Avivi et al., 2013). El silenciamiento de CER9 en *Arabidopsis* dio como resultado cutículas de tallo más gruesas (Lü et al., 2012). Por otro lado, a nivel transcripcional, esta regulación está siendo controlada por factores de transcripción de diversas familias (Hen-Avivi et al., 2013). Sin embargo, esto se discutirá con mayor profundidad a continuación.

2.5.1. Factores de Transcripción, Reguladores Transcripcionales y Su Relación con la Biosíntesis de Cutícula

La regulación del proceso de transcripción del RNA mensajero (mRNA) es uno de los mecanismos de respuesta de las plantas a los constantes cambios que se presentan en los ambientes donde viven (Hong, 2016). Un componente fundamental de este tipo de regulación génica son los factores de

transcripción (FT), los cuales son proteínas que se caracterizan principalmente por presentar un dominio de unión al DNA (DBDs) y participan en la regulación génica mediante la unión a elementos en *cis* en las regiones promotoras de genes específicos (Hong, 2016). Otro componente importante en la regulación transcripcional de los genes, son los reguladores transcripcionales (RT), los cuales a diferencia de los factores de transcripción, son proteínas que no poseen un dominio de unión al DNA y llevan a cabo su rol regulatorio a través de diferentes mecanismos, los cuales incluyen la interacción con la maquinaria transcripcional, con otros factores de transcripción o modificando la accesibilidad de los factores de transcripción al DNA mediante la remodelación de la cromatina (Zheng *et al.*, 2016). En concreto, tanto los factores de transcripción como los reguladores transcripcionales pueden trabajar como activadores o represores de la expresión génica, por lo que modulan el incremento o disminución de la transcripción de moléculas de RNA (Broun, 2004).

En todos los organismos existe una gran diversidad de factores de transcripción; sin embargo, las plantas se caracterizan por presentar una variedad aún mayor de estas proteínas. Por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana* se han identificado alrededor de 2,000 genes que codifican para factores de transcripción distintos, número significativamente más grande en comparación a *Drosophila melanogaster* o *Caenorhabditis elegans*, que presentan alrededor de 600 factores de transcripción distintos (Hong, 2016).

En general, los factores de transcripción se clasifican en diferentes familias de acuerdo con la función y tipo de dominio de unión al DNA que posea el factor de transcripción. No obstante, es común que existan diferencias en la clasificación debido a que se suelen utilizar distintos criterios de clasificación (Hong, 2016). Entre la gran diversidad de familias de factores de transcripción identificados en *Arabidopsis*, resaltan las familias AP2-ERF, NAC, Dof, YABBY, WRKY, GARP, TCP, SBP, ABIE-VP1, EIL y LFY, ya que estas son exclusivas de plantas y poseen dominios de unión al DNA distribuidos solo en plantas (Hong, 2016). Los factores de transcripción miembros de estas familias participan en la regulación de diversos procesos, tales como el desarrollo y crecimiento de las plantas, así como respuestas a estrés biótico y abiótico (Hong, 2016). Por otra parte, la información acerca de los reguladores transcripcionales sigue siendo escasa comparada a la información disponible para los factores de transcripción. Sin embargo, se ha reportado en *Arabidopsis thaliana* la participación de diversos reguladores transcripcionales en la remodelación de la cromatina en respuesta a factores de estrés tanto bióticos como abióticos, así como su relación con procesos de las plantas como la floración, el desarrollo de semillas y la fijación de nitrógeno

(Yung *et al.*, 2021).

Con respecto a los factores de transcripción relacionados con la biosíntesis de componentes cuticulares, a la fecha se han identificado factores de transcripción que pertenecen a las familias AP2/ERF, MYB, MADS-box y HD-Zip implicados en la regulación de la biosíntesis de componentes de cutícula en diferentes plantas. En *Arabidopsis*, la sobreexpresión de WAXINDUCER1 (WIN1), un factor de transcripción de la familia AP2/ERF, provocó un aumento en la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de ceras, como es el caso de CER1, KCS1 y CER2, además de que se observó un incremento en la acumulación de estas (Broun, 2004).

Además de estar compuestas por cutina y ceras, la cutícula de los frutos también está conformada por metabolitos secundarios como los flavonoides y antocianinas. En este sentido, se ha reportado que el factor de transcripción MYB12, el cual pertenece a otra familia de factores de transcripción llamada MYB, regula la biosíntesis de flavonoides en *Arabidopsis*, tomate y uva (Mehrtens *et al.*, 2005; Hen-Avivi *et al.*, 2013). De hecho, se ha reportado que el factor de transcripción MYB12 tiene una baja expresión en un tomate mutante llamado “y mutant”, el cual se caracteriza por presentar una disminución en la pigmentación derivado de la falta de síntesis de un flavonoide llamado naringenina (Adato *et al.*, 2009).

Otra familia de factores de transcripción es la MADS-box, esta familia de factores de transcripción está involucrada en la regulación de múltiples procesos de las plantas, incluyendo la maduración de frutos y la biosíntesis de cutícula, lo cual sugiere una relación entre la biosíntesis de cutícula y el proceso de maduración de los frutos (Hen-Avivi *et al.*, 2013). Un ejemplo de factores de transcripción de esta familia son los factores de transcripción TDR4/FUL1 y MBP7/FUL2, los cuales además de estar involucrados en la maduración de frutos de tomate, se ha demostrado que tienen un impacto en la biosíntesis de cutícula mediante el control de la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de cutícula (Hen-Avivi *et al.*, 2013).

Adicionalmente, otros factores de transcripción que pertenecen a la subfamilia HD-Zip IV (homeodomain-leucine zipper IV), se expresan en las capas epidermales de muchas especies de plantas y han sido relacionados con diversos procesos biológicos, incluyendo la regulación de la biosíntesis de cutícula en plantas. Ejemplos de estos factores de transcripción son GL2, ANL2, ATML1, PDF2, HDG11, OCL1 y CD2 (Hen-Avivi *et al.*, 2013). De la misma forma, aunque más escasos, también hay reportes de reguladores transcripcionales involucrados en la biosíntesis de componentes cuticulares. Un estudio reporta que un regulador transcripcional de la familia SNF2 interactúa con el gen KCS6 provocando una disminución en la acumulación de ceras cuticulares

de trigo (*Triticum aestivum*) (Wang et al., 2019). Esto demuestra la importancia tanto de factores de transcripción como de reguladores transcripcionales en la regulación de la biosíntesis de componentes cuticulares. No obstante, hace falta generar más información para comprender más a profundidad la participación de los reguladores transcripcionales en estos procesos.

Como ya se discutió, la cutícula actúa como una barrera para proteger a la planta de factores de estrés tanto biótico como abiótico. En este contexto, la sobreexpresión de factores de transcripción involucrados en la regulación de la biosíntesis de componentes cuticulares en plantas ha mejorado la capacidad de las plantas para afrontar diversos escenarios de estrés como la desecación o la infección por hongos. Algunos ejemplos de estos reportes se resumen en el cuadro 2. Esto sugiere que los estudios enfocados a identificar factores de transcripción involucrados en la regulación de la biosíntesis de componentes cuticulares en frutos podrían ayudar a mejorar la tolerancia de los frutos a factores de estrés biótico y abiótico, con lo cual se permitiría aumentar la vida poscosecha de los frutos.

Cuadro 2. Factores de transcripción relacionados con biosíntesis de componentes cuticulares.

Factor de transcripción	Familia	Función biológica	Referencia
DEWAX	AP2/ERF/ERF	La sobreexpresión de DEWAX resulta en una disminución en el contenido de ceras en hojas de Arabidopsis. Además, DEWAX incrementa la expresión de genes de defensa ante la infección de <i>Botrytis cinerea</i>	Go et al., 2014; Ju et al., 2017
WXP1	AP2/ERF/ERF	La sobreexpresión de WXP1 incrementa el contenido de ceras cuticulares en hojas de alfalfa (<i>Medicago sativa</i>) y mejora la tolerancia a estrés por sequía	Zhang et al., 2005
MYB16	MYB	Regulación de biosíntesis de cutina	Oshima et al., 2013
SHINE3	AP2/ERF/ERF	Regulación de la biosíntesis de cutina. La sobreexpresión de SHINE3 aumenta la resistencia de tomate a la infección por <i>Botrytis cinerea</i> mediante la modificación de la permeabilidad de la cutícula y la regulación de la expresión de genes de defensa a la infección	Buxdorf et al., 2014
MYB41	MYB	En Arabidopsis, este factor de transcripción solo se expresa como respuesta a estrés por sequía. La	Cominelli et al., 2008

		sobreexpresión de MYB41 resulta en plantas con un aumento en la sensibilidad por desecación y cambios en la expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos y modificación de pared celular	
CFLAP1	bHLH	La sobreexpresión de CFLAP1 causa cambios en la expresión de genes relacionados con biosíntesis de ácidos grasos, cutina y ceras, además de que ocasiona una reducción en la acumulación de ceras.	Li <i>et al.</i> , 2016
GL2	HB-HD-Zip	Regula negativamente la producción de antocianinas en Arabidopsis	Wang <i>et al.</i> , 2015
MYB49	MYB	La sobreexpresión de MYB49 produce cambios en los niveles de expresión de genes involucrados con la síntesis de cutina, suberina y ceras, lo cual contribuye a la tolerancia a sal en Arabidopsis	Zhang <i>et al.</i> , 2020
TDR4/FUL1	MADS-MIKC	Involucrado en la regulación de la modificación de la pared celular y la biosíntesis de varios componentes cuticulares	Bemer <i>et al.</i> , 2012

Con lo descrito anteriormente, se podría resumir que los principales factores de transcripción implicados en la regulación de las vías de biosíntesis de cutícula en plantas identificados a la fecha pertenecen a las familias AP2/ERF, MYB, MADS-box y HD-Zip. No obstante, es probable que existan otros factores de transcripción involucrados en este importante proceso, así como la participación de reguladores transcripcionales. De acuerdo con esto, aunque la biosíntesis de los componentes cuticulares en frutos es un proceso conservado, existen reportes que demuestran que la composición de la cutícula presenta variaciones entre especies, lo cual sugiere que pueden existir otros genes y/o mecanismos de regulación diferentes que controlan este proceso. En este contexto, el análisis de genomas, transcriptomas y proteomas de plantas no modelo abre la posibilidad de encontrar otros genes involucrados en la regulación de la biosíntesis de la cutícula, lo que permitirá profundizar en el conocimiento de los mecanismos que controlan este proceso en frutos carnosos como la guanábana.

2.6. Redes de Co-expresión Génica

Los seres vivos son complejos y su correcto funcionamiento depende de procesos altamente coordinados. La regulación de estos procesos sucede a diferentes niveles, incluyendo la regulación transcripcional, la cual depende en gran medida de la interacción de distintas moléculas como proteínas, DNA y RNA (Karlebach y Shamir, 2008; Junker y Schreiber, 2011). Las proteínas son moléculas con una gran relevancia biológica ya que, además de participar en procesos metabólicos, también pueden formar complejos circuitos regulatorios en la célula para regular la expresión de uno o más genes (Junker y Schreiber, 2011). Un ejemplo de estas proteínas son los factores de transcripción que, en respuesta a una señal, pueden modular la transcripción de uno o más genes en específico; de esta manera, se generan complejas redes de regulación génica en la célula (Junker y Schreiber, 2011).

Gracias a los avances en las tecnologías de secuenciación y la bioinformática, es posible recabar una gran cantidad de información de transcriptomas, genomas y proteomas. Una vez generada la información, para poder profundizar en el funcionamiento de los procesos biológicos de los organismos y cómo se relacionan con otros procesos biológicos, es necesario analizar la información generada.

Para esto, se han diseñado diferentes metodologías enfocadas al análisis, representación e interpretación a escala masiva de la información biológica generada a partir de microarreglos o RNA-Seq. Una de estas metodologías es la reconstrucción de redes de co-expresión génica, ya que con las redes el análisis de datos a escala masiva es más robusto y es más sencillo representar e interpretar visualmente la información biológica a escala masiva (Weirauch, 2011). En general, una red de co-expresión génica se puede definir como la representación de una gráfica, en donde los genes están representados por los nodos y la conexión de dos nodos indica que hay una correlación significativa en cuanto la expresión de ambos genes. Estas redes se han utilizado para estudiar las interacciones entre diferentes proteínas, para descubrir sitios de unión de los factores de transcripción y el modelamiento de interacciones entre genes (Weirauch, 2011).

Para construir una red de co-expresión génica a partir de datos de microarreglos o RNA-Seq, primeramente, se genera una matriz en donde las filas representan los genes y las columnas representan las diferentes muestras. Como se muestra en la figura 6, una matriz M contiene G

cantidad de genes (filas) y N cantidad de muestras (columnas). Cada dato de la matriz representa el nivel de expresión de un determinado gen en una determinada muestra. Esta matriz sirve como archivo de entrada para determinar el nivel de correlación que existe entre cada par de genes que se están evaluando. Para medir este nivel de correlación, se pueden utilizar diferentes métodos estadísticos, aunque las más utilizadas suelen ser la correlación de Pearson, la correlación de Spearman y la distancia euclidiana (Weirauch, 2011). Después de calcular los niveles de correlación, se elige el valor mínimo para poder considerar que dos genes se encuentran co-expresados y, por último, con base a los niveles de co-expresión se utiliza una herramienta bioinformática para visualizar y analizar gráficamente la red de co-expresión génica generada (Weirauch, 2011). Algunas de las herramientas que se pueden utilizar para este propósito son Cytoscape (Killcoyne *et al.*, 2009), VisAnt (Hu *et al.*, 2008) y tYNA (Yip *et al.*, 2016).

$$M = \begin{bmatrix} M_{1,1} & M_{1,2} & \cdots & M_{1,N} \\ M_{2,1} & M_{2,2} & \cdots & \vdots \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ M_{G,1} & M_{G,2} & \cdots & M_{G,N} \end{bmatrix}$$

Figura 6. Representación de una matriz (M) compuesta por G filas y N columnas, en donde G representa el número de genes y N el número de muestras (Weirauch, 2011).

La reconstrucción de las redes de co-expresión génica puede ser dividida en dos tipos, las ponderadas y no ponderadas. Las no ponderadas simplemente nos indican si hay una correlación o no entre dos genes, mientras que las redes de co-expresión génica ponderadas permiten conocer el nivel de la correlación entre ambos genes (Weirauch, 2011). De esta forma, las redes no ponderadas no reflejan la naturaleza continua de la información de co-expresión, lo cual puede resultar en una pérdida considerable de información con respecto a las redes ponderadas (Langfelder y Horvath, 2008). Por esta razón, es preferible trabajar con una red de co-expresión ponderada. Una vez que se reconstruyen las redes de co-expresión génica, el siguiente paso es analizarlas, en donde los dos principales objetivos son la identificación de genes centrales (hub genes) y la identificación de

módulos. En el caso de los genes centrales, su identificación es de interés ya que se ha demostrado que además de ser esenciales en muchos procesos biológicos complejos, suelen ser conservados evolutivamente y, por lo tanto, tener ortólogos en otros organismos (Weirauch, 2011). Por otro lado, los módulos se pueden definir como un grupo de genes con patrones de expresión muy similares, que es común que estén involucrados en los mismos procesos biológicos o sean parte del mismo complejo regulatorio (Weirauch, 2011). De acuerdo con esto, el hecho de que un factor de transcripción se encuentre en un mismo módulo de genes involucrados en un proceso biológico en particular, sugiere que ese factor de transcripción se encuentra regulando ese proceso biológico.

En este contexto, el análisis de redes se ha venido utilizando para modelar y comprender a mayor profundidad la interacción de distintas moléculas en los seres vivos mediante la aplicación de estas redes en problemas como la interacción entre distintas proteínas, el descubrimiento de sitios de unión de factores de transcripción, redes metabólicas y redes génicas (Zhu, *et al.*, 2007; Weirauch, 2011).

Uno de los programas más usados para la construcción de redes de co-expresión génica ponderadas, es el paquete WGCNA (Weighted Gene Co-Expression Network Analysis) de R (Langfelder y Horvath, 2008). Este paquete permite reconstruir redes de co-expresión génica ponderadas “con signo” o “sin signo” (signed o unsigned), en donde, por un lado, las redes con signo muestran si la correlación entre ambos genes es positiva o negativa (valores desde -1 a 1), mientras que las redes sin signo solamente muestran la correlación absoluta entre ambos genes (valores desde 0 a 1). Una vez que se conocen los valores de correlación entre cada par de genes, este paquete permite agrupar aquellos genes con patrones de expresión similares en módulos y finalmente exportar la información a las diferentes herramientas bioinformáticas para la visualización de redes que se mencionaron anteriormente. Debido a lo mencionado, para comprender la gran variedad de procesos que ocurren en los organismos, es necesario llevar a cabo estudios enfocados a la elucidación de estas redes de co-expresión génica.

2.6.1. Redes de Co-expresión Génica en Plantas Modelo

Las plantas, como organismos sésiles, constantemente están siendo expuestas a una gran variedad

de factores de estrés tanto bióticos como abióticos, por lo que responden a estos factores mediante cambios moleculares, bioquímicos, fisiológicos y morfológicos que les permiten adaptarse. Para comprender a fondo estas respuestas, se han estudiado las redes de co-expresión génica que controlan estos procesos principalmente en organismos de plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* y *Solanum lycopersicum*. En *A. thaliana*, hay estudios que demuestran como los genes LEC1, LEC2, FUS3 y ABI3, los cuales contienen un dominio de unión al DNA B3, regulan a nivel transcripcional la maduración de semillas (Santos-Mendoza, *et al.*, 2008). En otros estudios, se han estudiado las redes de co-expresión génica para identificar genes que están involucrados en la respuesta a diferentes escenarios de estrés tanto bióticos como abióticos (Amrine *et al.*, 2015; Bai *et al.*, 2018; Mandal *et al.*, 2020; Jena *et al.*, 2022).

En cuanto a estudios de análisis de redes de co-expresión génica enfocados a elucidar la regulación de la biosíntesis de componentes cuticulares, se ha reportado que dos factores de transcripción llamados CFLAP1 y CFLAP2 interactúan con otro factor de transcripción denominado AtCFL1 el cual es un represor del desarrollo de cutícula, con lo que se sugirió que CFLAP1 y CFLAP2 regulan negativamente el desarrollo de cutícula de *Arabidopsis thaliana* (Li *et al.*, 2016). También se ha reportado una regulación coordinada de la biosíntesis de cutina y acumulación de ceras por los factores de transcripción MYB106, MYB16 y WIN1/SHN1 en *Arabidopsis* y *Torenia fournieri* (Oshima *et al.*, 2013). Además, en un estudio efectuado en tomate (*Solanum lycopersicum*), se identificó el factor de transcripción SIMYB12 como un posible regulador clave en la acumulación de flavonoides en la cutícula de tomate (Adato *et al.*, 2009). Por lo anterior, resulta evidente como el estudio de las redes de expresión génica da como resultado un mayor entendimiento de procesos biológicos importantes y complejos en las plantas.

2.6.2. Redes de Regulación Génica en Frutos Tropicales

A pesar de la información que aporta el estudio de las redes de expresión génica y la relevancia económica que poseen los frutos tropicales, son escasos los trabajos realizados en estos frutos, la mayoría de los estudios en plantas se concentra en organismos modelo. Algunos de los estudios en frutos tropicales se han realizado en aguacate, donde se encontró a dos factores de transcripción

(PaPBS1-1 y PaRAP2-3) participando en la red regulatoria de la biosíntesis de aceites (Ge et al., 2021). Por otro lado, en un estudio efectuado con papaya (*Carica papaya*), se identificaron factores de transcripción que interactúan en respuesta a estrés hídrico (Gamboa-Tuz et al., 2018). En otro estudio en mango, se analizó el transcriptoma de exocarpo de mango (*Mangifera indica* L.) en los estados de madurez fisiológica y sobre-maduro, este análisis permitió encontrar una correlación entre la deposición de la cutícula y los patrones de expresión de genes relacionados con la biosíntesis de cutícula durante la ontogenia del fruto (Tafolla-Arellano et al., 2017).

En este contexto, los estudios en el género *Annona*, son escasos, reduciéndose solamente al análisis del transcriptoma de la especie *Annona squamosa*. Donde a partir de datos de expresión, se identificaron genes involucrados en el desarrollo de semillas en dos variedades de *Annona squamosa* (Gupta et al., 2015). Adicionalmente, se han encontrado factores de transcripción de varias familias involucradas en la transición floral y desarrollo de flores en *Annona squamosa* (Liu et al., 2016). Recientemente, se publicó la primera versión del genoma de guanábana (*Annona muricata*) (Strijk et al., 2021). Además, usando RNA-seq identificaron genes involucrados en la maduración (Palomino-Hermosillo et al., 2022).

2.7. Genoma y Transcriptoma de Guanábana (*Annona muricata* L.)

Las herramientas genómicas han acelerado la generación de información y el conocimiento de la biología de los organismos, en este sentido, *Annona muricata* no es la excepción. En 2021, se publicó el ensamblaje de la primera versión del genoma de guanábana (*Annona muricata*) (Strijk et al., 2021). Esta primera versión del genoma se obtuvo a partir de la secuenciación de muestras de hoja de guanábana, obteniendo un genoma de 656.77 Mb y 23,375 genes identificados. No obstante, los autores estiman que el tamaño del genoma completo es de 799.11 Mb. Por otro lado, a partir de la secuenciación *de novo* del transcriptoma del mesocarpo de frutos de guanábana en tres estados de maduración (maduración fisiológica, maduración comercial y sobremaduro), se identificaron 224,074 transcritos ensamblados (Palomino-Hermosillo et al., 2022).

Por otro lado, con el objetivo de encontrar los genes relacionados con la biosíntesis de componentes de la cutícula en frutos de guanábana (*Annona muricata*), nuestro grupo de trabajo realizó la

secuenciación y ensamblaje del transcriptoma de exocarpo de frutos de guanábana en tres estados de madurez; verde maduro (madurez fisiológica), maduro (madurez comercial) y sobre maduro. Para analizar el transcriptoma se hicieron dos acercamientos, por un lado, se realizó un ensamblaje *de novo* y debido a la disponibilidad del genoma, también se realizó un ensamblaje del transcriptoma usando el genoma como referencia. En el ensamblaje *de novo*, usando la herramienta de Trinity (Grabherr *et al.*, 2011) se ensamblaron un total de 185,524 transcritos, de los cuales 127,885 transcritos (69%) codifican para proteínas y 57,639 transcritos (31%) no presentaron hit con alguna base de datos de proteínas, por lo que fueron considerados como posibles secuencias de RNA no codificantes. Mientras que en el ensamblado guiado por genoma usando la herramienta StringTie (Pertea *et al.*, 2015), se ensamblaron 41,045 transcritos con un tamaño promedio de 2,063 pb, la anotación funcional mostró que el 92 % de los transcritos codifican para proteínas y un 8% presentaron potencial para ser secuencias de RNA no codificantes. Actualmente, se está en proceso de categorizar funcionalmente los transcritos, identificar lncRNAs, así como, determinar sus perfiles de expresión en los diferentes estados de madurez del fruto. Esto permitirá determinar las funciones de los transcritos y su posible relación con la biosíntesis de cutícula durante la maduración de los frutos de guanábana.

De acuerdo con lo anterior y considerando el desarrollo de herramientas bioinformáticas para el análisis de datos transcriptómicos, en este proyecto se propuso identificar y caracterizar a nivel *in silico* los transcritos que codifican para factores de transcripción y reguladores transcripcionales en el transcriptoma ensamblado de frutos de guanábana en tres estados de madurez; madurez fisiológica, madurez comercial y sobre maduro. Así mismo, reconstruir una red de co-regulación que permitiera identificar nuevos factores de transcripción y reguladores transcripcionales relacionados con los genes de biosíntesis y transporte de componentes de la cutícula durante la maduración de frutos de guanábana. El conocimiento generado en este proyecto ayudará a mejorar la comprensión de la red de expresión génica que regula la biosíntesis de componentes de la cutícula en frutos de guanábana. Lo anterior, a largo plazo ayudará a diseñar estrategias para mejorar la calidad y la vida de anaquel de los frutos de este cultivo.

3. HIPÓTESIS

Existen nuevos factores de transcripción y reguladores transcripcionales que llevarán a cabo una co-regulación de genes involucrados con la biosíntesis de componentes de cutícula en frutos de guanábana y se expresarán de manera diferencial durante la maduración.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Determinar los factores de transcripción y reguladores transcripcionales involucrados en la red de co-expresión génica de la biosíntesis de componentes de la cutícula durante la maduración de frutos de guanábana (*Annona muricata* L.).

4.2. Objetivos Específicos

- Identificar y caracterizar las secuencias de los transcritos que codifican para factores de transcripción y reguladores transcripcionales expresados durante la maduración del fruto de guanábana (*Annona muricata*).
- Elucidar la red de co-expresión génica de la biosíntesis de componentes de la cutícula de frutos de guanábana.
- Determinar los patrones de expresión de los factores de transcripción y reguladores transcripcionales que co-regulan los genes involucrados en la biosíntesis de componentes de la cutícula durante la maduración de frutos de guanábana.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Datos Genómicos y Transcriptómicos Disponibles de Frutos de Guanábana

En trabajos previos, el grupo de trabajo obtuvo datos transcriptómicos del exocarpo de frutos de guanábana. Estos datos fueron obtenidos de muestras de exocarpo de frutos de guanábana en tres estados de maduración; madurez fisiológica, madurez comercial y sobre maduro. En total, se obtuvieron tres réplicas biológicas por estado de madurez. Las nueve genotecas de RNA-seq de cadena específica (una genoteca por réplica biológica) se secuenciaron en la plataforma Illumina NextSeq 500 en modo paired-end con una longitud de lectura de 2X150 nt. Las lecturas filtradas por calidad ($Q>25$) fueron utilizadas para el ensamblaje del transcriptoma de exocarpo de frutos de guanábana. Para la identificación de factores de transcripción en el transcriptoma de frutos de guanábana se utilizaron tres grupos de datos distintos: los transcritos ensamblados *de novo* (185,524), los transcritos ensamblados guiados por genoma de referencia (41,045 transcritos) y las 23,375 proteínas deducidas en el genoma (Strijk et al., 2021). En el caso de los transcriptomas ensamblados, se consideraron para los análisis posteriores los transcritos con una longitud de al menos 200 pb.

5.2 Identificación de Factores de Transcripción y Reguladores Transcripcionales

Para la identificación de factores de transcripción y reguladores transcripcionales se usaron las bases de datos de factores de transcripción en plantas PlanTFDB versión 4.0 que contiene 320,370 secuencias de 165 especies distintas (<http://planttfdb.gao-lab.org>, Jin *et al.*, 2017) e iTAK versión 1.7, la cual incluye factores de transcripción de 196 especies de plantas distintas (<http://itak.feilab.net/cgi-bin/itak/index.cgi>, Zheng *et al.*, 2016). En general, se siguió una estrategia de análisis por homología para identificar factores de transcripción y reguladores transcripcionales en cada uno del grupo de datos, a continuación, se describe con más detalle el procedimiento.

5.2.1. Identificación de Factores de Transcripción y Reguladores Transcripcionales a Partir de Transcritos Ensamblados *de novo*, Guiados por Referencia y Proteínas Deducidas en el Genoma.

Para identificar las secuencias que codifican para factores de transcripción y reguladores transcripcionales, las secuencias de los transcritos ensamblados *de novo* (185,524), ensamblados guiados por genoma de referencia (41,045) y las proteínas predichas en el genoma (23,375) fueron comparadas contra las bases de datos de factores de transcripción PlanTFDB v4.0 e iTAK v1.7 usando la herramienta BLAST (E-value < 1e-5). Para mejor entendimiento nombraremos los grupos de secuencias como *de novo*, StringTie y Genoma, respectivamente. Los resultados del BLAST obtenidos fueron filtrados para identificar los mejores hits, solo el mejor hit se mantuvo para los próximos análisis. Se consideraron como mejores hits, aquellos que mostraron un e-value \leq a 1e-5, un bitscore \geq a 50 y un porcentaje de cobertura del query \geq a 30. De acuerdo con esto, se ha reportado que un hit con un bitscore de 50, en la gran mayoría de los casos, siempre va a reflejar que un par de secuencias son homólogas (Pearson, 2013). Por lo tanto, al aplicar un filtro por bitscore de 50 en nuestros análisis, es suficiente para asegurar que estamos considerando hits significativos (que podrían ser homólogos) a los factores de transcripción y reguladores transcripcionales de las bases de datos iTAK y PlanTFDB. Adicionalmente, se realizó una búsqueda usando las herramientas de predicción de FT y RT de las bases de datos iTAK (http://itak.feilab.net/cgi-bin/itak/online_itak.cgi) y PlanTFDB (<http://plantfdb.gao-lab.org/prediction.php>) basada en modelos ocultos de Markov (Hidden Markov Model, HMM). Posteriormente, se realizó la identificación de los dominios funcionales presentes en las secuencias, para ello se usó el programa bioinformático InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>, Jones *et al.*, 2014). Con esto se identificaron las secuencias que contienen dominios funcionales característicos de factores de transcripción como el dominio de unión al DNA; se consideraron como factores de transcripción aquellas secuencias con dominios cuya descripción coincidió con “transcription factor”.

Finalmente, los resultados de las tres búsquedas se integraron y se consideraron como factores de transcripción o reguladores transcripcionales las secuencias que presentaron hit significativo a las bases de datos y/o codifican para al menos un dominio funcional característico de FT o RT. Todas

las secuencias obtenidas en la búsqueda fueron revisadas manualmente para confirmar que codifican para factores de transcripción y reguladores transcripcionales de guanábana (*Annona muricata*).

5.2.2. Evaluación de la Cobertura y Redundancia de cada Set de Datos

Una vez identificados los factores de transcripción y reguladores transcripcionales en cada uno de los tres grupos de datos (*de novo*, StringTie y genoma), para analizar la cobertura en la identificación de FT y RT, se creó una base de datos con secuencias de aminoácidos de 200 factores de transcripción de las 20 familias más representadas (bHLH, MYB, AP2/ERF-ERF, NAC, C2H2, Bzip, MYB-related, WRKY, B3, C3H, MADS-M-TYPE, MADS-MIKC, GARP-G2-LIKE, HB-HD-ZIP, LBD, C2H2-dof, C2H2-GATA, B3-ARF, GRAS, TCP) reportados para *Arabidopsis thaliana* y tomate (*Solanum lycopersicum*). Los grupos de datos *de novo*, StringTie y genoma identificados como factores de transcripción fueron comparados con la base de datos creada usando la herramienta BLAST con un E-value $< 1e-2$. Este análisis nos permitió identificar el set de datos con mejor representación de FT y RT identificados.

Posteriormente, para identificar la redundancia de las secuencias identificadas entre los tres diferentes sets de datos (*de novo*, StringTie y Genoma), se identificaron las secuencias de transcritos equivalentes y posibles isoformas de las secuencias que codifican para factores de transcripción mediante un BLAST bi-direccional (E-value $\leq 1e-1$), con esto se identificaron los mejores hits bidireccionales entre los diferentes set de probables factores de transcripción. A partir de estos resultados, se evaluó el porcentaje de cobertura de FT y RT identificados, así como la redundancia de transcritos en los tres sets evaluados (*de novo*, StringTie y Genoma). El set de secuencias que mostró una mejor cobertura de FT y RT identificados y menor redundancia fue elegido para realizar los análisis posteriores.

5.2.3 Anotación Funcional de Factores de Transcripción y Reguladores Transcripcionales Identificados en Frutos de Guanábana

Una vez identificado el grupo de datos con mayor cobertura y menor redundancia, se procedió a llevar a cabo la categorización funcional de los factores de transcripción y reguladores transcripcionales para identificar los procesos biológicos en los que están involucrados. Para esto, se llevó a cabo la categorización funcional de las secuencias identificadas como FT y RT usando la herramienta Blast2GO (Conesa *et al.*, 2005).

5.3. Clasificación de los Factores de Transcripción y Reguladores Transcripcionales Identificados en Frutos de Guanábana

La clasificación por familias de los factores de transcripción y reguladores transcripcionales identificados se realizó mediante la integración de la clasificación presente en las bases de datos de iTAK y PlanTFDB. Cuando existió discrepancia en la clasificación de la familia entre ambas bases de datos, se tomó como primera opción la obtenida en iTAK, la cual reconoce a 78 familias distintas de factores de transcripción y 29 familias distintas de reguladores transcripcionales.

5.4. Identificación de genes Ortólogos de Guanábana a Genes Relacionados con la Biosíntesis y Transporte de Componentes de la Cutícula

Para la identificación de genes relacionados con la biosíntesis, transporte, ensamblaje y regulación de componentes de cutícula en frutos de guanábana, primero, se creó una base de datos denominada CutículaDB en la cual se almacenaron las secuencias de genes con evidencia experimental en otras plantas de que están involucrados en la biosíntesis, transporte o ensamblaje de componentes de cutícula. Después, se realizó una comparación de BLAST bi-direccional entre las secuencias

contenidas en CuticulaDB y los 41,045 transcritos ensamblados con genoma de referencia usando BLAST, considerando un criterio de filtrado de un e-value $\leq 1e-3$, un porcentaje de cobertura de la secuencia query $\geq 30\%$ y un bitscore ≥ 50 . Además, se realizó un BLAST (E-value $\leq 1e-3$) de las secuencias ensambladas contra los proteínas predichas en el genoma de *A. thaliana* y *S. lycopersicum* para identificar los homólogos con estas especies. El resultado de los BLAST fue comparado para identificar los genes de guanábana homólogos a los genes involucrados en la biosíntesis de la cutícula.

De acuerdo a (Kristensen *et al.*, 2011), una forma de confirmar si dos secuencias son ortólogos, es a través de un análisis filogenético donde las secuencias que son ortólogos se agrupan en un mismo clado. En este sentido, con la finalidad de confirmar la búsqueda de genes ortólogos en guanábana, se realizó un análisis filogenético de los transcritos que codifican para factores de transcripción, las secuencias homólogas de otras plantas y los genes incluidos en la base de datos CuticulaDB usando el método de Neighbor Joining y 1000 repeticiones usando el software MEGA 11 (Kumar *et al.*, 2016), en donde se generó un árbol filogenético para cada familia de factores de transcripción. Cada árbol incluyó los factores de transcripción de cada familia identificados en guanábana, los factores de transcripción de cada familia reportados para Arabidopsis y tomate en la base de datos iTAK y los factores de transcripción de cada familia incluidos en la base de datos CuticulaDB.

Todas las posibles secuencias identificadas fueron analizadas manualmente para eliminar falsos positivos y confirmar las posibles secuencias homólogas de guanábana a genes involucrados en la biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes de cutícula descritos en otras plantas. El diagrama de flujo con los criterios del curado manual se resume en la figura 7. Para el caso de los factores de transcripción identificados en guanábana, se consideraron ortólogos a factores de transcripción de otras plantas cuando; a) presentaron hit bidireccional, b) presentaron los dominios conservados característicos del gen y c) fueron agrupados en el mismo clado del análisis filogenético. Para el caso de los genes de biosíntesis, ensamblaje y transporte de componentes cuticulares identificados en guanábana, se consideraron ortólogos a genes de otras plantas cuando presentaron hit bidireccional y estuvieron presentes los dominios conservados.

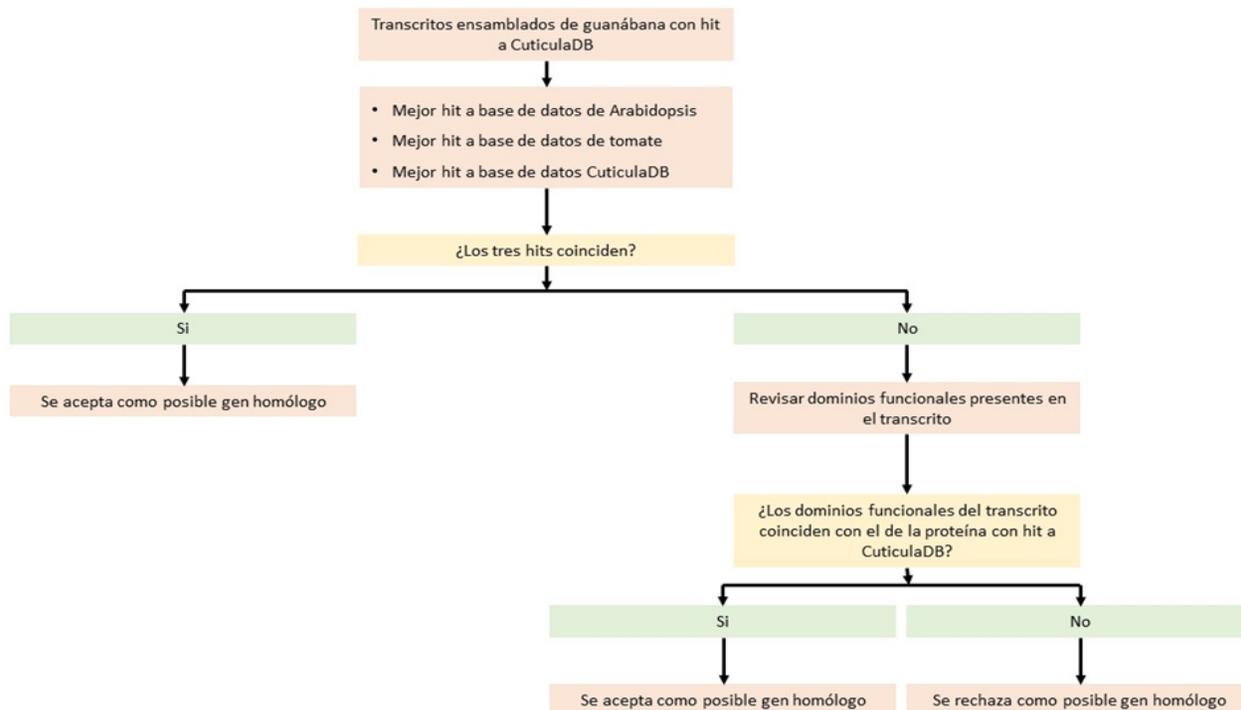


Figura 7. Diagrama de flujo. Curado manual de transcritos con hit a base de datos CuticulaDB.

5.5. Agrupamiento Jerárquico de los Patrones de Expresión y Análisis de Expresión Diferencial

5.5.1. Análisis de los Patrones de Expresión de los Factores de Transcripción Relacionados con la Biosíntesis de Componentes de la Cutícula

Para identificar los patrones de expresión de los factores de transcripción, los reguladores transcripcionales y los genes de biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares, las lecturas cortas de buena calidad de las muestras fueron mapeados al transcriptoma ensamblado guiado por genoma de referencia (Obtenido previamente en el grupo de trabajo). Los niveles de expresión obtenidos para cada transcrito fueron normalizados a CPM (Counts Per Million), los cuales nos permiten comparar los valores de expresión de los transcritos entre diferentes muestras. Después, con el objetivo de eliminar transcritos de baja expresión, solo se consideraron como transcritos expresados aquellos que presentaron un valor igual o mayor a 0.50 CPM en al menos dos de tres réplicas. Por último, se realizó un análisis exploratorio de los patrones de expresión de

los transcritos y se llevó a cabo una agrupación jerárquica de los niveles de expresión de los factores de transcripción, los reguladores transcripcionales y los genes de biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares usando los comandos *hclust* y *heatmap.2* en R.

5.5.2. Identificación de Genes Expresados Diferencialmente Durante la Vida Poscosecha de Frutos de Guanábana

Para el análisis de expresión diferencial se utilizó el set de los transcritos considerados como expresados según el criterio de filtrado mencionado anteriormente, con esto se realizó el análisis de expresión diferencial usando el paquete edgeR (Robinson *et al.*, 2010) con comparaciones pareadas en R. Se consideraron como genes expresados diferencialmente aquellos transcritos que presentaron un $FDR < 0.05$ y un $\log_2FC > 1$. Con estos resultados se realizaron análisis de los patrones de expresión de los factores de transcripción, reguladores transcripcionales y genes de biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares que fueron expresados diferencialmente durante la vida poscosecha de los frutos de guanábana.

5.6. Reconstrucción de la red de co-expresión génica del transcriptoma de frutos de guanábana

Para analizar más a detalle la participación de los factores de transcripción y reguladores transcripcionales en la regulación de la biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares, a partir de los transcritos considerados como expresados durante la maduración poscosecha de los frutos de guanábana, se reconstruyó la red de co-expresión génica del transcriptoma de frutos de guanábana utilizando el paquete WGCNA en R (Langfelder & Horvath, 2008). Se eligió un softthreshold de 24 para que la red generada se ajustara al modelo de red libre de escala con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.80. Después, en función a sus niveles de correlación, los transcritos fueron agrupados en módulos, considerando un tamaño mínimo de módulo de 30 transcritos. Por último, se llevó a cabo un enriquecimiento funcional de los módulos

de la red y aquellos módulos claves para procesos biológicos como estrés abiótico, pared celular, entre otros, fueron visualizados utilizando Cytoscape (Killcoyne *et al.*, 2009).

6. RESULTADOS

6.1. Identificación de Factores de Transcripción y Reguladores Transcripcionales en el Transcriptoma de Frutos de Guanábana

6.1.1. Identificación de Factores de Transcripción y Reguladores Transcripcionales A Partir de las Proteínas Deducidas en el Genoma de Guanábana

Después de llevar a cabo la identificación de factores de transcripción a partir de la búsqueda por homología en la bases de datos iTAK y PlanTFDB usando BLAST se lograron identificar 1,121 proteínas que codifican para FT, mientras que con las herramientas de predicción usando Modelos Ocultos de Markov se identificaron 961 posibles FT. Por último, la búsqueda de dominios funcionales usando la base de datos de InterPro mostró que 453 proteínas codificaban al menos un dominio funcional característico de los FT. La comparación de estos grupos de secuencias a través de un Diagrama de Venn, mostró que un total de 1,226 proteínas predichas en el genoma fueron identificadas como FT. Trescientas (24.5%) de las 1,226 proteínas fueron identificadas en común por los tres métodos usados, 661 (53.9%) se identificaron en común usando el BLAST y las herramientas de predicción de los sitios de las bases de datos iTAK y PlanTFDB. Asimismo, 105 (8.5%) solo fueron identificados cuando se realizó la búsqueda de dominios funcionales (Figura 8). Adicionalmente, el análisis de las secuencias del genoma permitió identificar 304 proteínas deducidas que codifican para reguladores transcripcionales.

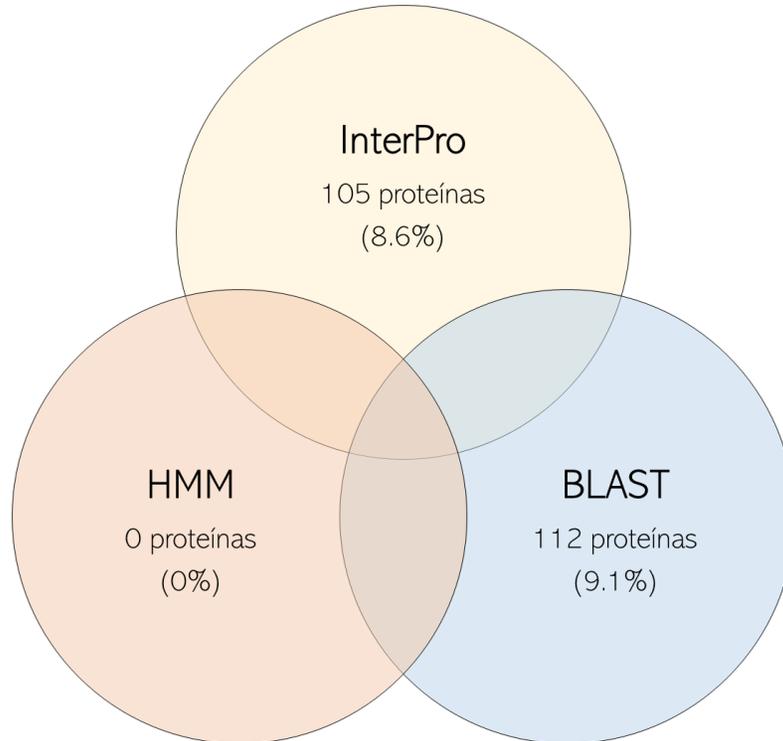


Figura 8. Comparación del número de proteínas deducidas en el genoma de guanábana consideradas como factores de transcripción en los tres análisis. BLAST (E-value < 1e-5) a las bases de datos de iTAK y PlanTFDB. HMM, predicción de FT usando las herramientas de predicción de las bases de datos iTAK (http://itak.feilab.net/cgi-bin/itak/online_itak.cgi) y PlanTFDB (<http://plantfdb.gao-lab.org/prediction.php>), las cuales usan Modelos Ocultos de Markov. InterPro, identificación de dominios funcionales comparando en la base de datos de InterPro.

6.1.2. Identificación de Factores de Transcripción y Reguladores Transcripcionales A Partir de Transcritos Ensamblados *de novo*

Después de llevar a cabo la búsqueda por homología mediante BLAST comparando con las bases de datos iTAK y PlanTFDB se logró identificar 6,426 transcritos que codifican para FT. Mientras que, 4,235 transcritos fueron anotados como FT usando las herramientas de predicción que usan Modelos Ocultos de Markov (HMM), la búsqueda de dominios funcionales en InterPro identificó a 836 transcritos que codifican para al menos un dominio funcional característico de FT. Como muestra la figura 9, la comparación de los grupos de transcritos identificados a través de las diferentes estrategias mostró que 9,192 transcritos ensamblados *de novo* codifican para factores de

transcripción. De los cuales, cerca del 51% (4,704) fueron identificados a través de la comparación por BLAST, 24.6% fueron identificados usando los HMM y 216 transcritos fueron identificados solo usando la base de datos de InterPro. De manera interesante, solo el 3.2% (293) se identificaron de manera común en los tres métodos de búsqueda (Figura 9). Adicionalmente, los análisis de búsqueda permitieron identificar 2,012 transcritos que codifican para reguladores transcripcionales.

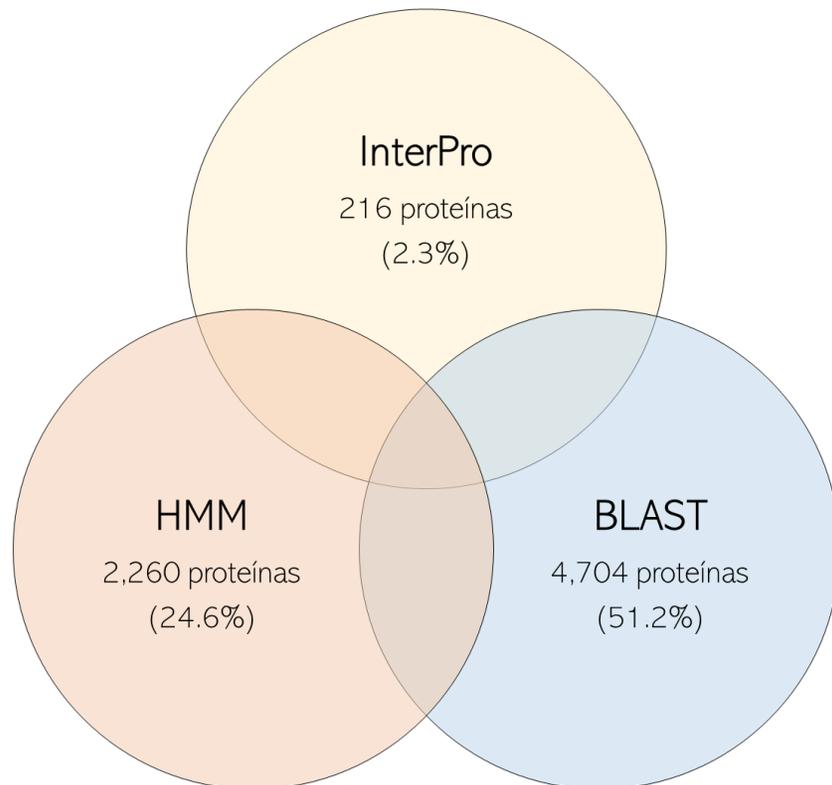


Figura 9. Comparación del número de transcritos ensamblados *de novo* que codifican para factores de transcripción identificados en cada uno de los tres análisis. BLAST (E-value < 1e-5) a las bases de datos de iTAK y PlanTFDB. HMM, predicción de FT usando las herramientas de predicción de las bases de datos iTAK (http://itak.feilab.net/cgi-bin/itak/online_itak.cgi) y PlanTFDB (<http://plantfdb.gao-lab.org/prediction.php>), las cuales usan Modelos Ocultos de Markov. InterPro, identificación de dominios funcionales comparando en la base de datos de InterPro.

6.1.3. Identificación de Factores de Transcripción y Reguladores Transcripcionales A Partir de Transcritos Ensamblados con Genoma de Referencia

Finalmente, con la disponibilidad del genoma de referencia, se decidió realizar un ensamblado del transcriptoma usando como referencia el genoma de *A. muricata* (Strijk *et al.*, 2021) con la herramienta de StringTie, esto resultó en el ensamblaje de 41,045 transcritos. Usando este grupo de secuencias ensambladas se realizó una búsqueda por homología de los transcritos que codifican para factores de transcripción comparando con las bases de datos de PlanTFDB e iTAK. Esta búsqueda permitió identificar un total de 1,723 transcritos identificados como FT usando la base de datos de PlanFTDB y 1,867 transcritos se anotaron como FT con la base de datos de iTAK. Después de comparar los resultados obtenidos en ambas bases de datos, el diagrama de Venn mostró que en total de 1,973 transcritos ensamblados con genoma de referencia codifican para factores de transcripción, de los cuales, el 82% (1,617) se identificaron con ambas bases de datos y otros fueron identificados de manera específica para cada base de datos (Figura 10). Adicionalmente, también se identificaron un total de 655 transcritos que codifican para reguladores transcripcionales.

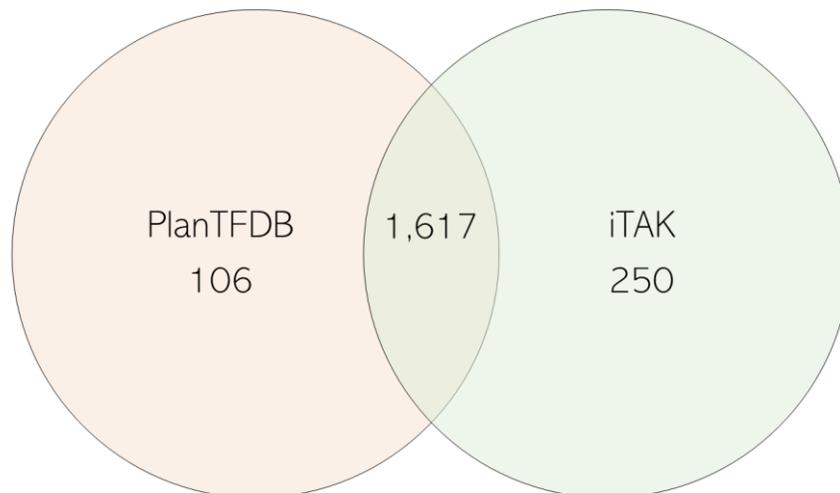


Figura 10. Comparación del número de transcritos ensamblados con genoma de referencia que codifican para factores de transcripción identificados con las bases de datos iTAK y PlanTFDB.

6.1.4. Evaluación de la Cobertura y Redundancia de Secuencias que Codifican para Factores de Transcripción en los Tres Grupos de Datos Analizados

En el cuadro 3 se muestra el número total de transcritos que codifican para probables factores de transcripción y reguladores transcripcionales identificados en los grupos *de novo*, StringTie y Genoma. Es evidente que en el set *de novo* se lograron identificar un mayor número de secuencias que codifican para FT, seguido del set StringTie) y por último los identificados en el set genoma. Sin embargo, el número de secuencias identificadas en los transcritos *de novo* puede deberse a que durante los ensamblajes de transcriptomas *de novo* es común que exista una sobreestimación de las isoformas, ya que se carece de un genoma de referencia. En este contexto, como siguiente paso, con el objetivo de elegir el mejor grupo de secuencias para continuar con los análisis posteriores, se realizó un análisis de cobertura, es decir, se determinó el porcentaje de FT identificados en una base de datos conformada por un número de FT conocido. Para esto se creó una base de datos con secuencias de 200 FT de las 20 familias más representadas reportados para *Arabidopsis thaliana* y *Solanum lycopersicum*. La comparación fue realizada usando BLAST comparando los FT identificados en los grupos *de novo*, StringTie y Genoma contra la base de datos creada. El resultado de esta comparación mostró que los transcritos ensamblados *de novo* presentan al menos una secuencia homóloga con el 83.5% de los FT almacenados en dicha base de datos. Seguido de los transcritos ensamblados con genoma de referencia con un porcentaje 79.5% y para el caso de las proteínas deducidas, el porcentaje fue de 78.5% (Cuadro 3). Aunque el grupo de secuencias *de novo* mostró una mayor cobertura con la base de datos, es evidente el nivel alto de redundancia de secuencias, las 9,192 secuencias *de novo* lograron identificar 167 de los 200 FT presentes en la base de datos, mientras que con 1,973 secuencias StringTie se logró identificar 159 de 200 FT y con 1,226 del genoma se identificaron 157 de los 200. Como se mencionó arriba, este nivel alto de redundancia en las secuencias *de novo* puede deberse por la naturaleza en que se obtienen los ensamblajes *de novo*, donde se sobreestima el ensamblaje de isoformas, por tanto, para los siguientes análisis se eligió trabajar con el grupo StringTie, ya que presentó una mayor cobertura que el grupo de secuencias del genoma.

Cuadro 3. Número de transcritos y proteínas que codifican para factores de transcripción y reguladores transcripcionales en cada uno de los tres grupos de datos y el porcentaje de factores de transcripción de Arabidopsis y tomate al que dieron hit.

	Transcritos <i>de novo</i>	Transcritos StringTie	Proteínas genoma
FTs identificados	9,192 transcritos	1,973 transcritos	1,226 proteínas
RTs identificados	2,012 transcritos	655 transcritos	304 proteínas
Cobertura a FTs de Arabidopsis y tomate	83.5%	79.5%	78.5%

6.1.5. Caracterización y Anotación Funcional de Transcritos que Codifican para Factores de Transcripción y Reguladores Transcripcionales

Una vez que se definió que el grupo de secuencias de StringTie fue el que presentó mejor representación y menor redundancia de secuencias, se realizó una verificación manual de todas las secuencias identificadas como probables FT y RT. Para esto, se realizó la confirmación de los dominios funcionales presentes en las secuencias, alineamientos y análisis filogenéticos para eliminar los posibles falsos positivos. La verificación manual confirmó un total de 1,887 transcritos que codifican para factores de transcripción y un total de 611 transcritos que codifican para reguladores transcripcionales. Posteriormente, se determinó el número de isoformas por gen, este análisis demostró que los 1,887 transcritos que codifican para factores de transcripción provienen de 1,209 genes distintos, los cuales están representados por un promedio de 1.56 isoformas por gen. Donde 831 de estos genes están representados por una sola isoforma, tres genes con más de ocho isoformas y un gen con 12 isoformas, (Figura 11A y 11B). Con respecto a los reguladores transcripcionales, los 611 transcritos que codifican para reguladores transcripcionales provienen de 321 genes distintos. El análisis de isoformas mostró que en promedio de 1.90 isoformas por gen. De estos, 170 están representados por una sola isoforma, 6 genes presentan más de seis isoformas y un gen que presentó un máximo de 14 isoformas (Figura 11A y 11C).

A

Factores de transcripción identificados	Reguladores transcripcionales identificados
1,887 transcritos	611 transcritos
1,209 genes	321 genes

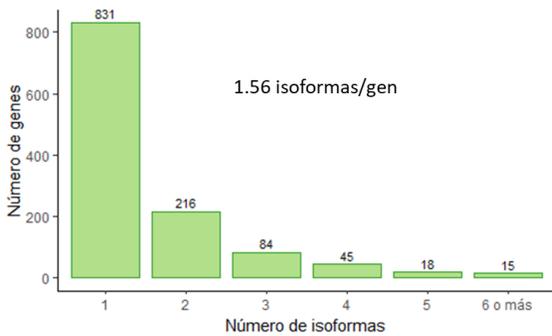
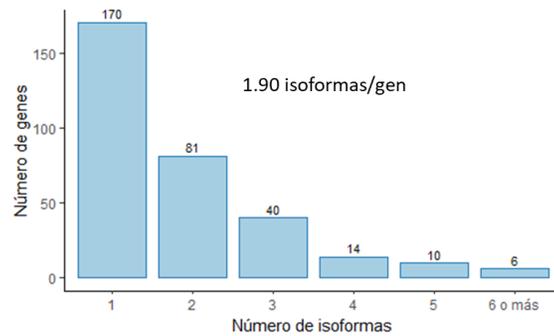
B**C**

Figura 11. Factores de transcripción y reguladores transcripcionales identificados a partir de transcritos ensamblados con genoma de referencia. A) muestra el número de genes e isoformas. B) muestra el número de isoformas por gen que codifican para factores de transcripción. C) número de isoformas por gen que codifican para reguladores transcripcionales.

Para determinar qué procesos biológicos pudieran estar regulando los factores de transcripción y reguladores transcripcionales identificados, se realizó una categorización funcional de los transcritos usando la herramienta de Blast2GO. El análisis mostró que los factores de transcripción identificados están relacionados con al menos 13 procesos biológicos distintos, siendo el metabolismo de macromoléculas, el metabolismo de compuestos nitrogenados celulares, el metabolismo de compuestos que contienen nucleobases, el metabolismo de compuestos orgánicos cíclicos y el metabolismo de compuestos aromáticos celulares los procesos biológicos con un mayor número de transcritos asociados (Figura 12).

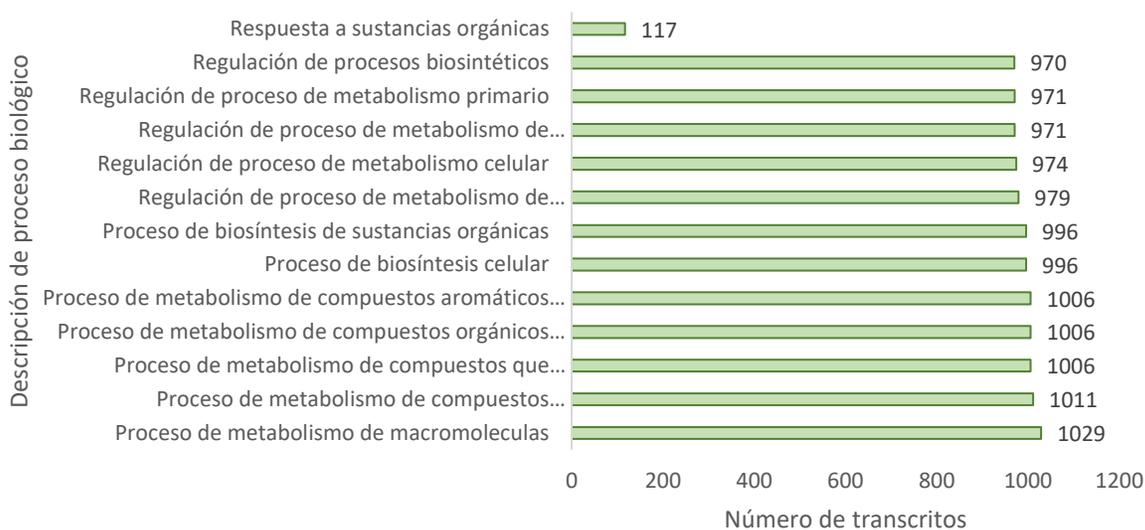


Figura 12. Procesos biológicos relacionados con los transcritos que se identificaron como factores de transcripción.

Por otro lado, la categorización funcional de los 611 reguladores transcripcionales, sugiere que estos transcritos pudieran estar regulando al menos 24 procesos biológicos distintos, entre los que destacan el metabolismo de macromoléculas, el metabolismo de compuestos nitrogenados celulares, regulación de procesos de metabolismo de macromoléculas, biosíntesis de sustancias orgánicas y proceso metabólico de heterociclo, debido a que son los procesos con un mayor número de transcritos asociados (Figura 13).

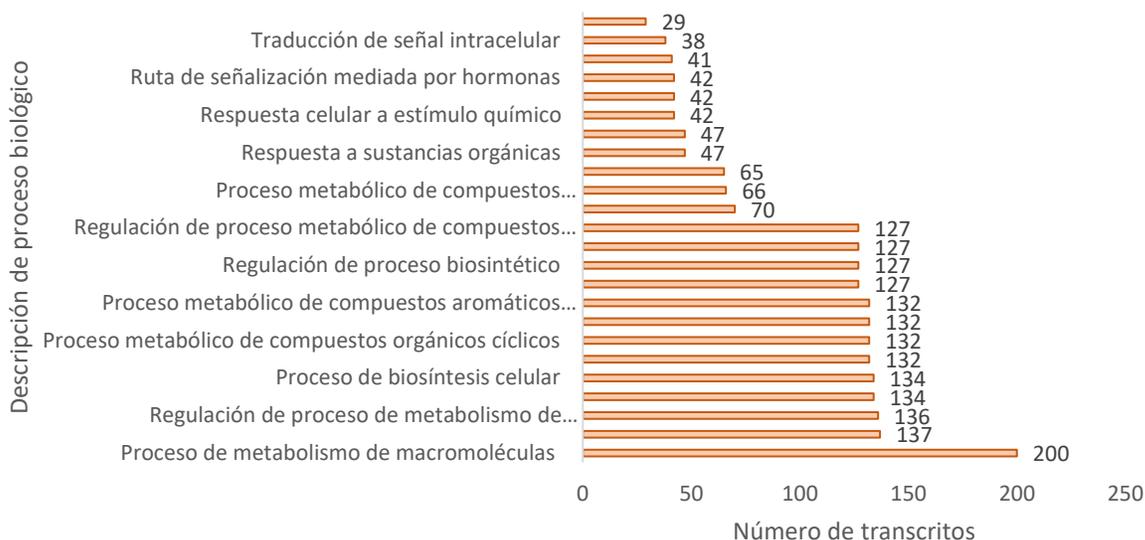


Figura 13. Procesos biológicos relacionados con los transcritos que se identificaron como reguladores transcripcionales.

Es interesante destacar que los 13 procesos biológicos asociados a los factores de transcripción también fueron asociados a los reguladores transcripcionales, de manera que, 11 procesos biológicos sólo fueron asociados a los reguladores transcripcionales. Dentro de estos procesos, encontramos procesos biológicos relacionados con la metilación de macromoléculas, ruta de señalización mediada por hormonas, respuesta hormonal, proceso de metabolismo proteico y proceso metabólico de compuestos orgánicos cíclicos.

6.2. Clasificación por Familias de los Factores de Transcripción y Reguladores Transcripcionales Identificados en el Transcriptoma de Frutos de Guanábana

La comparación de las secuencias contra las bases de datos de iTAK e InterPro nos permitió clasificar los transcritos que codifican para FT y RT en familias, las cuales se basan en el tipo de dominio funcional presente en la proteína. Después del curado manual, los 1,887 transcritos que codifican para factores de transcripción fueron clasificados en 70 familias distintas (según el criterio de la base de datos iTAK) siendo las familias bHLH, MYB, AP2/ERF-ERF, bZIP y C2H2

las 5 familias con el mayor número de miembros. El cuadro 4 muestra las 20 familias más representadas.

Cuadro 4. Número de factores de transcripción identificados para las 20 familias más representadas en el transcriptoma de frutos de guanábana.

Familia	Número de transcritos	Número de genes
bHLH	165	102
MYB	120	105
AP2/ERF/ERF	108	91
bZIP	92	45
C2H2	90	64
NAC	90	68
MYB-related	88	47
C3H	77	37
FAR1	71	34
GRAS	69	50
WRKY	60	39
GARP-G2-like	47	34
Trihelix	43	24
B3-ARF	41	17
HB-HD-ZIP	39	29
B3	37	25
C2C2-GATA	34	19
HSF	33	22
LBD	32	28
MADS-MIKC	29	21

En cuanto a los reguladores transcripcionales, los 611 transcritos que codifican para reguladores transcripcionales fueron clasificados en 24 familias distintas (según el criterio de la base de datos iTAK) siendo las familias SNF2, SET, PHD, others y mTERF las cinco familias que presentaron mayor número de miembros. El total de familias de RT están representados en el cuadro 5.

Cuadro 5. Número de reguladores transcripcionales identificados para las familias representadas en el transcriptoma de frutos de guanábana.

Familia	Número de transcritos	Número de genes
SNF2	72	33
SET	69	35
PHD	65	33
Others	63	43
mTERF	55	40
GNAT	42	27
TRAF	33	19
Jumonji	28	12
SWI/SNF-BAF60b	27	11
IWS1	26	7
ARID	20	9
AUX/IAA	19	18
LUG	18	4
HMG	16	10
Pseudo ARR-B	13	5
TAZ	12	5
SWI/SNF-SWI3	8	5
Coactivator p15	6	3
Rcd1-like	6	3

MBF1	4	2
MED6	3	1
RB	3	1
SOH1	2	1
MED7	1	1

La identificación de estos 1,887 transcritos (1,209 genes) que codifican para factores de transcripción y 611 transcritos (321 genes) que codifican para reguladores transcripcionales representan un importante avance para el estudio de las redes de regulación que controlan procesos biológicos esenciales en la biología de los frutos de guanábana, incluyendo el proceso de biosíntesis de la cutícula. Para estudiar la participación de estos FT y RT en la biosíntesis de la cutícula en frutos de guanábana, primero fue necesario identificar los transcritos relacionados con la biosíntesis de la cutícula en el transcriptoma ensamblado.

6.3. Identificación de Transcritos de Guanábana Ortólogos a los Genes Involucrados en la Biosíntesis de Cutícula

Con el objetivo de identificar los transcritos de guanábana relacionados con la biosíntesis de cutícula se llevó a cabo una comparación del ensamblado del transcriptoma guiado por genoma de referencia (*StringTie*) contra una base de datos que contenía genes de diferentes especies (principalmente *A. thaliana* y *S. lycopersicum*) involucrados en la biosíntesis de componentes de la cutícula. Para la creación de esta base de datos, la cual se nombró “CuticulaDB”, se realizó una búsqueda exhaustiva en la literatura para identificar los genes con evidencia experimental que estuvieran relacionados con la biosíntesis de la cutícula en plantas. En total, se almacenaron 130 secuencias en la base de datos CuticulaDB. 77 de 130 genes distintos están relacionados con la biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares. Además 41 de las 130 secuencias corresponden a factores de transcripción regulando estos procesos y 12 secuencias de genes con funciones regulatorias a nivel postranscripcional (Cuadros 6 al 8).

Cuadro 6. Genes de biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares incluidos en la base de datos CuticulaDB

Nombre del gen	Identificador	Descripción	Referencia	Función biológica
ACBP1	AT5G53470	Acyl-CoA Binding	Xue <i>et al.</i> , 2014	Biosíntesis de componentes cuticulares
ACC1	AT1G36160	Acetyl-CoA carboxylase	Monda <i>et al.</i> , 2020	Biosíntesis de componentes cuticulares
ACLA1	AT1G10670	ATP-Citrate Lyase A-1	Xing <i>et al.</i> , 2014	Biosíntesis de componentes cuticulares
ACLA2	AT1G60810	ATP-Citrate Lyase A-2	Xing <i>et al.</i> , 2014	Biosíntesis de componentes cuticulares
ACLA3	AT1G09430	ATP-Citrate Lyase A-3	Xing <i>et al.</i> , 2014	Biosíntesis de componentes cuticulares
ATT1	AT4G00360	Aberrant Induction of Type Three 1	Xiao <i>et al.</i> , 2004	Biosíntesis de componentes cuticulares
BDG	AT1G64670	BODYGUARD1	Jakobson <i>et al.</i> , 2016	Biosíntesis de componentes cuticulares
CER1	AT1G02205	ECERIFERUM1	Wang <i>et al.</i> , 2015	Biosíntesis de componentes cuticulares
CER10	AT3G55360	Enoyl-CoA reductase	Lee y Suh., 2015	Biosíntesis de componentes cuticulares
CER17	AT1G06350	ECERIFERUM17	Kong <i>et al.</i> , 2020	Biosíntesis de componentes cuticulares
CER2	AT4G24510	ECERIFERUM2	Haslam <i>et al.</i> , 2017	Biosíntesis de componentes cuticulares
CER26	AT4G13840	ECERIFERUM26	Kong <i>et al.</i> , 2020	Biosíntesis de componentes cuticulares
CER3	Solyc11g072990	ECERIFERUM3	Kong <i>et al.</i> , 2020	Biosíntesis de componentes cuticulares
CER4	AT4G33790	ECERIFERUM4	Busta y Jetter, 2017	Biosíntesis de componentes cuticulares
CYTB5-B	AT2G32720	Cytochrome B5 Isoform B	Lee y Suh., 2015	Biosíntesis de componentes cuticulares
CYTB5-C	AT2G46650	Cytochrome B5 Isoform C	Lee y Suh., 2015	Biosíntesis de componentes cuticulares
CYTB5-D	AT5G48810	Cytochrome B5 Isoform D	Lee y Suh., 2015	Biosíntesis de componentes cuticulares
CYTB5-E	AT5G53560	Cytochrome B5 Isoform E	Lee y Suh., 2015	Biosíntesis de componentes cuticulares

ELO2	AT3G06470	ELO Homolog 2	Nagano <i>et al.</i> , 2019	Biosíntesis de componentes cuticulares
F3H	AT3G51240	Flavanone 3-hydroxylase	Qiu <i>et al.</i> , 2019	Biosíntesis de componentes cuticulares
FDH	AT2G26250	3-Ketoacyl-CoA Synthase 10	Qiu <i>et al.</i> , 2019	Biosíntesis de componentes cuticulares
KCR1	AT1G67730	Beta-Ketoacyl Reductase 1	Gable <i>et al.</i> , 2004	Biosíntesis de componentes cuticulares
KCR2	AT1G24470	Beta-Ketoacyl Reductase 2	Gable <i>et al.</i> , 2004	Biosíntesis de componentes cuticulares
KCS1	AT1G01120	3-Ketoacyl-CoA Synthase 1	Lee y Suh., 2015	Biosíntesis de componentes cuticulares
KCS2	AT1G04220	3-Ketoacyl-CoA Synthase 2	Lee <i>et al.</i> , 2009	Biosíntesis de componentes cuticulares
KCS20	AT5G43760	3-Ketoacyl-CoA Synthase 20	Lee y Suh., 2015	Biosíntesis de componentes cuticulares
KCS6	AT1G68530	3-Ketoacyl-CoA Synthase 6	Sun <i>et al.</i> , 2021	Biosíntesis de componentes cuticulares
KCS9	AT2G16280	3-Ketoacyl-CoA Synthase 9	Lee y Suh., 2015	Biosíntesis de componentes cuticulares
LACS1	AT2G47240	Long chain acyl CoA synthetase 1	Weng <i>et al.</i> , 2010	Biosíntesis de componentes cuticulares
LCR	AT2G45970	Cytochrome P450	Wellesen <i>et al.</i> , 2001	Biosíntesis de componentes cuticulares
LCY	AT3G10230	Lycopene Cyclase	Yu <i>et al.</i> , 2012	Biosíntesis de componentes cuticulares
MAH1	AT1G57750	Mid-Chain Alkane Hydroxylase 1	Xue <i>et al.</i> , 2014	Biosíntesis de componentes cuticulares
PAS2	AT5G10480	Beta-Hydroxyacyl-coenzyme A dehydratase	Xue <i>et al.</i> , 2014	Biosíntesis de componentes cuticulares
RST1	AT3G27670	Resurrection 1	Chen <i>et al.</i> , 2005	Biosíntesis de componentes cuticulares
WAX2	AT5G57800	ECERIFERUM3	Chen <i>et al.</i> , 2003	Biosíntesis de componentes cuticulares
WSD6	AT3G49210	Wax ester synthase 6	Kong <i>et al.</i> , 2020	Biosíntesis de componentes cuticulares
WSD7	AT5G12420	Wax ester synthase 7	Kong <i>et al.</i> , 2020	Biosíntesis de componentes cuticulares

CHS1	Solyc09g091510	Chalcone synthase 1	España <i>et al.</i> , 2014	Biosíntesis de componentes cuticulares
CHS2	Solyc05g053550	Chalcone synthase 1	España <i>et al.</i> , 2014	Biosíntesis de componentes cuticulares
GA2	Solyc10g007570	Gibberellin 2-oxidase 3	Li <i>et al.</i> , 2020	Biosíntesis de componentes cuticulares
KAS1	Solyc02g070790	3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase I	Wu <i>et al.</i> , 2010	Biosíntesis de componentes cuticulares
KAS2	XP_010313772.1	3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase II	Wu <i>et al.</i> , 2010	Biosíntesis de componentes cuticulares
KCS3	Solyc11g072990	3-Ketoacyl-CoA Synthase 3	Kong <i>et al.</i> , 2020	Biosíntesis de componentes cuticulares
LACS2	Solyc01g109180	Long chain acyl CoA synthetase 2	Kong <i>et al.</i> , 2020	Biosíntesis de componentes cuticulares
LACS4	XP_010326994.1	Long chain acyl CoA synthetase 4	Kong <i>et al.</i> , 2020	Biosíntesis de componentes cuticulares
PP2C3	Solyc06g076400	Protein phosphatase 2C	Liang <i>et al.</i> , 2021	Biosíntesis de componentes cuticulares
TTS1	Solyc12g006530.1	Terpene synthase 1	Ding <i>et al.</i> , 2018	Biosíntesis de componentes cuticulares
TTS2	Solyc12g006530.1	Terpene synthase 2	Wang <i>et al.</i> , 2011	Biosíntesis de componentes cuticulares
FATB	AT1G08510	Fatty acyl- <i>acp</i> thioesterases B	Bonaventure <i>et al.</i> , 2003	Biosíntesis de componentes cuticulares
GDSL	AT5G22810	GDSL-motif esterase/acyltransferase/lipase	Petit <i>et al.</i> , 2014	Biosíntesis de componentes cuticulares
FAR6	AT3G56700	Fatty-acyl-CoA reductase	Costaglioli <i>et al.</i> , 2005	Biosíntesis de componentes cuticulares
WSD1	AT5G37300	Wax Ester Synthase	Lee y Suh., 2015	Biosíntesis de componentes cuticulares
ABCG12	AT1G51500	ATP-Binding Cassette G12	Lee y Suh., 2015	Transporte de componentes cuticulares
ECH	AT1G09330	ECHIDNA	Lee y Suh., 2015	Transporte de componentes cuticulares
FAP1	AT3G63170	Fatty-Acid-Binding Protein 1	Kong <i>et al.</i> , 2020	Transporte de componentes cuticulares
FAP2	AT2G26310	Fatty-Acid-Binding Protein 2	Kong <i>et al.</i> , 2020	Transporte de componentes cuticulares

FAP3	AT1G53520	Fatty-Acid-Binding Protein 3	Kong <i>et al.</i> , 2020	Transporte de componentes cuticulares
GNL1	AT5G39500	GNOM-LIKE 1	Xue <i>et al.</i> , 2014	Transporte de componentes cuticulares
LTP1	AT2G38540	Lipid Transporter Protein 1	Ding <i>et al.</i> , 2018	Transporte de componentes cuticulares
LTP2	AT2G38530	Lipid Transporter Protein 2	Ding <i>et al.</i> , 2018	Transporte de componentes cuticulares
LTP3	AT5G59320	Lipid Transporter Protein 3	DeBono <i>et al.</i> , 2009	Transporte de componentes cuticulares
LTPG1	AT1G27950	Glycosylphosphatidylinositol-anchored LTP1	Kong <i>et al.</i> , 2020	Transporte de componentes cuticulares
LTPG2	AT3G43720	Glycosylphosphatidylinositol-anchored LTP2	Kong <i>et al.</i> , 2020	Transporte de componentes cuticulares
WBC11	AT1G17840	ABC Transporter White-Brown Complex Protein 11	Panikashvili <i>et al.</i> , 2010	Transporte de componentes cuticulares
ABCG11	Solyc03g019760	ABC transporter G family member 11	Panikashvili <i>et al.</i> , 2010	Transporte de componentes cuticulares
ABCG32	Solyc05g018510	ABC transporter G family member 32	Elejalde-Palmett <i>et al.</i> , 2021	Transporte de componentes cuticulares
ABCG42	Solyc06g065670	ABC transporter G family member 42	Elejalde-Palmett <i>et al.</i> , 2021	Transporte de componentes cuticulares
CUS1	SGN-U585129	Cutin Synthase 1	Isaacson <i>et al.</i> , 2009	Ensamblaje de componentes cuticulares
CUS2	AT5G33370	Cutin Synthase 2	Isaacson <i>et al.</i> , 2009	Ensamblaje de componentes cuticulares
DCR	Solyc03g025320	Hydroxycinnamoyl transferase	Petit <i>et al.</i> , 2021	Ensamblaje de componentes cuticulares
EXP1	Solyc06g051800	Expansin 1	Minoia <i>et al.</i> , 2016	Modificación de pared celular
GPAT4	AT1G01610	Glycerol-3-phosphate-acyltransferase 4	Kong <i>et al.</i> , 2020	Ensamblaje de componentes cuticulares
GPAT5	Solyc01g094700	Glycerol-3-phosphate-acyltransferase 5	Kong <i>et al.</i> , 2020	Ensamblaje de componentes cuticulares
GPAT6	AT2G38110	Glycerol-3-phosphate-acyltransferase 6	Kong <i>et al.</i> , 2020	Ensamblaje de componentes cuticulares
GPAT8	AT4G00400	Glycerol-3-phosphate-acyltransferase 8	Kong <i>et al.</i> , 2020	Ensamblaje de componentes cuticulares

PG2a	Solyc10g080210	Polygalacturonase	Saladie <i>et al.</i> , 2004	Modificación de pared celular
Pme2	Solyc07g064180	Pectin Methylesterase 2	Saladie <i>et al.</i> , 2004	Modificación de pared celular

Cuadro 7. Factores de transcripción incluidos en la base de datos CuticulaDB

Nombre del gen	Identificador	Familia de FT	Referencia
WRI1	AT3G54320	AP2/ERF/AP2	To <i>et al.</i> , 2012
WRI3	AT1G16060	AP2/ERF/AP2	To <i>et al.</i> , 2012
WRI4	AT1G79700	AP2/ERF/AP2	Park <i>et al.</i> , 2016
DEWAX	AT5G61590	AP2/ERF/ERF	Lee y Suh., 2015
DEWAX2	AT5G07580	AP2/ERF/ERF	Kim <i>et al.</i> , 2018
SHINE2	AT5G11190	AP2/ERF/ERF	Aharoni <i>et al.</i> , 2004
SHINE3	Solyc06g065820	AP2/ERF/ERF	Shi <i>et al.</i> , 2013
WIN1	AT1G15360	AP2/ERF/ERF	Kannangara <i>et al.</i> , 2007
WXP1	AEX93412	AP2/ERF/ERF	Zhang <i>et al.</i> , 2007
WXP2	AEX93413	AP2/ERF/ERF	Zhang <i>et al.</i> , 2007
CFL1	AT2G33510	bHLH	Li <i>et al.</i> , 2016
HY5	AT5G11260	bZIP	Qiu <i>et al.</i> , 2019
ANL2	AT4G00730	HB-HD-Zip	Kubo <i>et al.</i> , 1999
CD2	Solyc01g091630	HB-HD-Zip	Nadakuduti <i>et al.</i> , 2012
GL2	Solyc03g120620	HB-HD-Zip	Wang <i>et al.</i> , 2015
HDG1	AT3G61150	HB-HD-Zip	Lee y Suh., 2015
OCL1	GRMZM2G026643	HB-HD-Zip	Javelle <i>et al.</i> , 2010
Wolly	Solyc02g080260	HB-HD-Zip	Xiong <i>et al.</i> , 2020
Tkn4	Solyc01g100510	HB-NOX	Qiu <i>et al.</i> , 2019
SolycHsfC1	Solyc12g007070	HSF	Qiu <i>et al.</i> , 2019
Def	Solyc04g081000	MADS-MIKC	Qiu <i>et al.</i> , 2019
FUL1/TDR4	Solyc06g069430	MADS-MIKC	Bemer <i>et al.</i> , 2012
FUL2/MBP7	Solyc03g114830	MADS-MIKC	Bemer <i>et al.</i> , 2012
TAGL1	Solyc07g055920	MADS-MIKC	Vrebalov <i>et al.</i> , 2009
Ant1	Solyc10g086260	MYB	Qiu <i>et al.</i> , 2019
MYB106	AT3G01140	MYB	Oshima <i>et al.</i> , 2013
MYB12	Solyc01g079620	MYB	Ballester <i>et al.</i> , 2016
MYB16	AT5G15310	MYB	Oshima y Mitsuda <i>et al.</i> , 2013
MYB30	AT3G28910	MYB	Lee y Suh., 2015
MYB31	Solyc03g116100	MYB	Xiong <i>et al.</i> , 2020
MYB41	AT4G28110	MYB	Cominelli <i>et al.</i> , 2008
MYB5b	AT3G13540	MYB	Hen-Avivi <i>et al.</i> , 2013
MYB94	AT3G47600	MYB	Lee y Suh., 2015
MYB96	AT5G62470	MYB	Seo <i>et al.</i> , 2011
NOR	NP_001234652.1	NAC	Gao <i>et al.</i> , 2020
Solyc10g083450	Solyc10g083450	NAC	Qiu <i>et al.</i> , 2019
NFXL2	AT5G05660	NF-X1	Lisso <i>et al.</i> , 2012
CNR	Solyc02g077920	SBP	Eriksson <i>et al.</i> , 2004
WRKY44	Solyc10g084380	WRKY	Qiu <i>et al.</i> , 2019

Cuadro 8. Genes que regulan la biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares a nivel postranscripcional y postraduccionales incluidos en la base de datos CuticulaDB.

Nombre	Identificador	Nombre completo de gen	Referencia	Función biológica
AGO1	AT1G48410	ARGONAUTE 1	Lee y Suh., 2015	Regulación postranscripcional
CER7	AT3G60500	ECERIFERUM 7	Lee y Suh., 2015	Regulación postranscripcional
DCL4	AT5G20320	DICER-LIKE 4	Lee y Suh., 2015	Regulación postranscripcional
HEN1	AT4G20910	Hua Enhancer 1	Lee y Suh., 2015	Regulación postranscripcional
SAGL1	AT1G55270	Small And Glossy Leaves 1	Lee y Suh., 2015	Regulación postranscripcional
WAR3	AT1G14790	RNA-Dependent RNA Polymerase 1	Lee y Suh., 2015	Regulación postranscripcional
WAR4	AT5G23570	Suppressor Of Gene Silencing 3	Lee y Suh., 2015	Regulación postranscripcional
WAR5	AT3G15390	Silencing Defective 5	Lee y Suh., 2015	Regulación postranscripcional
WAR6	AT3G49500	RNA-Dependent RNA Polymerase 6	Lee y Suh., 2015	Regulación postranscripcional
CER9	AT4G34100	ECERIFERUM 9	Lee y Suh., 2015	Regulación postraduccionales
HUB1	AT2G44950	Histone Mono-Ubiquitination 1	Lee y Suh., 2015	Regulación postraduccionales
HUB2	AT1G55250	Histone Mono-Ubiquitination 2	Lee y Suh., 2015	Regulación postraduccionales

Posteriormente, para identificar los probables transcritos de guanábana homólogos a los genes de cutícula, se llevó a cabo un BLAST bidireccional entre los transcritos ensamblados con StringTie y los genes almacenados en la base de datos CuticulaDB. Inicialmente, esta comparación nos permitió identificar un total de 1,262 transcritos con hit a genes de la base de datos CuticulaDB. Después de llevar a cabo el curado manual para eliminar posibles falsos positivos, el cual consistió en la búsqueda de los dominios funcionales, análisis de alineamientos de las secuencias y el análisis filogenético. Este análisis confirmó la identificación de 1,011 transcritos de guanábana homólogos a los genes involucrados en la biosíntesis de la cutícula. Entre los transcritos homólogos, se encontraron 790 con hit a 67 genes distintos relacionados con la biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares, 141 transcritos con hit a 27 factores de transcripción de 12 familias distintas relacionadas con la regulación a nivel transcripcional de estos procesos, 73 transcritos con hit a 9 genes involucrados en la regulación a nivel postranscripcional y por último, 7 transcritos con hit a 3 genes involucrados en la regulación a nivel postraduccionales relacionada con la biosíntesis de la cutícula.

Adicionalmente, la construcción de árboles filogenéticos de los transcritos de guanábana con genes de la base de datos de cutícula y el análisis de dominios funcionales permitió identificar los ortólogos de guanábana de 18 factores de transcripción implicados en la regulación de la

biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares, incluyendo los transcritos ortólogos a los factores de transcripción WIN1 y SHINE3, que regulan la biosíntesis de ceras y cutina, respectivamente (Figuras 14A y 14B). Además, también se identificaron 25 transcritos de guanábana ortólogos a estos genes como LTPG1, KCS9 y WSD6, que están involucradas en el transporte de lípidos, la elongación de ácidos grasos y la biosíntesis de ceras, respectivamente (Cuadros 9 y 10).

Cuadro 9. Lista de transcritos de guanábana ortólogos a factores de transcripción

Factor de transcripción	Familia	Transcrito ortólogo
DEWAX2	AP2/ERF-ERF	evm.model.scaf_119.264
N1	AP2/ERF-ERF	evm.model.scaf_243.396
WRI3	AP2/ERF-AP2	evm.model.scaf_241.139
WXP2	AP2/ERF-ERF	evm.model.scaf_5.425
SHINE3	AP2/ERF-ERF	evm.model.scaf_116.35
HY5	bZIP	MSTRG.10368.2
GL2	HB-HD-Zip	MSTRG.10297.1
Woolly	HB-HD-Zip	evm.model.scaf_920.150.4
FUL1/TDR4	MADS-MIKC	evm.model.scaf_91.158
TAGL1	MADS-MIKC	evm.model.scaf_709.65
MYB16	MYB	evm.model.scaf_60.96
MYB5b	MYB	evm.model.scaf_158.1416
ant1	MYB	evm.model.scaf_72.51
MYB12	MYB	evm.model.scaf_226.48
MYB31	MYB	MSTRG.2011.1
Solyc10g083450	NAC	evm.model.scaf_47.13
NFXL2	NF-X1	evm.model.scaf_145.54
kn4	WRKY	evm.model.scaf_244.86

Cuadro 10. Lista de transcritos de guanábana ortólogos a genes de biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares.

Nombre de gen	Transcrito ortólogo
ACBP1	evm.model.scaf_214.150
ACLA3	evm.model.scaf_173.186
ATT1	evm.model.scaf_214.248
CER1	evm.model.scaf_180.84
CER10	evm.model.scaf_164.314
CER17	evm.model.scaf_243.349
CER2	evm.model.scaf_244.213
CER4	evm.model.scaf_206.292
CYTB5-B	evm.model.scaf_75.539
ELO2	evm.model.scaf_83.356
F3H	evm.model.scaf_101.424
FDH	evm.model.scaf_101.174
KCR1	evm.model.scaf_75.291
KCS2	evm.model.scaf_60.57
KCS9	evm.model.scaf_220.120
LCY	MSTRG.1090.2
PAS2	evm.model.scaf_179.123
WSD6	evm.model.scaf_33.157
KCS3	evm.model.scaf_156.479
ECH	evm.model.scaf_74.310
FAP1	evm.model.scaf_10.29
FAP2	evm.model.scaf_43.157
FAR6	evm.model.scaf_158.1451
LTP1	evm.model.scaf_20.486
LTPG1	evm.model.scaf_26.151

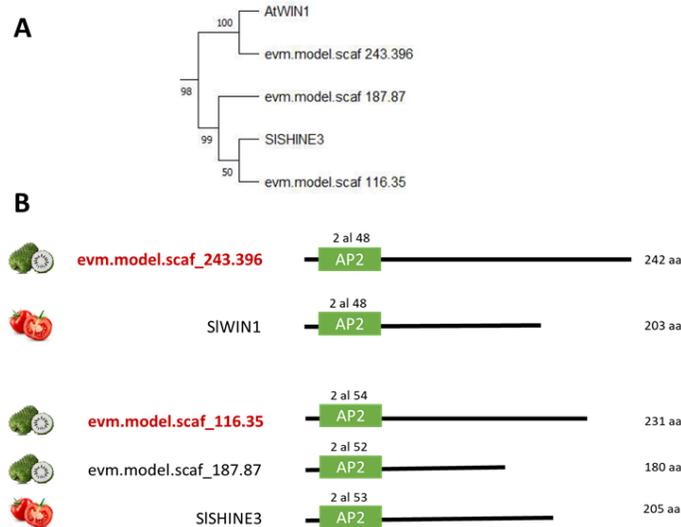


Figura 14. Los transcritos *evm.model.scaf_243.396* y *evm.model.scaf_116.35* fueron cercanos filogenéticamente con los factores de transcripción WIN1 y SHINE3 respectivamente (A). Además, presentaron un tamaño de secuencia similar y contienen el dominio AP2 que característico de los factores de transcripción de la familia AP2 (B).

Los resultados obtenidos hasta el momento permitieron identificar transcritos que codifican para factores de transcripción, reguladores transcripcionales y genes de biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares en el transcriptoma de frutos de guanábana, lo cual permitió conocer los patrones de expresión de estos transcritos durante la maduración poscosecha de los frutos de guanábana.

6.4. Análisis de los Patrones de Expresión de Factores de Transcripción y Reguladores Transcripcionales Durante la Maduración de Frutos de Guanábana

6.4.1 Análisis Exploratorio de los Patrones de Expresión de los Transcritos Ensamblados Durante la Maduración de los Frutos de Guanábana

En nuestro grupo de trabajo se determinaron los niveles de expresión del total de los transcritos

ensamblados con genoma de referencia (41,045 transcritos). Después del mapeo de las lecturas de las muestras de exocarpo de frutos en estado de madurez fisiológica, madurez comercial y senescencia al transcriptoma de referencia, se obtuvo el número de reads (lecturas) para cada transcrito. Estas lecturas crudas fueron normalizadas a CPM (cuentas por millón) para determinar los niveles de expresión de los transcritos en los tres estados de madurez de los frutos de guanábana. Los resultados muestran que un total de 31,364 transcritos (76.4%) fueron considerados como transcritos expresados en los tres estados de madurez. También se encontró que el número de transcritos expresados va disminuyendo conforme avanza la vida poscosecha de los frutos, y que los niveles de expresión de los transcritos también van disminuyendo conforme avanza la maduración de los frutos (Figura 15A). Esto sugiere que la actividad transcripcional de los transcritos disminuye conforme el proceso de la maduración de los frutos avanza. Por otro lado, la comparación de los transcritos expresados en cada uno de los estados de madurez mostró que 23,271 de 31,364 (74%) se expresan en los tres estados de maduración evaluados (madurez fisiológica, madurez comercial y sobremaduro), aunque también se encontraron transcritos que se expresaron solamente en un estado de maduración en específico, los cuales podrían llevar a cabo funciones esenciales en esos estados de madurez (Figura 15B).

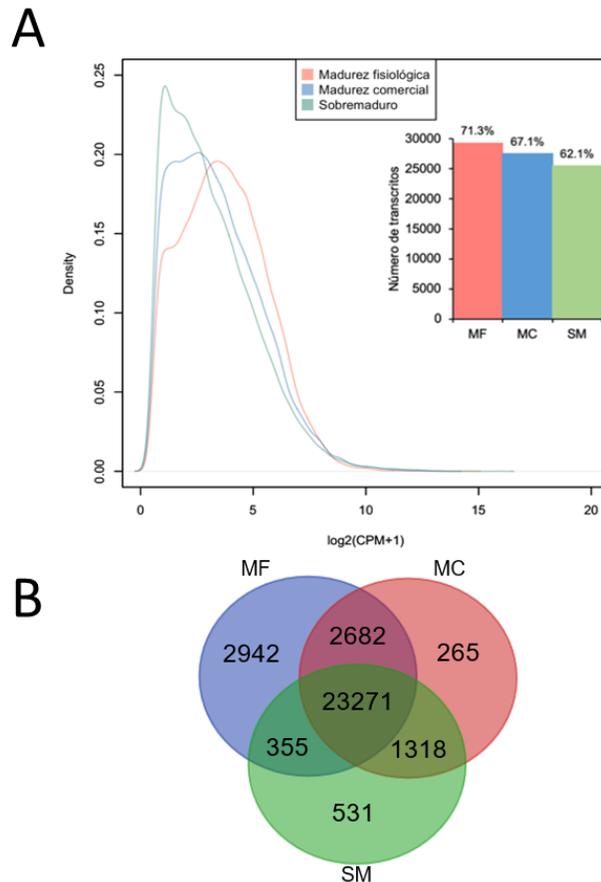


Figura 15. Análisis de expresión de los transcritos ensamblados en donde se muestra la distribución de los niveles de expresión de los transcritos expresados (A) y los transcritos expresados en todos los estados de maduración poscosecha y los transcritos expresados en un estado de maduración en específico (B). MF = Maduración fisiológica, MC = Maduración comercial y SM = Sobremaduro.

6.4.1.1. Patrón de expresión de factores de transcripción. Con base en los niveles de expresión determinados para los transcritos ensamblados con genoma de referencia, se evaluaron los patrones de expresión de los transcritos que codifican para factores de transcripción. Como se puede observar en la figura 16A, el patrón caracterizado por la disminución de la actividad transcripcional de los transcritos a lo largo de la maduración poscosecha de los frutos de guanábana también se observó para los transcritos que codifican para factores de transcripción. De los 1,887 factores de transcripción identificados en frutos de guanábana, 1,492 (79%) se consideraron expresados y el número de factores de transcripción expresados fue disminuyendo conforme avanzó la maduración poscosecha de los frutos de guanábana. De estos 1,492 factores de transcripción expresados, 1,119

de ellos (75%) se expresaron en los tres estados de maduración del fruto, mientras que el resto se expresó en dos de los tres estados de maduración o en un estado de maduración en específico (Figura 16B). Los factores de transcripción expresados específicamente en cada uno de los estados de los tres estados de maduración poscosecha del fruto están involucrados en diversos procesos biológicos. Por ejemplo, se identificaron 135 factores de transcripción expresados exclusivamente en maduración fisiológica, los cuales están involucrados entre otros, en procesos relacionados con el desarrollo del fruto, síntesis de flavonoides y regulación de la biosíntesis de lípidos, en donde estos últimos son procesos biológicos característicos de la biosíntesis de componentes cuticulares y maduración del fruto (Cuadro 11). En el caso de los 12 factores de transcripción que se expresan exclusivamente en maduración comercial, estos se encuentran involucrados en procesos como la regulación de la biosíntesis de lípidos y la pared celular, que, de igual forma, son procesos biológicos característicos de la biosíntesis de componentes cuticulares y maduración del fruto (Cuadro 11).

6.4.1.2. Patrón de expresión de los reguladores transcripcionales. Del total de 611 reguladores transcripcionales identificados en frutos de guanábana, 544 de ellos (89%) se encontraron expresados durante la maduración de los frutos de guanábana, asimismo, también mostraron el patrón de expresión característico de disminuir conforme fue avanzando el almacenamiento poscosecha (Figura 16C). La comparación de estos 544 reguladores transcripcionales expresados mostró que, 453 de ellos (83%) se expresaron en todos los estados de maduración y el resto presentó expresión específica en uno o dos estados de maduración, sin embargo, cabe destacar que no se encontraron reguladores transcripcionales que se expresaran exclusivamente en maduración comercial (Figura 16D). Los reguladores transcripcionales que se expresan específicamente en un estado de maduración poscosecha se encuentran involucrados en diversos procesos biológicos, destacando en el caso de los 36 expresados específicamente en la maduración fisiológica el desarrollo del fruto, la regulación epigenética, respuesta a estrés biótico y abiótico, entre otros (Cuadro 12).

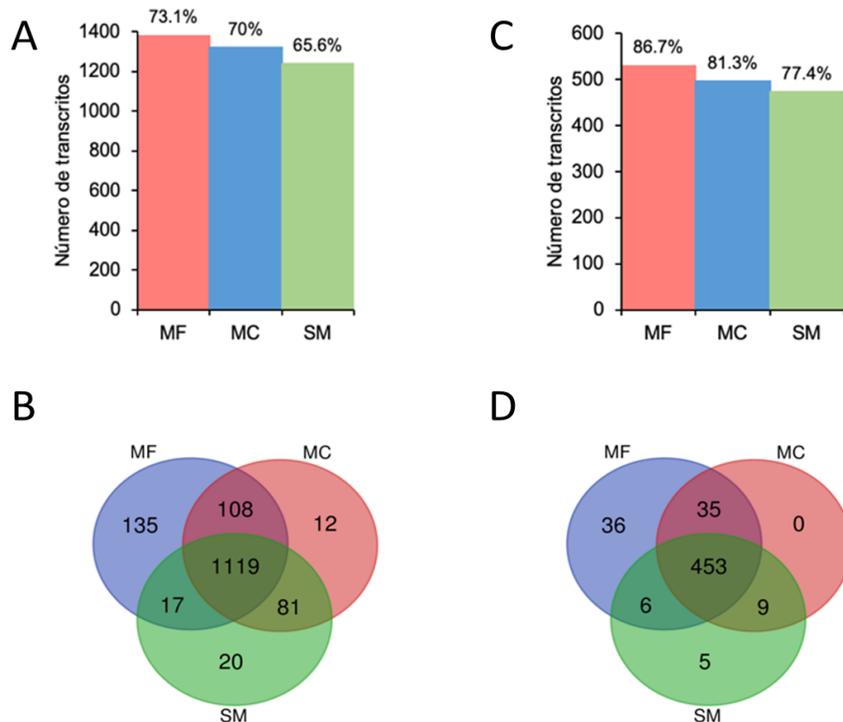


Figura 16. Factores de transcripción y reguladores transcripcionales expresados durante la maduración poscosecha de frutos de guanábana. Número total de factores de transcripción expresados en cada uno de los tres estados de maduración poscosecha de los frutos de guanábana (A). Número de factores de transcripción expresados en todos los estados de maduración y en un estado de maduración en específico (B). Número total de reguladores transcripcionales expresados en cada uno de los tres estados de maduración poscosecha de los frutos de guanábana (C). Número total de reguladores transcripcionales expresados en todos los estados de maduración y un estado de maduración poscosecha en específico (D). MF = Maduración fisiológica, MC = Maduración comercial y SM = Sobremaduro.

Cuadro 11. Procesos biológicos en los que están involucrados los factores de transcripción que se expresan específicamente en uno de los estados de maduración poscosecha de los frutos de guanábana. MF = Maduración fisiológica, MC = Maduración comercial y SM = sobremaduro.

Estado de maduración	5 familias más representadas	Proceso biológico	Nombre de factor de transcripción
MF (135)	bHLH, MYB, AP2/ERF-ERF, NAC, C2C2-Dof	Regulación de la proliferación celular, tolerancia a estrés abiótico, desarrollo del fruto, síntesis flavonoides, señalización ABA, regulación de biosíntesis de lípidos	ANT, CBF2, TINY2, SPT, MYB111, MYB15, SPL, WRI1, MYB60
MC (12)	AP2/ERF-AP2, AP2/ERF-ERF, B3-ARF, bZIP, HB-KNOX	Regulación de biosíntesis de lípidos, respuesta a estrés biótico y abiótico, señalización auxinas, regulador biogénesis pared celular	WRI1, AIL6, ERF12, DREB26, KNAT7
SM (20)	bHLH, MADS-M-type, MYB, MYB related, B3	Respuesta a auxinas, muerte celular, respuesta a estrés biótico y abiótico, diferenciación celular	ARF1, ICE1, SEP2, MYB52, NFYB3, SAP, HSFA2

Cuadro 12. Procesos biológicos en los que están involucrados los reguladores transcripcionales que se expresan específicamente en uno de los estados de maduración poscosecha de los frutos de guanábana. MF = Maduración fisiológica, MC = Maduración comercial.

Estado de maduración	5 familias más representadas	Proceso biológico	Nombre del regulador transcripcional
MF (36)	AUX/IAA, GNAT, mTERF, SET, SNF2	Señalización y respuesta a auxinas, diferenciación celular, tolerancia a estrés abiótico, desarrollo del fruto, maduración de semilla, señalización ABA, regulación epigenética	IAA25, ARF9, IAA26, SCL22, LUG, AHK1, ATX2, SYD, SUVR4, SUVH4, ASHH3, CLSY3
MC (5)	mTERF, SET, SNF2, Others	Respuesta a estrés biótico y abiótico, regulación negativa de citoquininas, regulación senescencia	AHK2, ARR9, EZA1, SYD

6.4.1.3. Patrón de expresión de los genes relacionados con la biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares. Para evaluar el patrón de expresión de los genes relacionados con biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares durante la maduración poscosecha de los frutos de guanábana, se evaluaron los niveles de expresión de 63 genes relacionados con la biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares, los cuales fueron identificados en la comparación con la base de datos CuticulaDB. Los resultados mostraron que 54 de estos 63 genes (89.4%) se expresaron durante la maduración de los frutos de guanábana. De manera interesante, en estos genes se observó una disminución en los niveles de expresión conforme los frutos se acercan a la senescencia, igual que con lo observado en los factores de transcripción y reguladores transcripcionales (Figura 17A). La comparación de los 54 genes expresados, mostró que 41 genes se expresaron en todos los estados de maduración poscosecha, 5 se expresaron solamente en maduración fisiológica, uno en maduración comercial y uno en sobremaduro. Por otro lado, 6 genes se expresaron tanto en maduración fisiológica como en la maduración comercial (Figura 17B).

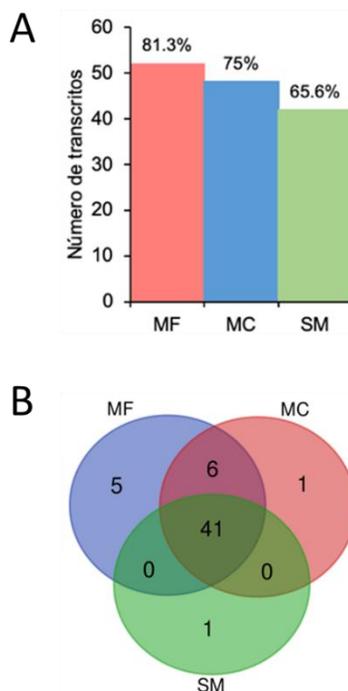


Figura 17. Genes de biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares durante la maduración poscosecha de frutos de guanábana. Número total de genes expresados en cada uno de los tres estados de maduración poscosecha de los frutos de guanábana (A). Número de genes expresados en todos los estados de maduración y en un estado de maduración en específico (B). MF = Maduración fisiológica, MC = Maduración comercial y SM = Sobremaduro.

Para tratar de entender a mayor profundidad el proceso de biosíntesis de componentes cuticulares durante la maduración de los frutos de guanábana en almacenamiento en poscosecha, se analizó el perfil de expresión de genes relacionados con la regulación, biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares; incluyendo 8 de regulación, 15 de biosíntesis, cuatro de transporte y tres de ensamblaje. El análisis de expresión mostró que la mayoría de los genes evaluados presentaron una disminución de los niveles de expresión conforme se avanza hacia el estado de madurez sobremaduro, no obstante, algunos genes mostraron un nivel de expresión alto en los tres estados de madurez evaluados (Figura 18). En cuanto a los genes de regulación, se pueden destacar WXP2 y CD2, que regulan la biosíntesis de ceras y cutina, respectivamente, disminuyen su expresión conforme avanza la maduración poscosecha de los frutos de guanábana. Por otro lado, MYB31 y WRI1, que regulan la biosíntesis de ceras y biosíntesis de lípidos, respectivamente, muestran un aumento en su expresión al pasar de maduración fisiológica a maduración comercial y vuelve a disminuir al pasar a la fase de maduración sobremaduro. En el caso del factor de transcripción

NFXL2, que regula el ensamblaje de la cutícula, mantiene una expresión constante durante la maduración poscosecha del fruto (Figura 18).

Por otro lado, el análisis de los genes relacionados con la biosíntesis de componentes cuticulares mostró que la mayoría de los genes evaluados (LYC, BDG, ELO2, KCS2, KCS6, KAS1, KCS4, CHS2, FDH, F3H y ACC1) disminuyeron su expresión conforme avanzó la maduración poscosecha de los frutos de guanábana. Por lo contrario, ACC1 y PP2C3 mostraron un incremento en la expresión en los estados de madurez comercial y sobremaduro. Mientras que, KCS2 y KCS6, los cuales están relacionados con la biosíntesis de ácidos grasos de cadena muy larga, no se expresaron en el estado de maduración sobremaduro. De acuerdo con lo anterior, los genes de transporte y ensamblaje de componentes cuticulares también mostraron una disminución en los niveles de expresión conforme avanza la maduración poscosecha de guanábana, con excepción de FAP2, el cual presenta una alta expresión durante la maduración comercial y sobremaduro. El gen ABCG32 solo mostró expresión durante la maduración fisiológica y LTPG1 no se expresó cuando el fruto entró a la etapa de sobremaduro. En cuanto a los genes de ensamblaje, CUS2 solo se expresó durante la maduración fisiológica y DCR fue disminuyendo su expresión durante la maduración poscosecha, a tal grado de que no se expresó durante la fase sobremaduro (Figura 18). Estos datos sugieren que la biosíntesis de la cutícula en frutos de guanábana disminuye cuando estos se acercan al estado de madurez comercial y sobremaduro.

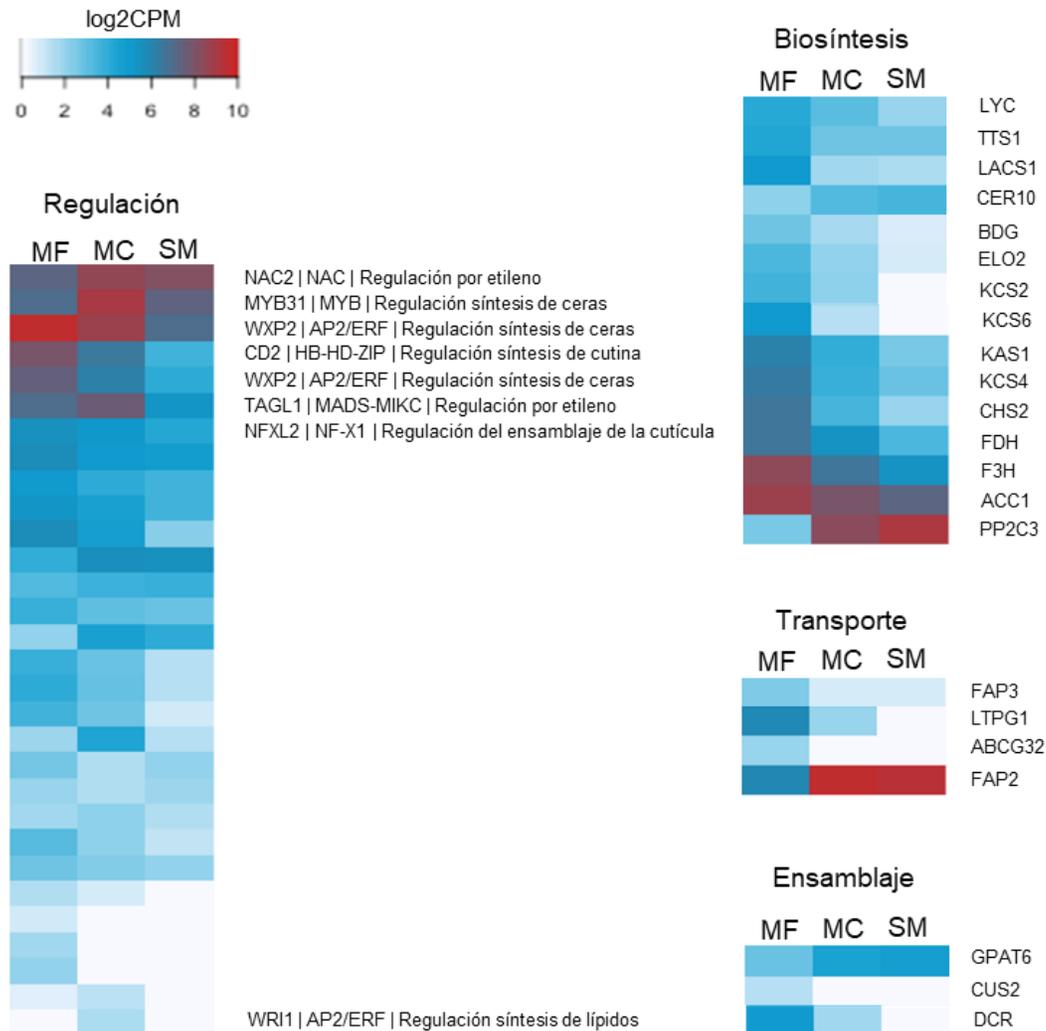


Figura 18. Nivel de expresión de genes relacionados con la regulación, biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares durante la maduración poscosecha de frutos de guanábana.

6.4.2. Análisis de Expresión Diferencial de los Transcritos Ensamblados

6.4.2.1 Identificación de factores de transcripción expresados diferencialmente durante la maduración poscosecha de guanábana. A partir de los datos de expresión de los transcritos ensamblados, se identificaron los factores de transcripción que se expresaron diferencialmente durante los tres estados de madurez analizados. Para esto se hicieron las siguientes comparaciones: Madurez comercial vs fisiológica (MFvsMC), madurez comercial vs sobremaduro (MCvsSM) y madurez fisiológica vs sobremaduro (MFvsSM). De esta forma, de los 1,887 factores de

transcripción identificados, 1,164 (61.7%) se expresaron diferencialmente durante la maduración poscosecha de la guanábana. El mayor número de factores de transcripción expresados diferencialmente se encontró en el cambio de etapa de maduración fisiológica a sobremaduro, ya que se encontraron 1,020 factores de transcripción expresados diferencialmente (474 inducidos y 546 reprimidos). Seguido del cambio de madurez fisiológica a comercial 767 FT se expresaron diferencialmente (367 inducidos y 400 reprimidos). Mientras que, el menor número de factores de transcripción expresados diferencialmente fue en el cambio de etapa de maduración comercial a sobremaduro, en donde se encontraron 511 factores de transcripción expresados diferencialmente (240 inducidos y 271 reprimidos). También es interesante resaltar que, en todos los cambios de estado de maduración, el número de factores de transcripción reprimidos fue mayor al número de factores de transcripción inducidos (Figura 19A). La comparación de los FT expresados diferencialmente mostró que, de los 1,164 FT, solo el 18.5% (215) fueron regulados diferencialmente en los tres estados de madurez. Por lo contrario, varios de los FT fueron expresados diferencialmente de manera específica en las comparaciones realizadas, incluyendo 58, 34 y 153 FT para las comparaciones MF_MC, MC_SM y MF_SM, respectivamente (Figura 19B). Estos resultados, sugieren que estos FT podrían estar regulando procesos biológicos esenciales que suceden durante estas etapas de maduración del fruto en el almacenamiento en poscosecha.

6.4.2.2 Identificación de reguladores transcripcionales expresados diferencialmente durante la maduración poscosecha de los frutos de guanábana. En cuanto a los reguladores transcripcionales (RT), de los 611 identificados en los frutos de guanábana, 394 (64.5%) se expresaron diferencialmente durante la maduración poscosecha de los frutos. Al igual que en el caso de los factores de transcripción, el mayor número de reguladores transcripcionales expresados diferencialmente se observó en el paso de la maduración fisiológica a sobremaduro (336, 184 inducidos y 152 reprimidos), mientras que el menor número de reguladores transcripcionales expresados diferencialmente se observó en el cambio de maduración comercial hacia sobremaduro (146, 72 inducidos y 74 reprimidos). En general el número de reguladores transcripcionales inducidos fue mayor que los reprimidos durante la vida poscosecha (Figura 19A). La comparación de los RT expresados diferencialmente, demostró que solo 59 RT fueron regulados diferencialmente durante la vida poscosecha de los frutos. Mientras que, 24, 16 y 85 RT se

expresaron diferencialmente de manera específica en las comparaciones realizadas (Figura 19C). Al igual que los FT expresados diferencialmente, estos RT podrían jugar un papel importante durante la maduración de los frutos de guanábana en poscosecha.

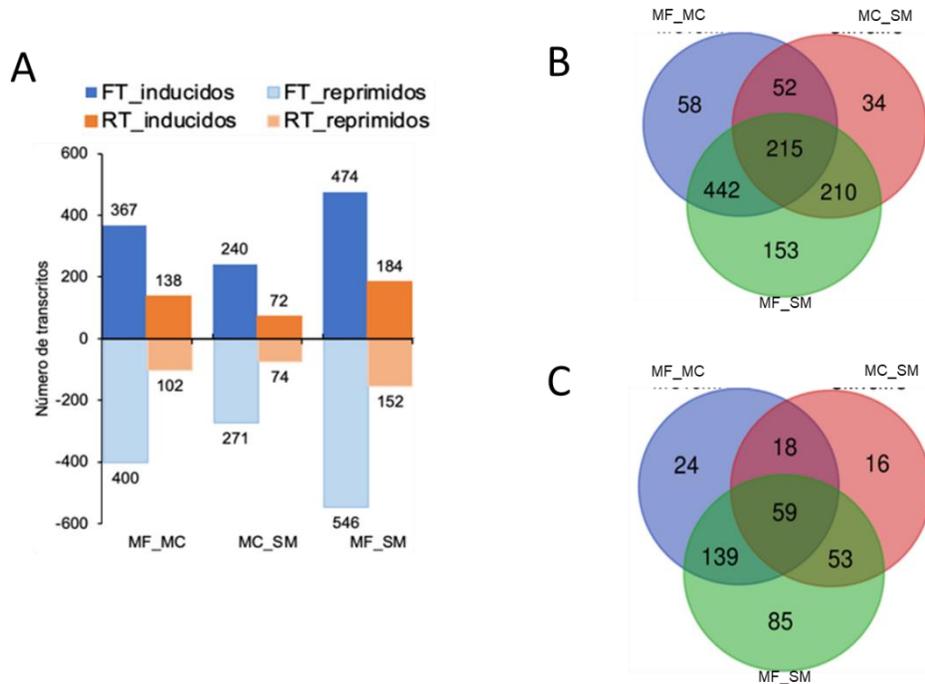


Figura 19. Identificación de factores de transcripción y reguladores transcripcionales expresados diferencialmente durante la maduración poscosecha de frutos de guanábana. A) Número de factores de transcripción y reguladores transcripcionales inducidos y reprimidos en cada cambio de estado de maduración poscosecha. B) Número de factores de transcripción expresados diferencialmente en cada cambio de estado de maduración poscosecha. C) Número de reguladores transcripcionales expresados diferencialmente en cada cambio de estado de maduración poscosecha. MF_MC = Cambio de maduración fisiológica a maduración comercial; MC_SM = Cambio de maduración comercial a sobremaduro; MF_SM = Cambio de maduración fisiológica a sobremaduro.

6.4.2.3. Identificación de genes de biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares expresados diferencialmente durante la maduración poscosecha de frutos de guanábana. De los 54 transcritos relacionados con la biosíntesis de la cutícula que fueron identificados como expresados durante la maduración de los frutos de guanábana, 46 (85.2%) transcritos fueron expresados diferencialmente durante la maduración poscosecha de los frutos, siendo el cambio de maduración fisiológica a sobremaduro donde se encontraron la mayor cantidad de genes expresados

diferencialmente con 43 transcritos; mientras que la menor cantidad de genes expresados diferencialmente fue en el cambio de maduración comercial a sobremaduro con solo 20 transcritos. Interesantemente, los resultados mostraron que durante toda la etapa de maduración poscosecha de los frutos de guanábana, el número de transcritos relacionados con la biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares fueron mayoritariamente reprimidos, lo cual coincide con lo que se encontró en el análisis de los perfiles de expresión de estos transcritos, descrito arriba (Figura 20A y 20B).

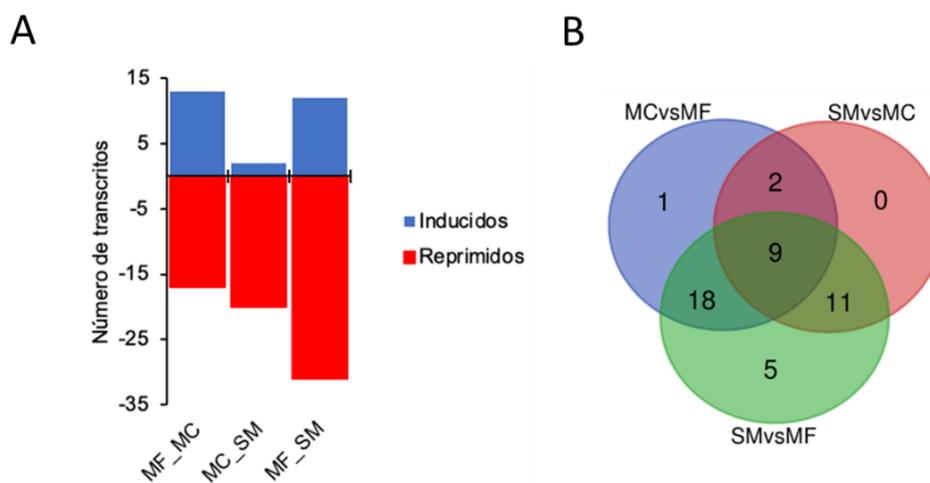


Figura 20. Número de genes de biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares expresados diferencialmente durante la maduración poscosecha de frutos de guanábana. A) Número de genes inducidos y reprimidos en cada cambio de estado de maduración poscosecha. B) Número de genes expresados diferencialmente en cada cambio de estado de maduración. MF_MC = Maduración fisiológica a maduración comercial; MC_SM = Maduración comercial a sobremaduro; MF_SM = Maduración fisiológica a sobremaduro; MCvsMF = Maduración fisiológica a maduración comercial; SMvsMC = Maduración comercial a sobremaduro; SMvsMF = Maduración fisiológica a sobremaduro.

Al analizar en detalle los transcritos relacionados con la cutícula que se expresaron diferencialmente, el mapa de calor mostró que la mayoría de los transcritos relacionados con la regulación fueron reprimidos, solo 9 fueron inducidos durante la maduración de los frutos. Los factores de transcripción HY5 y MYB5, los cuales regulan la biosíntesis de metabolitos secundarios asociados con la cutícula, se inducen desde la maduración fisiológica a la maduración comercial (Figura 21). Los factores de transcripción WRI1 y WRI3, ambos regulan la biosíntesis de lípidos,

también aumentaron su expresión durante este cambio de etapa de maduración (Figura 21). Algo interesante es que los factores de transcripción MYB31 y SHINE3, los cuales regulan la biosíntesis de ceras y cutina, respectivamente, se inducen al pasar de la maduración fisiológica hacia la maduración comercial, pero se reprimen cuando el fruto pasa de maduración comercial hacia la etapa de sobremaduro (Figura 21). Lo cual sugiere que la biosíntesis de la cutícula podría detenerse después de que los frutos están en el estado de madurez comercial. Por otro lado, un mayor número de transcritos relacionados con la regulación de la cutícula se encontraron reprimidos durante la vida poscosecha de los frutos de guanábana. Entre los factores de transcripción que se reprimieron se encuentran WIN1, WOLLY y MYB30, los cuales regulan la biosíntesis de cutina, ceras y ácidos grasos de cadena muy larga, respectivamente (Figura 21). También se encontraron factores de transcripción que no mostraron cambios en su expresión entre la transición de maduración fisiológica a maduración comercial, pero que disminuyeron su expresión durante la transición de maduración comercial a sobremaduro. Estos son los factores de transcripción MYB16 y WXP2, involucrados en la biosíntesis de ceras, CD2, que regula la biosíntesis de cutina y NAC, que regula la biosíntesis de metabolitos secundarios (Figura 21).

Por otro lado, al analizar los transcritos relacionados con la biosíntesis de componentes cuticulares, la mayoría de ellos se reprimieron durante la maduración poscosecha de los frutos de guanábana, con excepción de CER10 y PP2C3, los cuales regulan la biosíntesis de ácidos grasos de cadena muy larga y la biosíntesis de cutícula respectivamente. CER10 se induce durante la transición de maduración fisiológica a comercial, pero no cambió su nivel de expresión durante la transición de maduración comercial a sobremaduro. Por otro lado, PP2C3 aumenta su expresión durante toda la maduración poscosecha del fruto (Figura 21). Estos resultados confirman lo observado en los transcritos de regulación, la biosíntesis de la cutícula se detiene durante la vida poscosecha de los frutos. Mientras que, nuestros análisis mostraron que los genes LTPG1, FAP3 y ABCG32, encargados del transporte de lípidos, ácidos grasos y precursores de cutina disminuyeron su expresión durante la transición de maduración fisiológica a comercial. En el caso de ABCG32, esta disminución de expresión se extendió hasta la etapa de sobremaduro. Por otro lado, FAP2, encargado del transporte de ácidos grasos, aumentó su expresión durante la transición de maduración fisiológica a maduración comercial (Figura 19). Por último, los genes encargados del ensamblaje de cutina, CUS2 y DCR fueron reprimidos durante la transición de maduración fisiológica a comercial. Por el contrario, GPAT6, un gen que participa en el ensamblaje de la cutina, aumentó su expresión durante la transición de maduración fisiológica a comercial (Figura 21).

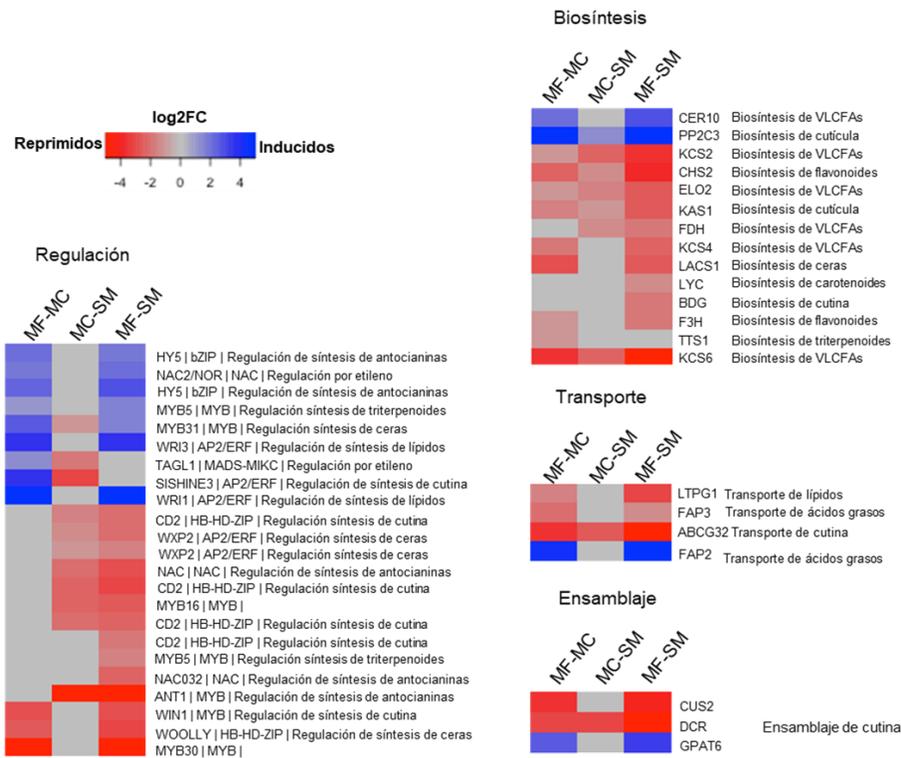


Figura 21. Mapa de calor de los transcritos relacionados con la regulación, biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares expresados diferencialmente durante la maduración poscosecha de frutos de guanábana. MF-MC: Madurez comercial vs Madurez fisiológica, MC-SM: Sobremaduro vs Madurez comercial, MF-SM: Sobremaduro vs Madurez fisiológica.

6.5 Análisis de la Red de Co-Expresión Génica del Transcriptoma de Frutos de Guanábana Durante la Maduración en Poscosecha

Los seres vivos son organismos complejos cuyo correcto funcionamiento depende de procesos altamente coordinados. El proceso de biosíntesis de la cutícula no es la excepción, se ha observado que éste se encuentra regulado a diferentes niveles, incluyendo la regulación transcripcional, la cual depende en gran medida de la interacción a nivel transcripcional de distintas moléculas como proteínas, DNA y RNA. Una manera de estudiar los mecanismos de regulación asociados a los procesos biológicos es a través del estudio de las redes de regulación génica, donde se identifican las interacciones entre los factores de transcripción, reguladores transcripcionales y genes de respuesta (Weirauch, 2011).

Con el objetivo de reconstruir la red de regulación génica involucrada en la regulación de la

biosíntesis de la cutícula en frutos de guanábana se reconstruyó la red de co-expresión usando los datos transcriptómicos obtenidos de la secuenciación de los tres estados de madurez (madurez fisiológica, madurez comercial y sobremaduro). Como análisis preliminar se realizó una clusterización jerárquica de los 31,364 transcritos que se identificaron como expresados durante la maduración poscosecha de los frutos de guanábana, este análisis mostró la formación de 22 grupos que contenían transcritos con patrones de expresión similares (Figura 22). Sugiriendo que los transcritos agrupados con patrones de expresión similares podrían participar en los mismos procesos biológicos.

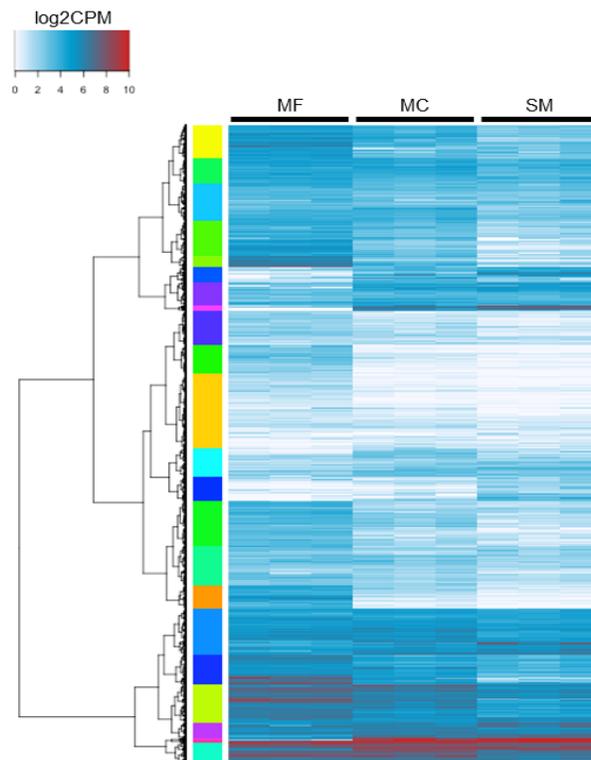


Figura 22. Agrupamiento jerárquico de transcritos expresados durante la maduración poscosecha de frutos de guanábana ($\text{cpm} \geq 0.5$) de acuerdo con su patrón de expresión. Estos fueron agrupados en 22 grupos distintos. Las barras de diferentes colores entre el dendrograma y el mapa de calor representan los diferentes grupos formados.

El análisis funcional de los transcritos contenidos en los 22 grupos formados mostró que en 10 de estos grupos contenían al menos un transcrito asociado a la biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares, asimismo, se encontraron transcritos que codifican para factores de

transcripción y reguladores transcripcionales co-expresados con los transcritos de cutícula, varios de estos no se habían reportado anteriormente como reguladores de la biosíntesis de la cutícula. Lo cual sugiere, que estos podrían ser nuevos reguladores del proceso de biosíntesis de la cutícula, entre otros (Cuadro 13).

Cuadro 13. Número de transcritos, factores de transcripción, reguladores transcripcionales y genes de cutícula presentes en los agrupamientos donde se presentaron los posibles nuevos reguladores de la biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares.

Grupo	Número de transcritos	Número de FTs	Número de RTs	Número de genes de cutícula
2	3,616	154	36	7
3	1,614	95	30	2
4	1,816	101	31	5
5	537	23	1	3
6	1,699	79	28	4
7	3,021	119	50	5
8	2,169	95	44	5
10	1,918	87	36	2
13	1,784	81	39	1
14	2,223	113	56	3

6.5.1. Reconstrucción de la red de co-expresión génica

Para dilucidar la red de regulación que modula la biosíntesis de componentes cuticulares y la identificación de nuevos elementos reguladores se usó el paquete WGCNA en R (Langfelder y Horvath, 2008). Las redes biológicas tienen un comportamiento similar a las redes libres de escala (Khanin y Wit, 2006). Estas se caracterizan principalmente porque muy pocos nodos presentan una alta cantidad de conexiones con otros nodos, mientras que la mayoría de los nodos de la red presentan pocas conexiones con otros nodos. Debido a esto, antes de empezar a reconstruir la red de co-expresión génica, es necesario que los datos de expresión se ajusten al modelo de red libre de escala y que los nodos presenten una conectividad media baja. Para esto, los datos de expresión son elevados a distintas potencias (softthreshold). Una vez que los datos de expresión se elevan a distintas potencias (softthreshold), se analizan los valores del coeficiente de determinación (R^2), el cual indica que tan bien se ajustan los valores al modelo libre de escala y la conectividad media de

los nodos en cada uno de los distintos softthreshold. Después, se elige el softthreshold más bajo que tenga los mejores resultados (un coeficiente de determinación alto y una conectividad media baja). En este caso, se decidió trabajar con un softthreshold de 24, ya que, según el gráfico de diagnóstico, es el softthreshold más bajo que alcanza un valor de R^2 de 0.80 y una conectividad media baja (Figura 23).

Una vez decidió el softthreshold, se comenzó con la reconstrucción de la red de co-expresión génica sin signo (unsigned). Para esto, primeramente, los datos de expresión fueron convertidos a datos de correlación, mediante la comparación por pares de los cambios de expresión de todos los transcritos en las muestras, donde un valor de correlación de 0 indica que dos transcritos no están correlacionados mientras que un valor de correlación de 1 indica que dos transcritos están altamente correlacionados.

El siguiente paso después del cálculo de correlación entre los transcritos es llevar a cabo un agrupamiento de los transcritos en función de sus niveles de correlación en diferentes módulos. En este caso, se decidió que el tamaño mínimo de los módulos fuera de 30 transcritos. Por último, se llevó a cabo un enriquecimiento funcional de los módulos y se visualizaron utilizando Cytoscape, aplicando un filtro de correlación de 0.30.

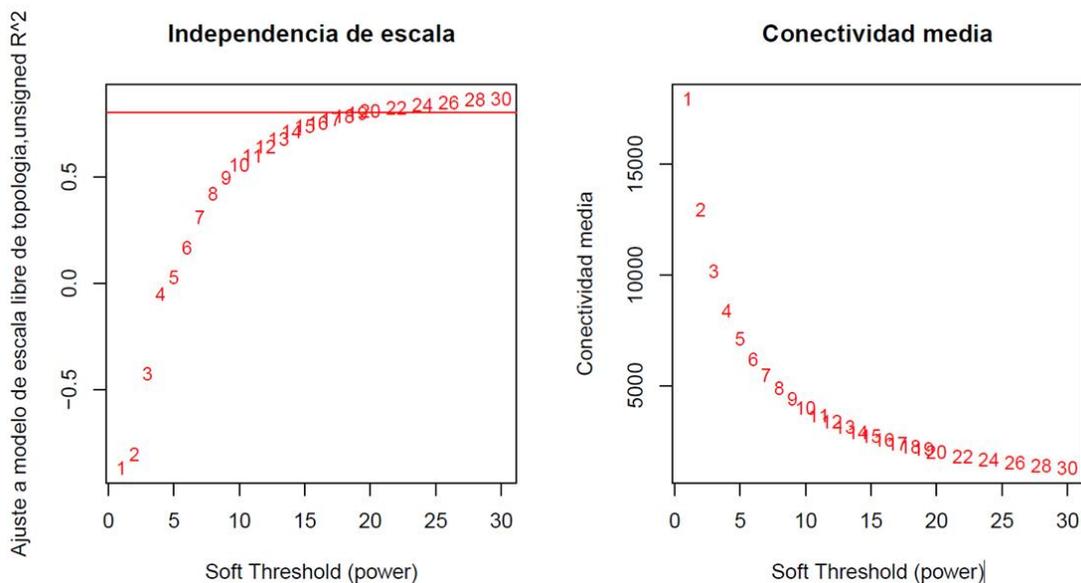


Figura 23. Análisis de la topología de la red para varias potencias del softthreshold

Con la configuración mencionada anteriormente, se reconstruyó una red sin signo (unsigned) con 110 módulos (Figura 24). El módulo más grande fue el turquoise con 6,168 transcritos y el módulo más pequeño fue el tan4, el cual contuvo 39 transcritos (Cuadro 14). Del total de 110 módulos, solamente 63 módulos presentaron factores de transcripción y reguladores transcripcionales. Después de llevar a cabo el enriquecimiento funcional, 14 de los 63 módulos que contuvieron factores de transcripción y reguladores transcripcionales presentaron enriquecimiento funcional (Cuadro 15).

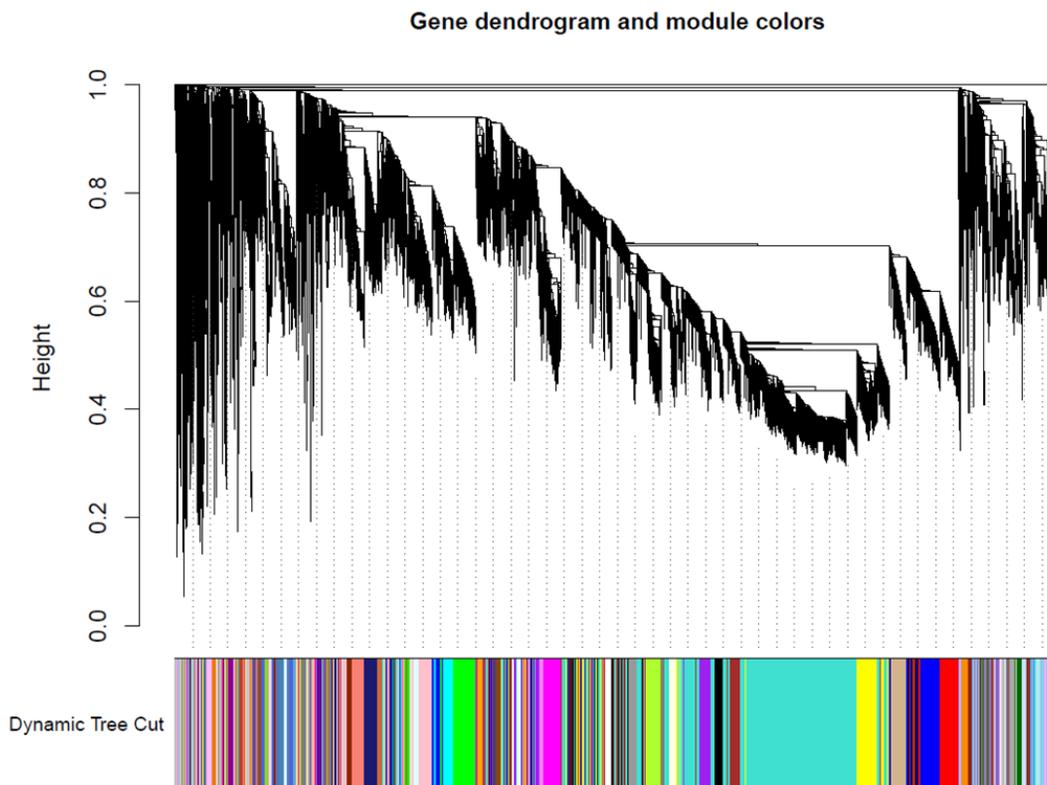


Figura 24. Árbol creado en el paquete de R WGCNA para la agrupación jerárquica de los transcritos de acuerdo con su nivel de correlación. Cada “hoja” del árbol representa un transcrito y las diferentes ramificaciones del árbol fueron agrupadas en 110 módulos distintos.

Cuadro 14. Número de transcritos presentes en los 110 módulos de la red de co-expresión génica del transcriptoma de guanábana.

Nombre de modulo	Número de transcritos dentro del módulo
Turquoise	6,168
Blue	1,644
Brown	1,556
Yellow	1,456
Green	1,052
Red	990
Black	949
Pink	771
Magenta	677
Purple	603
Greenyellow	570
Tan	558
Salmon	552
Cyan	526
Midnightblue	468
Grey	439
Lightcyan	429
Grey60	323
Lightgreen	322
Lightyellow	318
Royalblue	284
Darkred	283
Darkgreen	272
Darkturquoise	264
Darkgrey	249
Orange	243
Darkorange	230

White	228
Skyblue	227
saddlebrown	226
Steelblue	224
Paleturquoise	202
Violet	197
Darkolivegreen	187
Darkmagenta	185
Sienna3	182
Skyblue3	178
Yellowgreen	178
Plum1	171
Mediumpurple3	167
Orangered4	167
Lightcyan1	164
Lightsteelblue1	164
Ivory	153
Floralwhite	147
Darkorange2	146
Bisque4	142
Brown4	142
Darkslateblue	134
Plum2	129
Thistle1	128
Thistle2	128
Palevioletred3	126
Salmon4	126
Navajowhite2	120
Maroon	118

Lightpink4	116
Lavenderblush3	115
Honeydew1	104
Coral1	102
Darkseagreen4	102
Antiquewhite4	98
Coral2	93
Mediumorchid	92
Skyblue2	90
Yellow4	89
Plum	87
Skyblue1	87
Orangered3	86
Mediumpurple2	85
Lightsteelblue	84
Indianred4	82
Lightcoral	82
Darkolivegreen4	81
Firebrick4	81
Brown2	78
Blue2	77
Darkviolet	76
Plum3	75
Thistle3	75
Thistle	74
Salmon2	72
Navajowhite1	71
Palevioletred2	71
Magenta4	69

Lightpink3	68
Darkseagreen3	66
Honeydew	66
Lavenderblush2	66
Coral	65
Antiquewhite2	63
Coral3	62
Mediumpurple4	59
Sienna4	57
Skyblue4	57
Yellow3	57
Orangered1	56
Pink4	56
Lightslateblue	54
Mediumpurple1	54
Lightblue4	53
Indianared3	52
Firebrick3	51
Darkolivegreen2	49
Blue4	47
Blueviolet	47
Deeppink	44
Plum4	42
Thistle4	42
Tan4	39

Cuadro 15. Enriquecimiento funcional de módulos que contienen factores de transcripción y reguladores transcripcionales. El módulo Darkorange2 y Blue2 no presentaron enriquecimiento en proceso biológico, pero sí en función molecular y componente celular.

Módulo	Número de transcritos	Proceso biológico	FTs	RTs
Turquoise	6,168	Metabolismo de ncRNA	333	104
Yellow	1,456	Metabolismo de péptidos	80	37
Black	949	Metabolismo de macromoléculas	60	22
Pink	771	Transporte mediado por vesículas	20	12
Magenta	677	Metabolismo de pared celular	81	6
Greenyellow	570	Fotosíntesis	22	9
Lightcyan	429	Transporte mediado por vesículas	5	3
Grey60	323	Metabolismo de carbohidratos	17	3
Darkgreen	272	Metabolismo de pectina	7	1
Darkolivegreen	187	Regulación de ubiquitinación de proteínas	4	1
Darkmagenta	185	Regulación de la replicación de ADN	3	2
Yellowgreen	178	Metabolismo de péptidos	5	1
Darkorange2	146	N/A	2	1
Blue2	77	N/A	1	1

De estos 14 módulos con enriquecimiento funcional, es interesante estudiar un poco más a fondo cuatro de ellos (black, yellow, greenyellow y darkgreen), ya que estos además de presentar factores de transcripción y reguladores transcripcionales, presentaron genes de biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares, lo cual podría significar que los factores de transcripción y reguladores transcripcionales presentes en estos cuatro módulos, podrían ser reguladores de estos procesos. Adicionalmente, al llevar a cabo un agrupamiento jerárquico de los transcritos de acuerdo con su patrón de expresión presentes en estos módulos, se obtuvieron agrupamientos de genes con patrones de expresión muy similares en donde están presentes factores de transcripción, reguladores transcripcionales y genes de biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares (Figura 25 a 27).

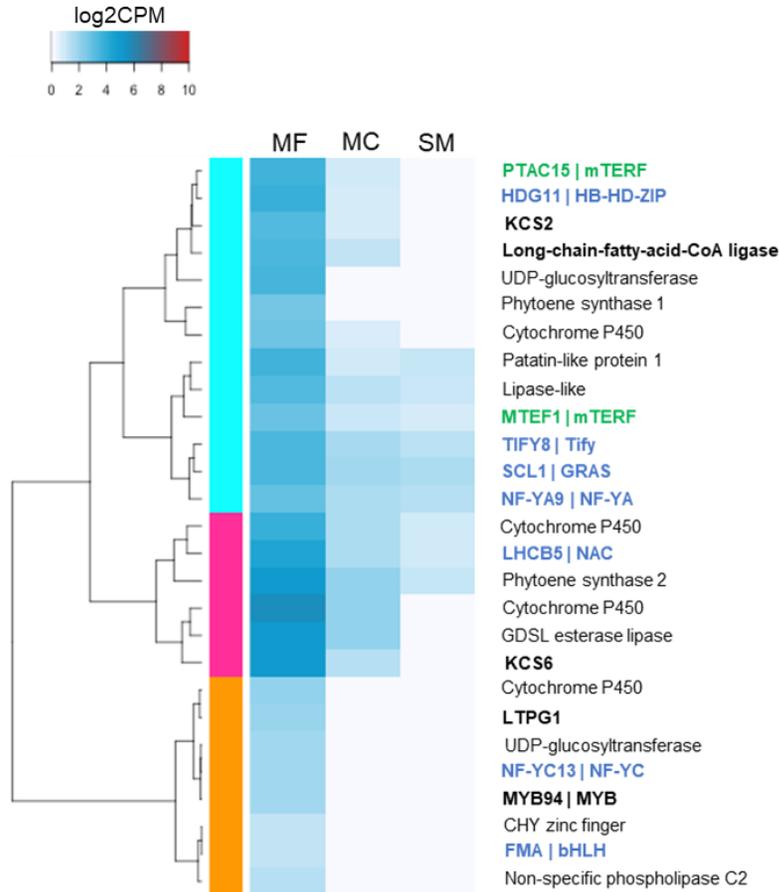


Figura 25. Agrupamiento jerárquico de acuerdo con el patrón de expresión durante la maduración poscosecha del fruto de guanábana de los transcritos presentes en el módulo greenyellow. Los genes en verde son reguladores transcripcionales, los genes en azul son factores de transcripción y los genes en negritas son genes de cutícula. MF = maduración fisiológica, MC = maduración comercial y SM = sobremaduro.

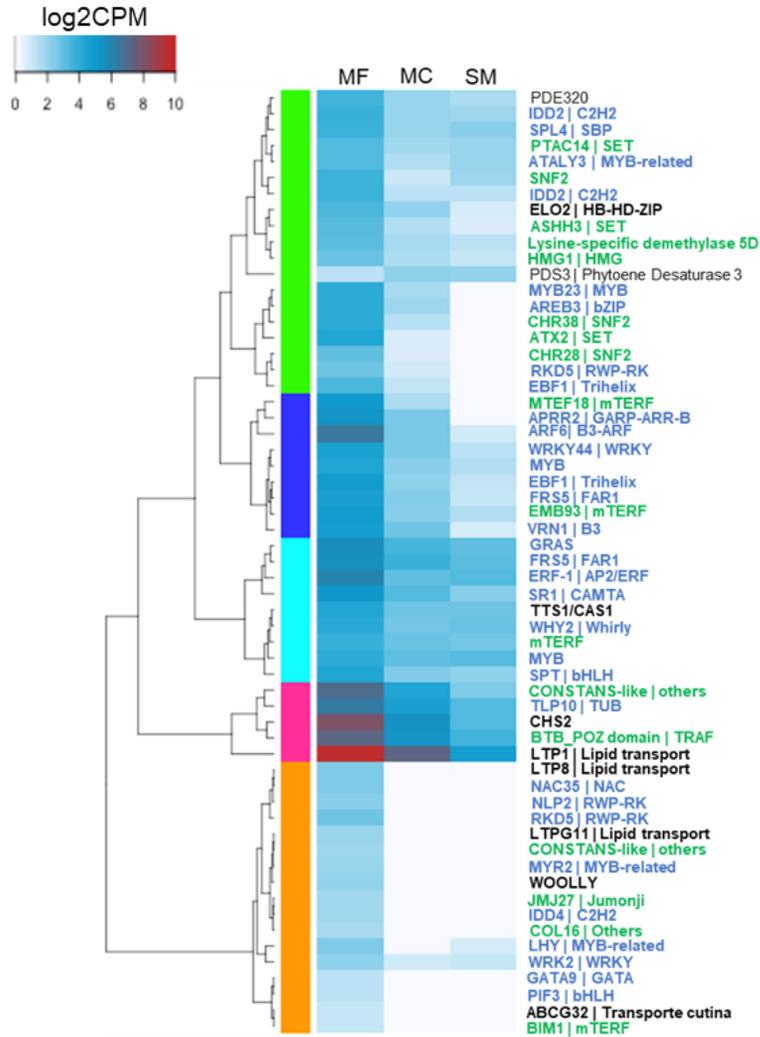


Figura 26. Agrupamiento jerárquico de acuerdo con el patrón de expresión durante la maduración poscosecha del fruto de guanábana de los transcritos presentes en el módulo yellow. Los genes en verde son reguladores transcripcionales, los genes en azul son factores de transcripción y los genes en negritas son genes de cutícula. MF = maduración fisiológica, MC = maduración comercial y SM = sobremaduro.

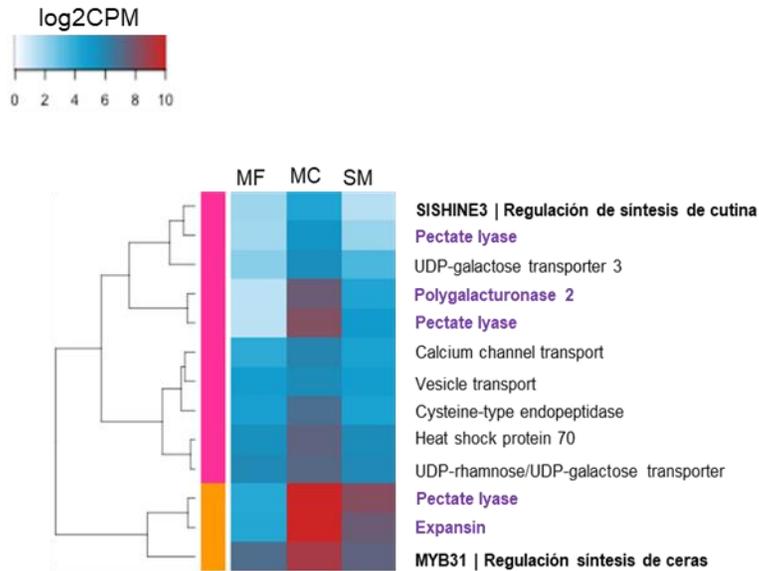


Figura 27. Agrupamiento jerárquico de acuerdo con el patrón de expresión durante la maduración poscosecha del fruto de guanábana de los transcritos presentes en el módulo darkgreen. Los genes en morado son genes de remodelación de pared celular y los genes en negritas son factores de transcripción. MF = maduración fisiológica, MC = maduración comercial y SM = sobremaduro.

Este análisis permitió visualizar con mayor facilidad los genes de cutícula que podrían ser regulados por determinados factores de transcripción y reguladores transcripcionales. Por ejemplo, en el módulo greenyellow (Figura 25), el factor de transcripción MYB94 junto con dos factores de transcripción de las familias bHLH y NF-YC se agruparon junto con el gen LTPG1, el cual está involucrado en el transporte de lípidos, lo cual sugiere que MYB94 y los factores de transcripción de las familias bHLH y NF-YC regulan este proceso en frutos de guanábana.

En el caso del módulo yellow, se observó que 10 factores de transcripción (incluyendo a Woolly) y 4 reguladores transcripcionales se agruparon junto a ABCG32 y LTPG11, los cuales están involucrados en transporte de cutina y lípidos, respectivamente (Figura 26). Los resultados del agrupamiento jerárquico del módulo darkgreen fueron interesantes, ya que los factores de transcripción MYB31 y SHINE3 (involucrados en la regulación de la biosíntesis de ceras y cutina, respectivamente) fueron agrupados junto a genes de remodelación de la pared celular como la pectato liasa, expansina y poligalacturonasa 2 (Figura 27). Estos resultados sugieren una posible relación entre la biosíntesis de componentes cuticulares y la remodelación de pared celular en frutos de guanábana.

Con el objetivo de estudiar con más detalle cómo interaccionan estos reguladores con los genes dentro de su módulo, se exportaron los módulos black, yellow, greenyellow y darkgreen a Cytoscape (Killcoyne *et al.*, 2009), considerando solamente aquellos genes con valores de correlación iguales o superiores a 0.30. En la figura 28 se presenta la red de co-expresión génica de los vecinos directos del factor de transcripción SHINE3 dentro del módulo darkgreen, en donde se puede visualizar cómo este factor de transcripción se co-regula con otros 23 genes, incluyendo la pectato liasa. Para el caso del factor de transcripción MYB31, también se identificaron sus vecinos directos dentro del módulo darkgreen, en donde se observó que este factor de transcripción se co-regula con otros 38 genes, entre los cuales se encuentran una pectato liasa, un transportador ABCF4 y la poligalacturonasa, por lo que es probable que MYB31 esté involucrado en la regulación del transporte de lípidos y la remodelación de la pared celular en frutos de guanábana (figura 29).

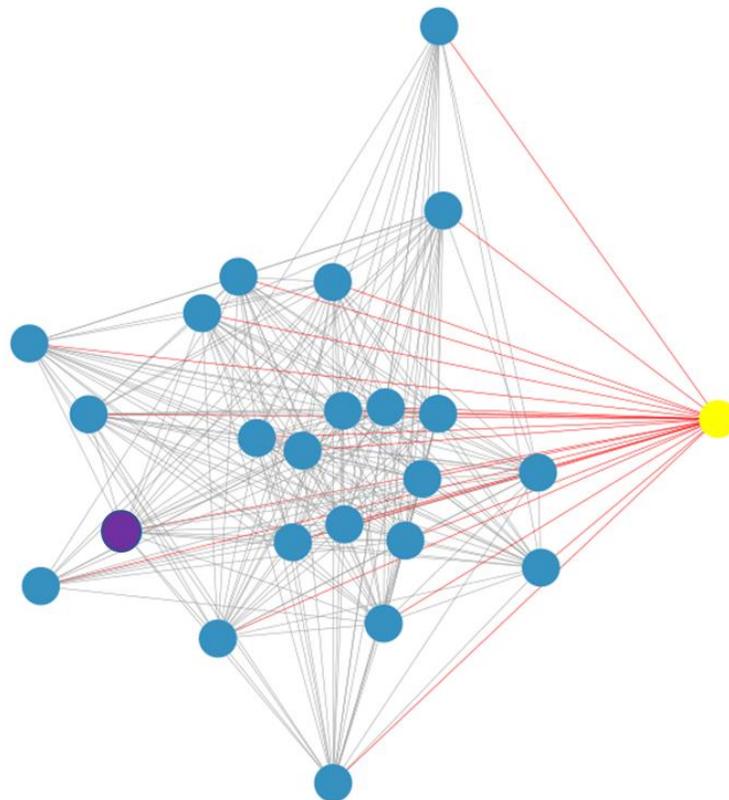


Figura 28. Red de co-expresión génica de los vecinos directos del factor de transcripción SHINE3 (nodo amarillo) dentro del módulo darkgreen. SHINE3 se co-expresa con 23 genes distintos, incluyendo una pectato liasa (nodo morado).

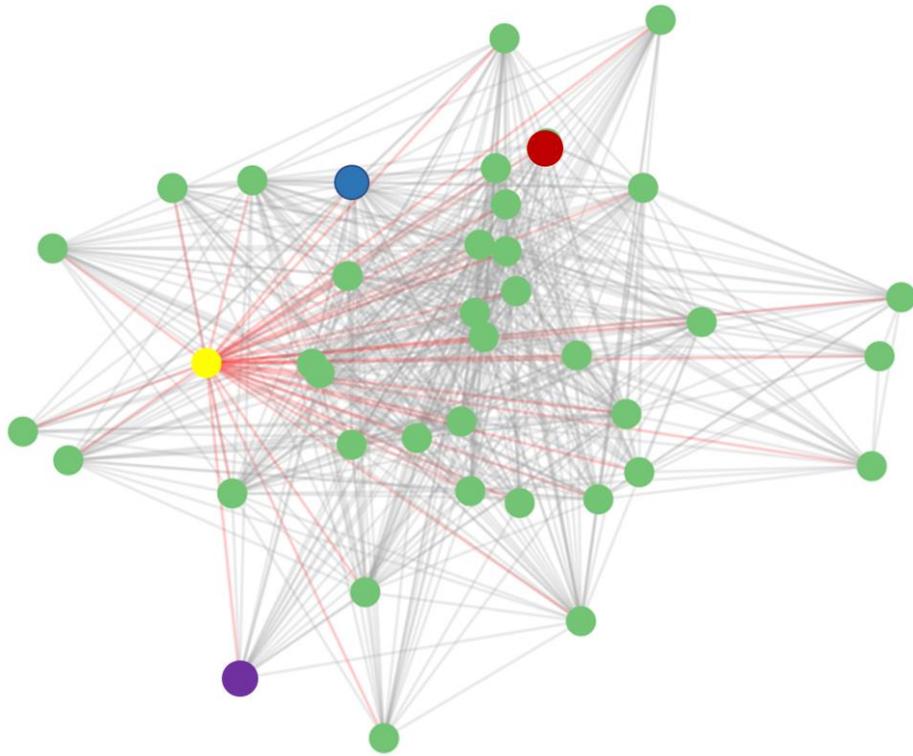


Figura 29. Red de co-expresión génica de los vecinos directos del factor de transcripción MYB31 (nodo amarillo) dentro del módulo darkgreen. El factor de transcripción MYB31 se co-expresa con 38 genes distintos, incluyendo una pectato liasa (nodo azul), un transportador ABC (nodo rojo) y una poligalacturonasa (nodo morado).

7. DISCUSIÓN

Desde la aparición de las primeras plantas terrestres hace 500 millones de años, estas han tenido que desarrollar diferentes mecanismos para protegerse de un ambiente hostil, donde existen factores de estrés tanto abiótico (deseccación, frío, inundación, radiación ultravioleta) como biótico (ataque de insectos, hongos, virus, bacterias). Algunos de estos mecanismos de defensa son la síntesis de metabolitos secundarios y la biosíntesis de la cutícula (Kong *et al.*, 2020). La cutícula tiene una función esencial en las plantas y en años más recientes, se ha sugerido que regula la vida poscosecha de los frutos (Lara *et al.*, 2019).

Se ha reportado que las variaciones de un solo nucleótido entre individuos de una misma especie son mucho más comunes de lo que se pensaba unos años atrás y que la resecuenciación de genomas completos es incapaz de detectar estos cambios (Sohn y Nam, 2018). Por lo tanto, el ensamblaje *de novo* de estos genomas sería una mejor opción para obtener resultados más precisos (Sohn y Nam, 2018). No obstante, tratar de ensamblar un genoma o transcriptoma *de novo* a partir de lecturas cortas es un reto computacional inmenso (sobre todo si se trata de ensamblar un transcriptoma) y los algoritmos computacionales que se utilizan para tratar de reducir este costo computacional, comúnmente ocasionan ciertos problemas que disminuyen la precisión de estos ensamblajes. Algunos de estos problemas son la sobreestimación de isoformas que realmente existen, que la profundidad de secuenciación no sea suficiente para detectar transcritos de baja expresión y una alta redundancia de secuencias (Góngora-Castillo y Buell, 2013; Madritsch *et al.*, 2021).

Este estudio se inició con el análisis de transcritos ensamblados *de novo* y posteriormente, con la publicación del genoma de guanábana, se realizó un ensamblado del transcriptoma guiado con genoma de referencia. Debido a lo mencionado anteriormente, para evitar la redundancia de secuencias y la sobreestimación de isoformas que da como resultado el ensamblaje *de novo*, al final se decidió trabajar con los transcritos ensamblados con genoma de referencia ya que estos también mostraron una buena cobertura en la identificación de factores de transcripción y reguladores transcripcionales.

Los estudios encaminados a la identificación de factores de transcripción en el genoma y transcriptoma de plantas y frutos se enfocan principalmente a organismos modelo como

Arabidopsis y tomate, enfocados a la identificación de solo una familia de factores de transcripción. Mientras que, aunque en los últimos años este tipo de estudios se ha comenzado a llevar a cabo en frutos tropicales, estos siguen siendo escasos. En este trabajo se identificaron los factores de transcripción y reguladores transcripcionales en el transcriptoma de frutos de guanábana y fueron clasificados en diversas familias de acuerdo con los criterios de clasificación de la base de datos iTAK. La comparación con las bases de datos disponibles (iTAK), mostró que el número de estos fue similar tanto para factores de transcripción como para reguladores transcripcionales (Cuadro 16 y 17). Lo cual indica que estos elementos reguladores se han conservado a través de la evolución de las plantas.

Cuadro 16. Número de transcritos que codifican para factores de transcripción comparado con lo reportado para otras plantas en la base de datos iTAK.

Guanábana (<i>Annona muricata</i>)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Vid (<i>Vitis vinifera</i>)
1,887 transcritos	1,779 transcritos	1,922 transcritos	1,333 transcritos

Cuadro 17. Número de transcritos que codifican para reguladores transcripcionales comparado con lo reportado para otras plantas en la base de datos iTAK.

Guanábana (<i>Annona muricata</i>)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Vid (<i>Vitis vinifera</i>)
611 transcritos	428 transcritos	456 transcritos	342 transcritos

De acuerdo con esto, también se observó que tanto las familias mejor representadas, así como el número de factores de transcripción de estas familias que encontramos en nuestro análisis es similar con lo reportado en las bases de datos para Arabidopsis, tomate y uva (Cuadro 18). Asimismo, trabajos similares al nuestro enfocados a identificar y caracterizar los factores de transcripción de

diferentes familias, principalmente en plantas modelo como *Arabidopsis* y tomate, el número de miembros reportados para cada familia es consistente con lo que se encontró para guanábana en este estudio (Cuadro 19).

Cuadro 18. Número de miembros de factores de transcripción de las familias bHLH, MYB, AP2/ERF-ERF, bZIP y C2H2 en guanábana (*Annona muricata*) comparado con lo reportado en la base de datos iTAK para *Arabidopsis thaliana*, tomate (*Solanum lycopersicum*) y uva (*Vitis vinífera*).

Familia	Guanábana	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Tomate	Uva
bHLH	165	137	143	102
MYB	120	142	140	139
AP2/ERF-ERF	108	128	140	81
bZIP	92	72	66	45
C2H2	90	105	113	72

Cuadro 19. Número de factores de transcripción identificados para las familias bHLH, MYB, AP2/ERF, bZIP y C2H2 en guanábana (*Annona muricata*), *Arabidopsis thaliana* y tomate (*Solanum lycopersicum*) en estudios previos.

Familia	Guanábana	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Tomate
bHLH	165	167 (Li <i>et al.</i> , 2006)	159 (Sun <i>et al.</i> , 2015)
MYB	120	197 (Katiyar <i>et al.</i> , 2012)	127 (Li <i>et al.</i> , 2016)
AP2/ERF	108	145 (Rao <i>et al.</i> , 2015)	167 (Song <i>et al.</i> , 2013)
bZIP	92	78 (Dröge-Lase <i>et al.</i> , 2018)	69 (Li <i>et al.</i> , 2015)
C2H2	90	176 (Yin <i>et al.</i> , 2020)	104 (Hu <i>et al.</i> , 2019)

El hecho de que se hayan identificado en este estudio para guanábana un número de factores de transcripción y reguladores transcripcionales similar a lo que se reporta para otras plantas tanto en la base de datos iTAK como en estudios previos, indica que la estrategia utilizada para la identificación fue adecuada. No obstante, es importante mencionar que los criterios de filtrado para la identificación de factores de transcripción varían en diferentes estudios y en general, los criterios

de filtrado son menos estrictos que los que se utilizaron en este trabajo. Además, es importante recordar que en este estudio se trabajó con la primera versión del genoma de guanábana, por lo tanto, es posible que aún falta por identificar más factores de transcripción y reguladores transcripcionales.

En cuanto a estudios de este tipo en frutos tropicales se puede mencionar un estudio efectuado en mango (*Mangifera indica* L.), donde a partir de un transcriptoma ensamblado *de novo* reportaron un total de 5,342 factores de transcripción identificados en el transcriptoma de mango, los cuales se clasificaron en 55 diferentes familias, siendo MYB y bHLH dos de las familias más abundantes (Tafolla-Arellano et al., 2017). Comparando lo de este estudio en mango con lo que se encontró en guanábana, en mango identificaron un mayor número de factores de transcripción, pero clasificados en un menor número de familias diferentes (Tafolla-Arellano et al., 2017). La diferencia en cuanto al número de factores de transcripción identificados podría deberse a que en mango se analizó un transcriptoma ensamblado *de novo* y para guanábana se analizó un ensamblado guiado por genoma de referencia. Además, para guanábana se eligió un criterio de filtrado más estricto ($e \text{ value} \leq a 1e-5$, $\text{Bitscore} \geq a 50$, $\%qcov \geq a 30$) comparado al que se utilizó en mango, donde solo se usó el filtro del $e\text{-value} \leq 1e-5$ (Tafolla-Arellano et al., 2017). Para la clasificación de los factores de transcripción, en ambos trabajos se utilizó el criterio de la base de datos iTAK. Como se mencionó anteriormente, en este estudio se encontró que las familias de factores de transcripción mejor representadas fueron bHLH, MYB, AP2/ERF, bZIP y C2H2. Se ha reportado que factores de transcripción miembros de estas familias están involucrados en la regulación de la expresión de genes de biosíntesis y transporte de componentes cuticulares.

En este trabajo se identificaron los procesos biológicos en los que están involucrados los factores de transcripción y reguladores transcripcionales identificados, se observó que los reguladores transcripcionales estuvieron involucrados en los mismos procesos biológicos que los factores de transcripción. Además, en los 11 procesos biológicos únicos para los reguladores transcripcionales, se encontraron la metilación de macromoléculas y la ruta de señalización mediada por hormonas. En este sentido, en un estudio se comparó el transcriptoma de Guar (*Cyamopsis tetragonoloba*) expuesto a estrés salino y a condiciones normales, observando la expresión diferencial de factores de transcripción y reguladores transcripcionales entre tratamientos, incluyendo reguladores transcripcionales de la familia SNF2 y factores de transcripción de las familias bHLH, MYB y C2H2, por lo que es posible que factores de transcripción y reguladores transcripcionales ayuden

a la tolerancia al estrés salino (Acharya et al., 2022). En plátano (*Musa acuminata*) se encontró que la proteína PHD1 podría estar involucrada en una red de regulación génica controlando la degradación de la pared celular y la maduración del plátano (Wei *et al.*, 2017). En otro estudio, se identificaron 45 reguladores transcripcionales de la familia PHD en tomate y observaron que algunos de estos se expresan diferencialmente en diversos tejidos de este fruto, en diferentes estados de maduración y en diferentes escenarios de estrés (Chen et al., 2016). Estos trabajos demuestran, las diversas funciones que tienen los reguladores transcripcionales. Adicionalmente, en un estudio llevado a cabo por Hayashi (2012), se describió el mecanismo por el cual reguladores transcripcionales de la familia AUX/IAA actúan junto con factores de transcripción para regular la señal de la auxina que consecuentemente regulan múltiples procesos en el desarrollo de las plantas. De acuerdo con estos datos, en nuestro análisis del transcriptoma de frutos de guanábana encontramos un total de 611 transcritos que codifican para reguladores transcripcionales, incluyendo 19 miembros de la familia AUX/IAA. Con lo anterior, es evidente que tanto factores de transcripción y reguladores transcripcionales se encuentran involucrados en procesos similares y cumplen una función en una compleja red de regulación conservada.

Las familias de reguladores transcripcionales más abundantes que se logró identificar en frutos de guanábana en este trabajo fueron SNF2, SET, PHD y mTERF. El conocimiento acerca de los reguladores transcripcionales es bastante escaso comparado a lo que se conoce para los factores de transcripción. Sin embargo, se sabe que los reguladores transcripcionales de estas familias llevan a cabo su rol regulatorio interaccionando con la cromatina. En el caso de las proteínas de la familia SNF2, estas poseen un dominio que, mediante un mecanismo desconocido, utilizan ATP para modificar la estructura de la cromatina (Ryan y Owen-Hughes, 2011). Por otro lado, se ha reportado que las proteínas de la familia SET están involucradas en la metilación de histonas (Dillon *et al.*, 2005). La función de las proteínas clasificadas dentro de la familia PHD aún no es muy conocida; sin embargo, se cree que podrían estar involucradas en la ubiquitinación de proteínas, ya que las proteínas más cercanas a estas son las que contienen un dominio RING, cuya función es precisamente la ubiquitinación de proteínas (Bienz, 2006). También se ha visto que la mayoría de las proteínas que se encuentran dentro de la familia PHD son capaces de interaccionar con la cromatina (Bienz, 2006). Hablando de los reguladores de la familia mTERF, aunque en plantas no se conoce a profundidad su función, se ha reportado que podrían ser necesarias para el crecimiento y desarrollo normal de las plantas (Kleine, 2012). De manera interesante, en arroz (*Oryza sativa*),

mediante una mutante se reportó que un regulador transcripcional de la familia SNF2 está involucrado en el aumento en el contenido de ceras cuticulares, aumentando la tolerancia a la sequía (Guo et al., 2019). En otro estudio, observaron que CHR729, una proteína perteneciente a SNF2 interacciona con KCS6 y que al silenciar CHR729, la expresión de KCS6 disminuye, provocando una reducción en la acumulación de ceras cuticulares en trigo (*Triticum aestivum*) (Wang et al., 2019). Lo cual demuestra la participación de los reguladores transcripcionales en el proceso de la biosíntesis de componentes cuticulares en plantas. En este sentido, con nuestro análisis logramos identificar 72 transcritos que codifican para reguladores transcripcionales de la familia SNF2, los cuales también podrían estar involucrados en la regulación de la biosíntesis de componentes de la cutícula de frutos de guanábana.

Como uno de los objetivos de este trabajo, se construyó una base de datos llamada CuticulaDB, la cual recopila información de genes involucrados en la biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares, principalmente en organismos modelo como *Arabidopsis* y tomate. Aunque esta base de datos sigue siendo pequeña y aún hay oportunidad de que siga creciendo, con ella fue posible identificar homólogos de genes de cutícula en frutos de guanábana, demostrando que es un recurso que puede impulsar la generación de conocimiento enfocado a conocer la biosíntesis de componentes cuticulares en otros frutos tropicales. Entre los ortólogos a genes de cutícula identificados en los frutos de guanábana se encuentra el factor de transcripción SHINE3, el cual regula la biosíntesis de cutina. En el transcriptoma de guanábana se encontró que el transcrito evm.model.scaf_116.35 fue el mejor hit bidireccional, fue cercano filogenéticamente a SHINE3 de tomate y presentó los dominios conservados característicos de la familia AP2/ERF. Por esta razón, éste transcrito fue considerado como ortólogo de guanábana al gen SHINE3 de tomate. Algo interesante fue que otro transcrito llamado evm.model.scaf_187.87, aunque no fue el mejor hit bidireccional, también fue cercano filogenéticamente a SHINE3 de tomate y presentó los dominios conservados característicos de la familia AP2/ERF. Ambos transcritos no provienen del mismo gen, por lo tanto es probable que evm.model.scaf_116.35 y evm.model.scaf_187.87 correspondan a genes parálogos y ambos puedan ser ortólogos del gen SHINE3. En la base de datos iTAK se reporta para *Arabidopsis* dos versiones de SHINE3 (AT5G25390.1 y AT5G25390.2) y para tomate solamente una versión (Solyc12g009490). Otra posible explicación es que evm.model.scaf_187.87 sea ortólogo a otro de los genes que se encuentran dentro del clado SHINE, en donde se han identificado al menos tres genes en *Arabidopsis* y tomate (SHINE1, SHINE2 y

SHINE3) (Aharoni et al. 2004; Shi *et al.*, 2013) y que debido a que SHINE1 no se incluyó en la base de datos CuticulaDB, existe la posibilidad de que el transcrito *evm.model.scaf_187.87* pueda ser ortólogo a otro gen de la familia SHINE.

Se ha reportado que la cutícula juega un rol importante durante la vida poscosecha de los frutos, ya que está relacionada con algunos de los cambios fisiológicos y morfológicos que presentan los frutos durante su maduración como el cambio de coloración y la pérdida de firmeza (Lara *et al.*, 2019). La biosíntesis de la cutícula es un proceso que está sujeto a una compleja red de regulación, que involucra la regulación de la biosíntesis de la cutina, las ceras, los fenilpropanoides e isoprenoides y la biosíntesis de metabolitos secundarios como flavonoides. Además, involucra la regulación del metabolismo de lípidos, ya que esta ruta genera los precursores necesarios para la biosíntesis de componentes cuticulares (Mandel *et al.*, 2007). En este trabajo se identificaron transcritos que codifican para genes relacionados con la biosíntesis, transporte y ensamblaje de los componentes cuticulares. El análisis de expresión de estos mostró que la mayoría presentó un mayor nivel de expresión en el estado de madurez fisiológica y posteriormente éste fue disminuyendo durante la maduración de los frutos de guanábana. De acuerdo con esto, el análisis de expresión diferencial demostró que la mayoría de los transcritos relacionados a cutícula se reprimen cuando los frutos pasan del estado de madurez comercial a sobremaduro. Lo cual sugiere que la biosíntesis de la cutícula en frutos de guanábana disminuye o se detiene cuando los frutos llegan a la madurez comercial. Esto concuerda con lo observado en otros frutos como Manzana Fuji (*Malus domestica*) (Dong *et al.*, 2012), naranja navel (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) (Liu *et al.*, 2012), toronja (*Citrus paradisi*) (Commenil *et al.*, 1997) y cereza (*Prunus avium*) (Peschel *et al.*, 2007), donde se ha reportado una disminución en la acumulación de componentes cuticulares durante la maduración de los frutos. Por el contrario, un comportamiento contrario al observado en guanábana, caracterizado por una continua acumulación de componentes cuticulares durante la maduración de los frutos se ha reportado en tomate (*Solanum lycopersicum*) (Kosma *et al.*, 2010), en manzana red delicious (*Malus domestica*) (Ju y Bramlage, 2001) y mango (*Mangifera indica* L.) (Tafolla-Arellano *et al.*, 2013). Asimismo, se ha reportado un aumento en la acumulación del contenido de componentes cuticulares durante la maduración de la naranja navel (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) (Wang *et al.*, 2016). Aunque esto es contrario a lo que se ha reportado en otros estudios (Liu *et al.*, 2012). Estos datos demuestran que la biosíntesis de componentes cuticulares varía entre diferentes especies y depende de la etapa de maduración en la que se encuentra el fruto.

Lo cual confirma que la biosíntesis de componentes cuticulares está influenciada por factores fisiológicos y ambientales durante todo el ciclo de vida de los frutos. Asimismo, es probable que esté relacionada con los procesos de adaptación de las especies.

La biosíntesis, transporte y ensamblaje de los componentes cuticulares se regula a distintos niveles, incluyendo el nivel transcripcional, en donde están involucrados factores de transcripción y reguladores transcripcionales. En plantas, la mayoría de los factores de transcripción que se han identificado que regulan estos procesos pertenecen a las familias AP2/ERF, MYB y HD-Zip, en donde además se ha visto como la sobreexpresión de estos factores de transcripción altera la composición de la cutícula, otorgando a la planta una mayor protección contra diversos factores de estrés bióticos y abióticos (Borisjuk *et al.*, 2014). Una parte esencial para la biosíntesis de la cutícula es la regulación de la biosíntesis de precursores. Por ejemplo, se ha demostrado que los factores de transcripción WRI1 y WRI3 participan en la regulación de la biosíntesis de lípidos precursores que posteriormente formarán cutina y ceras cuticulares (To *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2016; He *et al.*, 2019). En el análisis transcriptómico de frutos de guanábana se encontró que WRI1 y WRI3 aumentaron su expresión durante el paso de madurez fisiológica a comercial y no presentan cambios en su expresión al pasar a sobremaduro. Esto sugiere que la biosíntesis de precursores de la cutícula sucede principalmente durante los estados de madurez fisiológica y comercial de los frutos de guanábana.

De acuerdo con lo anterior, el factor de transcripción SHINE3 de la familia AP2/ERF-ERF el cual es considerado como regulador central de la biosíntesis de ceras y cutina, mostró la mayor expresión en el exocarpo durante la etapa verde maduro del fruto de tomate y posteriormente éste disminuye su expresión. Además, el silenciamiento de SHINE3 redujo la expresión de varios genes de la cutícula, incluyendo GPAT6 (Shi *et al.*, 2013). Lo cual sugiere que SHINE3 podría participar en la regulación de la expresión de GPAT6. En este sentido, el análisis de nuestros datos mostró que los transcritos que codifican para SHINE3 y GPAT6 (el cual está involucrado en el ensamblaje de cutícula) aumentan su expresión junto con GPAT6 durante la transición de madurez fisiológica a comercial, pero disminuye al pasar a sobremaduro. Mientras que GPAT6 no cambia su expresión durante la transición de maduración comercial a sobremaduro. Estos datos sugieren que en los frutos de guanábana SHINE3 podría estar regulando la expresión del gen GPAT6. Por lo tanto, es posible que, en guanábana, SHINE3 y GPAT6 controlen la acumulación de ceras y cutina durante la transición de maduración fisiológica a maduración comercial, la cual se detiene cuando el fruto

entra a un estado sobremaduro. Adicionalmente, nuestro análisis transcriptómico también mostró la disminución de la expresión de los factores de transcripción CD2, WXP2, MYB16 y ANT1 durante la transición de madurez comercial a sobremaduro. Se ha reportado que estos genes están involucrados en la biosíntesis de cutina, de ceras y en la acumulación de antocianinas (Zhang *et al.*, 2007; Isaacson *et al.*, 2009; Nadakuduti *et al.*, 2012; Oshima y Mitsuda, 2013).

En frutos de tomate, se demostró que los factores de transcripción Woolly y MYB31 interactúan para regular la expresión de KCS6, el cual está involucrado en la elongación de los ácidos grasos para formar ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFAs) (Xiong *et al.*, 2020). La sobreexpresión de Woolly resultó en un aumento en la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de VLCFAs y genes involucrados en el transporte de estos a la cutícula (Xiong *et al.*, 2020). Mientras que, en el caso de MYB31, además de demostrar que éste interacciona con Woolly, el silenciamiento y sobreexpresión de MYB31 mostró que este factor de transcripción se correlaciona positivamente con el contenido de ceras cuticulares en los frutos de tomate (Xiong *et al.*, 2020). Interesantemente, nuestro análisis demostró como la expresión de KCS6 disminuyó junto con la expresión de Woolly durante el paso de madurez fisiológica a comercial, aunque MYB31 aumentó su expresión durante este cambio de estado de madurez, otro factor de transcripción MYB30, de la familia MYB, involucrado en la regulación de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFAs) también disminuyó su expresión durante el paso de madurez fisiológica a comercial. Lo cual podría sugerir que, en guanábana, la biosíntesis de ácidos grasos de cadena muy larga podría regularse a través de dos rutas, una a través de la interacción entre Woolly y MYB30, y a través de MYB31. Sin embargo, hacen falta realizar otros experimentos para confirmar esto.

Por otro lado, la presencia de metabolitos secundarios como las antocianinas en la cutícula de los frutos son las responsables de que los frutos presentes diversas coloraciones como púrpuras, rosas o rojizos (Ma *et al.*, 2021). Estos metabolitos secundarios juegan un rol importante en la resistencia a diversos factores de estrés biótico y abiótico y para el ser humano tiene un valor económico debido a sus beneficios para la salud humana como antioxidantes (Ma *et al.*, 2021). En este sentido, se ha demostrado como el factor de transcripción HY5, que pertenece a la familia bZIP, promueve la acumulación de antocianinas en tomate (Liu *et al.*, 2018). En frutos de guanábana se encontró que la expresión de HY5 aumentó durante el paso de madurez fisiológica a comercial y posteriormente no se observó un cambio significativo. Igualmente, el factor de transcripción MYB5, el cual está involucrado en la regulación de diversos metabolitos secundarios como los

fenilpropanoides y los terpenos (Mahjoub *et al.*, 2009), presentó el mismo patrón de expresión que HY5 en frutos de guanábana. Esto podría indicar que durante el cambio de maduración fisiológica a comercial hay una acumulación de metabolitos secundarios en los frutos de guanábana, la cual se detiene una vez que el fruto alcanza la maduración comercial.

En total acuerdo con lo que se ha discutido, el análisis de los transcritos relacionados con la biosíntesis de componentes cuticulares mostró que la mayoría de éstos transcritos presentan una disminución en los niveles de expresión durante el proceso de maduración de los frutos de guanábana. Dentro de los transcritos analizados se encuentran KCS2, CHS2, ELO2, KAS1, FDH, KCS4, KCS6 y LACS1. Donde KCS2, KCS4 y KCS6 codifican para las enzimas 3-CETOACIL-COA-SINTASA 2, 3-CETOACIL-COA-SINTASA 4 y 3-CETOACIL-COA-SINTASA 6, respectivamente. Estas enzimas están involucradas en la elongación de los ácidos grasos para formar ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFAs). En *A. thaliana*, el silenciamiento de KCS2, presentó una disminución en el contenido total de ceras cuticulares de hojas y tallos (Lee *et al.*, 2009). El silenciamiento de KCS6, en *S. lycopersicum* provocó una disminución en el contenido de alcanos y aldehídos de más de 30 carbonos (Vogg *et al.*, 2004). En el caso de estos transcritos, el análisis de expresión mostró que KCS2, KCS4 y KCS6 se reprimen en los estados de madurez comercial y sobremaduro en comparación la madurez fisiológica de los frutos de guanábana, lo cual sugiere una disminución de la biosíntesis de VLCFAs durante la maduración de los frutos. De acuerdo con esto, los transcritos que codifican para las enzimas FDH (FIDDLEHEAD) y LACS1 (LONG-CHAIN FATTY ACYL COA SYNTHETASE), las cuales están involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos de cadena muy larga mediante la elongación de los ácidos grasos (Weng *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2015; Richardson *et al.*, 2007), también se reprimen durante la maduración de los frutos de guanábana. Adicionalmente, los transcritos homólogos a los genes CER10 y PP2C3 en frutos de guanábana se inducen en el paso del estado de madurez fisiológica a madurez comercial, mientras que al pasar al estado sobremaduro ya no cambian su expresión. CER10 es un gen que codifica para la enzima ENOIL-COA REDUCTASA que participa en el último paso de la elongación de los VLCFAs (Zheng *et al.*, 2005). Estos datos junto con los anteriores refuerzan la hipótesis de que en frutos de guanábana la biosíntesis de ácidos grasos de cadena muy larga se mantiene en los estados de madurez fisiológica y comercial, y posteriormente disminuye al llegar al estado sobremaduro. De acuerdo con esto, el transcrito homólogo a CHS2, que codifica para la enzima CHALCONA SINTASA 2, también se reprime durante la maduración

del fruto de guanábana. Esta enzima además de participar en la biosíntesis de flavonoides se encuentra involucrada en la síntesis de diversos componentes cuticulares incluyendo la cutina y los flavonoides (España *et al.*, 2014). Por lo que, además de disminuir la biosíntesis de VCLFAs, es posible que también el contenido de cutina en frutos de guanábana disminuye conforme avanza la maduración poscosecha. Por otro lado, la función de PP2C3 aún no está muy clara, sin embargo, se ha reportado que la represión de PP2C3 en tomate acelera la maduración del fruto, altera la estructura de la cutícula y modifica la expresión de otros genes de cutícula (Liang *et al.*, 2021), lo que sugiere que PP2C3 podría estar involucrado en la regulación de la maduración y la biosíntesis de cutícula en guanábana.

Por otra parte, después de la biosíntesis de componentes cuticulares se lleva a cabo el transporte de éstos hacia el exterior de la célula, esto se lleva a cabo principalmente por proteínas transportadoras de lípidos y transportadores tipo ABC (Lee *et al.*, 2009). En nuestro trabajo identificamos transcritos homólogos a los genes ABCG32, LTPG1, FAP2 y FAP3. El gen LTPG1 está involucrado en el transporte de lípidos, por lo que su silenciamiento resulta en alteraciones en la composición de la cutícula de *Arabidopsis* (Lee *et al.*, 2009; Fahlberg *et al.*, 2019). El gen ABCG32, codifica para un transportador tipo ABCG que está involucrado en el transporte de cutina, el silenciamiento de este gen provocó alteraciones en la cutícula de frutos de tomate (Elejalde-Palmett *et al.*, 2021). De la misma forma, en *Arabidopsis*, se ha reportado que los genes FABP1, FABP2 y FABP3 (Fatty Acid Binding Protein) están involucrados en el metabolismo de lípidos y trabajan en conjunto con los transportadores ABC para el transporte de los mismos (Panikashvili y Aharoni, 2008). En este contexto, el análisis transcriptómico de los frutos de guanábana mostró que transcritos homólogos a estos genes que codifican para transportadores de componentes cuticulares se reprimen durante el paso de madurez fisiológica a madurez comercial, a excepción del gen FABP2, el cual se induce durante la transición de madurez fisiológica a comercial. De la misma forma, al evaluar los patrones de expresión de los transcritos homólogos a los genes involucrados en el ensamblaje de componentes cuticulares, se observó que CUS2 y DCR disminuyen su expresión durante la maduración del fruto de guanábana. La importancia de estos genes en la cutícula se ha demostrado en varios trabajos, por ejemplo, en frutos de tomate, CUS1 y CUS2 (CUTINA SINTASA) se expresan exclusivamente en el exocarpo y están involucrados en la polimerización de los monómeros de cutina (Yeats *et al.*, 2012; Philippe *et al.*, 2020). De la misma manera, DCR está involucrado en la polimerización de la cutina y al igual que CUS2. En

frutos de tomate, se ha reportado que DCR se encuentra altamente expresado en el exocarpo y su expresión disminuye conforme avanza la maduración poscosecha del fruto (Lashbrooke *et al.*, 2015). Acorde con esto, los resultados del análisis transcriptómico mostraron que transcritos homólogos a los genes CUS2 y DCR disminuyen su expresión durante la maduración de los frutos de guanábana. Es evidente que estos datos se correlacionan con lo observado en los genes relacionados con la regulación, biosíntesis y transporte de la cutícula, por lo que, se fortalece la hipótesis de que la deposición de la cutícula disminuye gradualmente conforme el fruto de guanábana avanza en la maduración durante el almacenamiento en poscosecha.

Todos estos resultados sugieren que durante la maduración poscosecha de los frutos de guanábana, podría haber una disminución en la biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares, lo que a su vez provocaría una disminución en el contenido de estos en la cutícula de los frutos. Primeramente, se presenta una disminución en la biosíntesis de los precursores de ceras y cutina durante la maduración fisiológica y después una disminución en la producción de cutina, ceras y metabolitos secundarios durante la maduración comercial, acompañado de una disminución en la actividad de genes de ensamblaje de cutícula, lo cual, debido a la función de la cutícula en los frutos, la disminución de ésta podría contribuir a la pérdida de firmeza del fruto. Sin embargo, es necesario llevar a cabo estudios orientados a la cuantificación de estos componentes cuticulares durante la maduración poscosecha del fruto para confirmarlo.

Por otro lado, el agrupamiento jerárquico de los transcritos con base a sus niveles de expresión sugiere la participación de transcritos que codifican para probables nuevos factores de transcripción y reguladores transcripcionales asociados a la regulación de la biosíntesis de la cutícula. Esto podría significar que además de los factores de transcripción y reguladores transcripcionales ya identificados podríamos identificar nuevos reguladores de la biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares. Con este objetivo, se reconstruyó la red de co-expresión génica del transcriptoma de guanábana en los estados de madurez fisiológica, comercial y sobremaduro. Este análisis permitió la reconstrucción de 110 módulos, donde el análisis funcional mostró que en solo 14 módulos se encontraron procesos biológicos enriquecidos, los cuales están relacionados a procesos esenciales como metabolismo, transporte, fotosíntesis, replicación de DNA, pared celular y transporte mediado por vesículas, entre otros. Interesantemente, se identificaron cuatro módulos (black, yellow, greenyellow, darkgreen) en donde se encontraron factores de transcripción y reguladores transcripcionales co-expresados con genes de biosíntesis, transporte y ensamblaje de

componentes cuticulares. Lo cual sugiere que estos elementos reguladores pudieran formar parte de la red de regulación de la biosíntesis de la cutícula durante la maduración de los frutos de guanábana.

Dentro del módulo greenyellow, el cual agrupó a 22 factores de transcripción (FT) y 9 reguladores transcripcionales (RT), incluyendo a los FT (HDG11, LHCB5, NF-YC13 y FMA) y al RT (PTAC15). Junto con estos, en este grupo se encontraron co-expresados transcritos que codifican para homólogos a genes involucrados en la elongación de ácidos grasos (KCS2, KCS6), transporte de lípidos (LTPG1), además del FT MYB94. Estos datos sugieren que MYB94 podría participar en la regulación de la biosíntesis de VLCFAs y el transporte de lípidos en los frutos de guanábana durante la maduración. Esto coincide con reportes previos donde se menciona que MYB94 junto con MYB30 regulan genes involucrados en la elongación de ácidos grasos como KCS1, KCS2, KCS10, KCS20 y genes involucrados en el transporte de lípidos como LTPG2 en *A. thaliana* y *Thellungiella salsugineum* (Lee y Suh, 2015; Xu *et al.*, 2019). De igual manera, el módulo yellow, agrupó 80 transcritos que codifican para factores de transcripción y 37 reguladores transcripcionales, incluyendo los FT (NAC35, NLP2, RXD5, MYR2, IDD4 y PIF3) y los reguladores transcripcionales (SNF2, JMJ27, COL16 y BIM1) co-expresados con transcritos que codifican para transportadores de componentes cuticulares (LTP1, LTP8, LTPG11, ABCG32), con los factores de transcripción WOOLLY y ELO2 (reguladores de la biosíntesis de ceras). WOOLLY controla junto con MYB31 la biosíntesis de ceras cuticulares mediante la regulación de la expresión de KCS6 (también llamado CER6), el cual está involucrado en la biosíntesis de ácidos grasos de cadena muy larga (Xiong *et al.*, 2020). Por otro lado, ELO2 también está involucrado en la biosíntesis de ácidos grasos de cadena muy larga mediante la interacción con otros genes como CER10, KCR1 y PAS2 (Nagano *et al.*, 2019). Asimismo, se han reportado reguladores transcripcionales de la familia SNF2 (remodelador de cromatina) interaccionando con genes relacionados con la biosíntesis de ceras cuticulares (Guo *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019). Además, se ha reportado que NAC35 se induce por estrés abiótico y biótico en tomate (Wang *et al.*, 2016) y en álamo (*Populus tremula* x *Populus alba*) NAC35 está relacionado al metabolismo de lípidos involucrado en la biosíntesis de suberina (Rains *et al.*, 2018). Estos datos sugieren que, en frutos de guanábana, el factor de transcripción WOOLLY podría regular junto con otros factores de transcripción y reguladores transcripcionales la biosíntesis de flavonoides y ceras. Asimismo, es evidente que estos dos módulos con transcritos co-expresados son una fuente de nuevos factores

de transcripción y reguladores transcripcionales relacionados con la biosíntesis y transporte de componentes cuticulares en frutos de guanábana.

Finalmente, el módulo darkgreen agrupó a 272 transcritos (17 FT y 3 RT), incluyendo dos transcritos homólogos a los factores de transcripción involucrados en la regulación central de la biosíntesis de cutina (SHINE3) y ceras (MYB31). Interesantemente, este módulo fue enriquecido para genes involucrados en el metabolismo de pectina. Al analizar los genes que se encontraron co-expresados con SHINE3 y MYB31, encontramos transcritos que codifican para enzimas que catalizan cambios en los polímeros de la pared celular como la expansina, la pectato liasa, poligalacturonasa 2 y el transportador de UDP-rhamnosa. Lo cual sugiere una probable interacción entre la regulación de la cutícula y la remodelación de la pared celular en frutos de guanábana. Esto es consistente con lo reportado en otras plantas, donde el silenciamiento de genes de ensamblaje de cutícula provocó cambios en la expresión de genes relacionados con la pared celular (Philippe *et al.*, 2020). Esto podría indicar una posible relación entre los genes de ensamblaje de cutícula y los cambios en el crecimiento y la firmeza de los frutos.

De acuerdo con esto, en *S. lycopersicum* se ha reportado que el factor de transcripción SHINE3, además de cumplir un rol importante en la regulación de la biosíntesis de cutícula, también se ha reportado que interacciona con genes de remodelación de la pared celular (Shi *et al.*, 2013). En estudios previos se ha encontrado que en *Arabidopsis*, el factor de transcripción SHINE3 regula la expresión de genes del metabolismo de la pectina, incluyendo pectato liasa, poligalacturonasa e inhibidores de la pectin metilesterasa (Shi *et al.*, 2011). Recientemente, en frutos de tomate se identificó que la mutación del factor de transcripción SHINE2 (otro miembro de la familia de FT SHINE) provocó un aumento en la expresión de genes relacionados con el metabolismo de la pectina, como pectato liasa, pectin esterasa e inhibidores de la pectin metilesterasa (Bres *et al.*, 2022). La pectato liasa es una enzima involucrada en la remodelación de la pared celular durante la maduración de los frutos (Ulusik y Seymour, 2020). El silenciamiento de esta enzima en frutos de tomate resulta en una mayor firmeza de los frutos, una vida poscosecha más prolongada y una menor susceptibilidad a la infección de hongos (Yang *et al.*, 2017). Sorpresivamente, en nuestro análisis de expresión de los transcritos agrupados en este módulo encontramos una correlación positiva entre SHINE3 y los transcritos que codifican para pectato liasa, poligalacturonasa 2 y expansina. Lo que significa que, cuando la expresión de SHINE3 aumenta, también aumenta la expresión de estos transcritos. Esto contrasta con lo reportado para frutos de tomate, donde SHINE2

parece estar reprimiendo a los genes de remodelación de pared celular. Por lo tanto, es posible que, en los frutos de guanábana, además de regular la biosíntesis de cutícula, el factor de transcripción SHINE3 podría controlar la remodelación de la pared celular incidiendo en el crecimiento del fruto, la pérdida de firmeza y la susceptibilidad al ataque por patógenos, procesos que pueden afectar la vida poscosecha del fruto.

Adicionalmente, dentro de este mismo módulo también se encontró co-expresado al factor de transcripción MYB31, el cual está involucrado en la biosíntesis de ceras a través de la elongación de los ácidos grasos para formar ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFAs) (Xiong *et al.*, 2020). De acuerdo con lo discutido anteriormente, MYB31 también se encuentra co-expresado con los genes de remodelación de pared celular. Sin embargo, contrario a lo reportado para SHINE3, no existen reportes donde MYB31 se encuentre asociado a genes de la remodelación de la pared celular en frutos. No obstante, se ha reportado que MYB31 reprime genes de biosíntesis de lignina en *Zea mays* (Fornale *et al.*, 2010). Adicionalmente, según la base de datos TAIR, el factor de transcripción MYB31 (AT1G74650) está involucrado en la biosíntesis de pared celular en *Arabidopsis*. De acuerdo con nuestro análisis, aunque no se observó que SHINE3 y MYB31 interaccionen directamente, según la reconstrucción de la red de co-expresión génica, ambos factores de transcripción interaccionan con genes de remodelación de pared celular y fueron agrupados en un mismo módulo, por lo tanto, es posible que SHINE3 y MYB31 participen junto con otros reguladores en una red de regulación de la remodelación de la pared celular durante la maduración del fruto de guanábana (Figura 30).

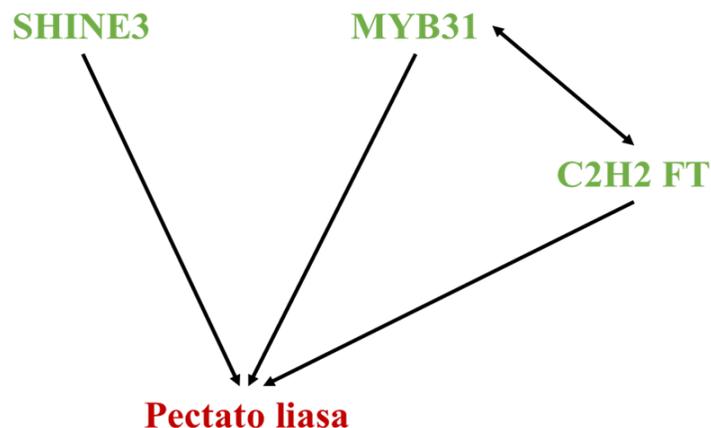


Figura 30. Modelo propuesto de la regulación de la remodelación de pared celular durante la maduración poscosecha de frutos de guanábana.

En resumen, este trabajo aporta información valiosa que permite comenzar a entender los mecanismos involucrados en la regulación de la biosíntesis de cutícula y los cambios en la pared celular que sufren los frutos de guanábana durante su maduración en poscosecha. Esta información será relevante para en un futuro diseñar estrategias que permitan mejorar la calidad de los frutos y obtener frutos más resistentes, así como, prolongar la vida de anaquel de estos frutos.

8. CONCLUSIONES

El análisis del transcriptoma de frutos de guanábana en tres estados de maduración permitió identificar 1,887 transcritos que codifican para factores de transcripción y 611 transcritos que codifican para reguladores transcripcionales. En estos grupos se identificaron nuevos reguladores de la biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares. La reconstrucción de la red de co-expresión génica permitió identificar a SHINE3 y MYB31 como posibles reguladores de la remodelación de la pared celular durante la maduración de los frutos de guanábana en poscosecha, sugiriendo una posible conexión en la cutícula y la maduración de los frutos. La información generada en este trabajo ayuda a comprender los mecanismos que regulan la biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares en frutos de guanábana y sirve como guía para seguir profundizando en la comprensión de estos mecanismos, lo que ayudará en un futuro a diseñar estrategias que permitan mejorar la calidad de los frutos y su resistencia a diferentes tipos de estrés, así como, prolongar su vida de anaquel.

9. RECOMENDACIONES

Debido a la cantidad de factores de transcripción y reguladores transcripcionales que se identificaron, el objetivo de este trabajo no fue caracterizar a profundidad a estos reguladores. Sin embargo, se recomienda caracterizar a mayor profundidad a los miembros de las familias más representadas de factores de transcripción (bHLH, MYB, AP2/ERF-ERF y C2H2). Además, se recomienda llevar a cabo un análisis bioinformático de la región promotora de los genes que participan en la biosíntesis, transporte y ensamblaje de componentes cuticulares para confirmar una posible interacción con los factores de transcripción. Adicional a esto, tomando en cuenta que la red de co-expresión génica utilizada en este trabajo fue generada con datos de expresión obtenidos a partir de muestras de exocarpo, para obtener una red de co-expresión más robusta, se recomienda llevar a cabo este análisis con datos de expresión de otros tejidos del fruto o la planta de guanábana. Por último, para comprobar experimentalmente la interacción que se observó en la red de co-expresión génica entre el factor de transcripción SHINE3 y la enzima pectato liasa, se recomienda llevar a cabo un análisis mediante RT-qPCR.

10. REFERENCIAS

- Acharya, B. R., Sandhu, D., Dueñas, C., Ferreira, J. F. S., y Grover, K. K. 2022. Deciphering Molecular Mechanisms Involved in Salinity Tolerance in Guar (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.) Using Transcriptome Analyses. *Plants*, 11(3):291.
- Adato, A., Mandel, T., Mintz-Oron, S., Venger, I., Levy, D., Yativ, M., Domínguez, E., Wang, Z., De Vos, R. C. H., y Jetter, R. 2009. Fruit-surface flavonoid accumulation in tomato is controlled by a SIMYB12-regulated transcriptional network. *PLoS Genetics*, 5(12):e1000777.
- Aharoni, A., Dixit, S., Jetter, R., Thoenes, E., Van Arkel, G., y Pereira, A. 2004. The SHINE clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16(9):2463-2480.
- Amrine, K. C. H., Blanco-Ulate, B., y Cantu, D. 2015. Discovery of core biotic stress responsive genes in *Arabidopsis* by weighted gene co-expression network analysis. *PloS one*, 10(3):e0118731.
- Anaya-Dyck, J. M., Hernández-Oñate, M. Á., Tafolla-Arellano, J. C., Báez-Sañudo, R., Gutiérrez-Martínez, P., y Tiznado-Hernández, M. E. 2021. La cadena productiva de guanábana: una opción para el desarrollo económico en Compostela, Nayarit. *Estudios sociales. Revista de alimentación contemporánea y desarrollo regional*, 31(57):e211048.
- Badrie, N., y Schauss, A. G. 2010. Soursop (*Annona muricata* L.): composition, nutritional value, medicinal uses, and toxicology. En: R.R. Watson y V.R. Preedy (eds.). *Bioactive foods in promoting health*. Academic Press, Londres, 621-643 pp.
- Báez-Sañudo, R., Tadeo, F. R., Primo-Millo, E., y Zacarias, L. 1992. Physiological and ultrastructural changes during the ripening and senescence of Clementine mandarin. *Physiological Basis of Postharvest Technologies* 343:18-24.
- Bai, Y., Sunarti, S., Kissoudis, C., Visser, R. G. F., y van der Linden, C. G. 2018. The role of tomato WRKY genes in plant responses to combined abiotic and biotic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 9:801.
- Ballester, A.-R., Molthoff, J., de Vos, R., Hekkert, B. t. L., Orzaez, D., Fernández-Moreno, J.-P., Tripodi, P., Grandillo, S., Martin, C., y Heldens, J. 2010. Biochemical and molecular analysis of pink tomatoes: deregulated expression of the gene encoding transcription factor SIMYB12 leads to pink tomato fruit color. *Plant Physiology*, 152(1):71-84.
- Barandoozi, F. N., y Talaie, A. 2009. The effect of gibberellins on russetting in golden delicious apples. *Journal of Horticulture and Forestry*, 1(4):061-064.
- Bemer, M., Karlova, R., Ballester, A. R., Tikunov, Y. M., Bovy, A. G., Wolters-Arts, M., Rossetto, P. d. B., Angenent, G. C., y de Maagd, R. A. 2012. The tomato FRUITFULL homologs TDR4/FUL1 and MBP7/FUL2 regulate ethylene-independent aspects of fruit ripening. *The Plant Cell*, 24(11):4437-4451.

- Berumen-Varela, G., Hernández-Oñate, M. A., y Tiznado-Hernández, M. E. 2019. Utilization of biotechnological tools in soursop (*Annona muricata* L.). *Scientia Horticulturae*, 245:269-273.
- Bi, H., Kovalchuk, N., Langridge, P., Tricker, P. J., Lopato, S., y Borisjuk, N. 2017. The impact of drought on wheat leaf cuticle properties. *BMC Plant Biology*, 17:1-13.
- Bienz, M. 2006. The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. *Trends in biochemical sciences*, 31(1):35-40.
- Bonaventure, G., Salas, J. J., Pollard, M. R., y Ohlrogge, J. B. 2003. Disruption of the FATB gene in *Arabidopsis* demonstrates an essential role of saturated fatty acids in plant growth. *The Plant Cell*, 15(4):1020-1033.
- Borisjuk, N., Hrmova, M., y Lopato, S. 2014. Transcriptional regulation of cuticle biosynthesis. *Biotechnology Advances*, 32(2):526-540.
- Bres, C., Petit, J., Reynoud, N., Brocard, L., Marion, D., Lahaye, M., Bakan, B., y Rothan, C. 2022. The SISHN2 transcription factor contributes to cuticle formation and epidermal patterning in tomato fruit. *Molecular Horticulture*, 2(1):1-20.
- Broun, P. 2004. Transcription factors as tools for metabolic engineering in plants. *Current opinion in plant biology*, 7(2):202-209.
- Busta, L., y Jetter, R. 2017. Structure and biosynthesis of branched wax compounds on wild type and wax biosynthesis mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 58(6):1059-1074.
- Buxdorf, K., Rubinsky, G., Barda, O., Burdman, S., Aharoni, A., y Levy, M. 2014. The transcription factor SISHINE3 modulates defense responses in tomato plants. *Plant Molecular Biology*, 84:37-47.
- Cajuste, J. F., González-Candelas, L., Veyrat, A., García-Breijo, F. J., Reig-Armiñana, J., y Lafuente, M. T. 2010. Epicuticular wax content and morphology as related to ethylene and storage performance of 'Navelate' orange fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 55(1):29-35.
- Castillo-Ánimas, D., Varela-Hernández, G., Pérez-Salvador, B. R., y Pelayo-Zaldívar, C. 2005. Daños por frío en guanábana. Índice de corte y tratamientos postcosecha. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 11(1):51-57.
- Chen, M., Zhu, X., Zhang, Y., Du, Z., Chen, X., Kong, X., Sun, W., y Chen, C. 2020. Drought stress modify cuticle of tender tea leaf and mature leaf for transpiration barrier enhancement through common and distinct modes. *Scientific Reports*, 10(1):6696.
- Chen, X., Goodwin, S. M., Boroff, V. L., Liu, X., y Jenks, M. A. 2003. Cloning and characterization of the WAX2 gene of *Arabidopsis* involved in cuticle membrane and wax production. *The Plant Cell*, 15(5):1170-1185.
- Chen, X., Goodwin, S. M., Liu, X., Chen, X., Bressan, R. A., y Jenks, M. A. 2005. Mutation of the RESURRECTION1 locus of *Arabidopsis* reveals an association of cuticular wax with embryo development. *Plant Physiology*, 139(2):909-919.
- Chen, X., Hayat, S., y Cheng, Z. 2016. Genome-wide identification and analysis of genes encoding PHD-finger protein in Tomato. *Pak. J. Bot*, 48(1):155-165.

- Cheong, K. W., Tan, C. P., Mirhosseini, H., Hamid, N. S. A., Osman, A., y Basri, M. 2010. Equilibrium headspace analysis of volatile flavor compounds extracted from soursop (*Annona muricata*) using solid-phase microextraction. *Food Research International*, 43(5):1267-1276.
- Cominelli, E., Sala, T., Calvi, D., Gusmaroli, G., y Tonelli, C. 2008. Over-expression of the *Arabidopsis AtMYB41* gene alters cell expansion and leaf surface permeability. *The Plant Journal*, 53(1):53-64.
- Commenil, P., Brunet, L., y Audran, J.-C. 1997. The development of the grape berry cuticle in relation to susceptibility to bunch rot disease. *Journal of Experimental Botany*, 48(8):1599-1607.
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Talón, M., y Robles, M. 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21(18):3674-3676.
- Costaglioli, P., Joubès, J., Garcia, C., Stef, M., Arweiler, B., Lessire, R., y Garbay, B. 2005. Profiling candidate genes involved in wax biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* by microarray analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1734(3):247-258.
- De los Santos-Santos, A., Jiménez-Zurita, J. O., Balois-Morales, R., y Alia-Tejacal, I. 2020. EVALUACIÓN DE ALMIDÓN COMO RECUBRIMIENTO COMESTIBLE SOBRE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN FRUTOS DE GUANÁBANA (*Annona muricata* L.). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 43(4):443-443.
- DeBono, A., Yeats, T. H., Rose, J. K. C., Bird, D., Jetter, R., Kunst, L., y Samuels, L. 2009. *Arabidopsis* LTPG is a glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein required for export of lipids to the plant surface. *The Plant Cell*, 21(4):1230-1238.
- Dillon, S. C., Zhang, X., Trievel, R. C., y Cheng, X. 2005. The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome biology*, 6:1-10.
- Ding, F., Wang, G., Wang, M., y Zhang, S. 2018. Exogenous melatonin improves tolerance to water deficit by promoting cuticle formation in tomato plants. *Molecules*, 23(7):1605.
- Dong, X., Rao, J., Huber, D. J., Chang, X., y Xin, F. 2012. Wax composition of 'Red Fuji' apple fruit during development and during storage after 1-methylcyclopropene treatment. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 53:288-297.
- Elejalde-Palmett, C., San Segundo, I. M., Garroum, I., Charrier, L., De Bellis, D., Mucciolo, A., Guerault, A., Liu, J., Zeisler-Diehl, V., y Aharoni, A. 2021. ABCG transporters export cutin precursors for the formation of the plant cuticle. *Current biology*, 31(10):2111-2123.
- Eriksson, E. M., Bovy, A., Manning, K., Harrison, L., Andrews, J., De Silva, J., Tucker, G. A., y Seymour, G. B. 2004. Effect of the Colorless non-ripening mutation on cell wall biochemistry and gene expression during tomato fruit development and ripening. *Plant Physiology*, 136(4):4184-4197.
- España, L., Heredia-Guerrero, J. A., Reina-Pinto, J. J., Fernández-Muñoz, R., Heredia, A., y Domínguez, E. 2014. Transient silencing of *CHALCONE SYNTHASE* during fruit ripening modifies tomato epidermal cells and cuticle properties. *Plant Physiology*, 166(3):1371-1386.

- Espinosa, I., Ortiz, R. I., Tovar, B., Mata, M., y Montalvo, E. 2013. Physiological and physicochemical behavior of soursop fruits refrigerated with 1-methylcyclopropene. *Journal of Food Quality*, 36(1):10-20.
- Fahlberg, P., Buhot, N., Johansson, O. N., y Andersson, M. X. 2019. Involvement of lipid transfer proteins in resistance against a non-host powdery mildew in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant pathology*, 20(1):69-77.
- Fatiha, A. I. D. 2019. Plant lipid metabolism. En: R. Valenzuela-Báez (ed). *Advances in Lipid Metabolism*. IntechOpen, Londres, 1-16 pp.
- Fornalé, S., Shi, X., Chai, C., Encina, A., Irar, S., Capellades, M., Fuguet, E., Torres, J.L., Rovira, P., Puigdomenech, P., Rigau, J., Grotewold, E., Gray, J y Caparrós-Ruiz, D. 2010. ZmMYB31 directly represses maize lignin genes and redirects the phenylpropanoid metabolic flux. *The Plant Journal*, 64(4):633-644.
- Gable, K., Garton, S., Napier, J. A., y Dunn, T. M. 2004. Functional characterization of the *Arabidopsis thaliana* orthologue of Tsc13p, the enoyl reductase of the yeast microsomal fatty acid elongating system. *Journal of Experimental Botany*, 55(396):543-545.
- Gamboa-Tuz, S. D., Pereira-Santana, A., Zamora-Briseño, J. A., Castano, E., Espadas-Gil, F., Ayala-Sumuano, J. T., Keb-Llanes, M. Á., Sanchez-Teyer, F., y Rodríguez-Zapata, L. C. 2018. Transcriptomics and co-expression networks reveal tissue-specific responses and regulatory hubs under mild and severe drought in papaya (*Carica papaya* L.). *Scientific Reports*, 8(1):1-16.
- Gao, Y., Wei, W., Fan, Z., Zhao, X., Zhang, Y., Jing, Y., Zhu, B., Zhu, H., Shan, W., y Chen, J. 2020. Re-evaluation of the nor mutation and the role of the NAC-NOR transcription factor in tomato fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*, 71(12):3560-3574.
- García-Coronado, H., Tafolla-Arellano, J. C., Hernández-Oñate, M. Á., Burgara-Estrella, A. J., Robles-Parra, J. M., y Tiznado-Hernández, M. E. 2022. Molecular biology, composition and physiological functions of cuticle lipids in fleshy fruits. *Plants*, 11(9):1133.
- Ge, Y., Dong, X., Liu, Y., Yang, Y., y Zhan, R. 2021. Molecular and biochemical analyses of avocado (*Persea americana*) reveal differences in the oil accumulation pattern between the mesocarp and seed during the fruit developmental period. *Scientia Horticulturae*, 276:109717.
- Go, Y. S., Kim, H., Kim, H. J., y Suh, M. C. 2014. *Arabidopsis* cuticular wax biosynthesis is negatively regulated by the DEWAX gene encoding an AP2/ERF-type transcription factor. *The Plant Cell*, 26(4):1666-1680.
- Góngora-Castillo, E., y Buell, C. R. 2013. Bioinformatics challenges in de novo transcriptome assembly using short read sequences in the absence of a reference genome sequence. *Natural product reports*, 30(4):490-500.
- González, E. M., Fernández, A. E. L., Paez, H. R., Oca, M. M. M. d., y Gómez, B. T. 2014. Uso combinado de 1-Metilciclopropeno y emulsiones de cera en la conservación de guanábana (*Annona muricata*). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36:296-304.
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., y Zeng, Q. 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-

Seq data without a reference genome. *Nature biotechnology*, 29(7):644-652.

- Guo, T., Wang, D., Fang, J., Zhao, J., Yuan, S., Xiao, L., y Li, X. 2019. Mutations in the rice OsCHR4 gene, encoding a CHD3 family chromatin remodeler, induce narrow and rolled leaves with increased cuticular wax. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10):2567.
- Gupta, Y., Pathak, A. K., Singh, K., Mantri, S. S., Singh, S. P., y Tuli, R. 2015. De novo assembly and characterization of transcriptomes of early-stage fruit from two genotypes of *Annona squamosa* L. with contrast in seed number. *BMC genomics*, 16:1-14.
- Haslam, T. M., Gerelle, W. K., Graham, S. W., y Kunst, L. 2017. The unique role of the ECERIFERUM2-LIKE clade of the BAHD acyltransferase superfamily in cuticular wax metabolism. *Plants*, 6(2):23.
- Hayashi, K.-i. 2012. The interaction and integration of auxin signaling components. *Plant and Cell Physiology*, 53(6):965-975.
- He, J., Tang, S., Yang, D., Chen, Y., Ling, L., Zou, Y., Zhou, M., y Xu, X. 2019. Chemical and transcriptomic analysis of cuticle lipids under cold stress in *Thellungiella salsuginea*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18):4519.
- Hen-Avivi, S., Lashbrooke, J., Costa, F., y Aharoni, A. 2013. Scratching the surface: genetic regulation of cuticle assembly in fleshy fruit. *Journal of Experimental Botany*, 65(16):4653-4664.
- Hong, J. C. 2016. General aspects of plant transcription factor families. En: D.H. Gonzalez (ed). *Plant transcription factors*. Academic Press, Londres, 35-56 pp.
- Hu, Z., Snitkin, E. S., y DeLisi, C. 2008. VisANT: an integrative framework for networks in systems biology. *Briefings in bioinformatics*, 9(4):317-325.
- Isaacson, T., Kosma, D. K., Matas, A. J., Buda, G. J., He, Y., Yu, B., Pravitasari, A., Batteas, J. D., Stark, R. E., y Jenks, M. A. 2009. Cutin deficiency in the tomato fruit cuticle consistently affects resistance to microbial infection and biomechanical properties, but not transpirational water loss. *The Plant Journal*, 60(2):363-377.
- Jakobson, L., Lindgren, L. O., Verdier, G., Laanemets, K., Brosché, M., Beisson, F., y Kollist, H. 2016. BODYGUARD is required for the biosynthesis of cutin in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 211(2):614-626.
- Janick, J., y Paull, R. E. 2008. *The encyclopedia of fruit and nuts*. CABI. Primera edición. Londres. 42-46 pp.
- Javelle, M., Vernoud, V., Depege-Fargeix, N., Arnould, C., Oursel, D., Domergue, F., Sarda, X., y Rogowsky, P. M. 2010. Overexpression of the epidermis-specific homeodomain-leucine zipper IV transcription factor Outer Cell Layer1 in maize identifies target genes involved in lipid metabolism and cuticle biosynthesis. *Plant Physiology*, 154(1):273-286.
- Jena, L., Sahu, S., Pradhan, P., Samal, K. C., Sahoo, J. P., Behera, L., y Palai, S. K. 2022. The Role of Transcription Factors in Response to Biotic Stresses in Tomato. En: S.H. Wani, V. Nataraj y G.P. Singh. (eds.). *Transcription Factors for Biotic Stress Tolerance in Plants*. Springer, Cham, 213-234 pp.
- Jiménez-Zurita, J. O., Balois-Morales, R., Alia-Tejacal, I., Juárez-López, P., Jiménez-Ruíz, E. I.,

- Sumaya-Martínez, M. T., y Bello-Lara, J. E. 2017. Tópicos del manejo poscosecha del fruto de guanábana (*Annona muricata* L.). *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 8(5):1155-1167.
- Jin, J., Tian, F., Yang, D.-C., Meng, Y.-Q., Kong, L., Luo, J., y Gao, G. 2017. PlantTFDB 4.0: toward a central hub for transcription factors and regulatory interactions in plants. *Nucleic acids research*. 45(1):1040-1045.
- Jones, P., Binns, D., Chang, H.-Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., y Nuka, G. 2014. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 30(9):1236-1240.
- Ju, S., Go, Y. S., Choi, H. J., Park, J. M., y Suh, M. C. 2017. DEWAX transcription factor is involved in resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana* and *Camelina sativa*. *Frontiers in Plant Science*, 8:1210.
- Ju, Z., y Bramlage, W. J. 2001. Developmental changes of cuticular constituents and their association with ethylene during fruit ripening in 'Delicious' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 21(3):257-263.
- Junker, B. H., y Schreiber, F. 2011. Networks in biology. En: B.H. Junker y F. Schreiber (eds.). *Analysis of biological networks*. Wiley Interscience, New York, 3-12 pp.
- Kannangara, R., Branigan, C., Liu, Y., Penfield, T., Rao, V., Mouille, G., Hofte, H., Pauly, M., Riechmann, J. L., y Broun, P. 2007. The transcription factor WIN1/SHN1 regulates cutin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 19(4):1278-1294.
- Karlebach, G., y Shamir, R. 2008. Modelling and analysis of gene regulatory networks. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(10):770-780.
- Khanin, R., y Wit, E. 2006. How scale-free are biological networks. *Journal of computational biology*, 13(3):810-818.
- Killcoyne, S., Carter, G. W., Smith, J., y Boyle, J. 2009. Cytoscape: a community-based framework for network modeling. En: Y. Nikolsky y J. Bryant (eds.). *Protein Networks and Pathway Analysis*. Humana Press, New York, 219-239 pp.
- Kim, H., Go, Y. S., y Suh, M. C. 2018. DEWAX2 transcription factor negatively regulates cuticular wax biosynthesis in *Arabidopsis* leaves. *Plant and Cell Physiology*, 59(5):966-977.
- Kleine, T. 2012. *Arabidopsis thaliana* mTERF proteins: evolution and functional classification. *Frontiers in Plant Science*, 3:233.
- Knoche, M., y Peschel, S. 2007. Gibberellins increase cuticle deposition in developing tomato fruit. *Plant Growth Regulation*, 51:1-10.
- Kong, L., Liu, Y., Zhi, P., Wang, X., Xu, B., Gong, Z., y Chang, C. 2020. Origins and evolution of cuticle biosynthetic machinery in land plants. *Plant Physiology*, 184(4):1998-2010.
- Kosma, D. K., Parsons, E. P., Isaacson, T., Lü, S., Rose, J. K. C., y Jenks, M. A. 2010. Fruit cuticle lipid composition during development in tomato ripening mutants. *Physiologia Plantarum*, 139(1):107-117.
- Kristensen, D. M., Wolf, Y. I., Mushegian, A. R., & Koonin, E. V. (2011). Computational methods for Gene Orthology inference. *Briefings in bioinformatics*, 12(5):379-391.

- Kubo, H., Peeters, A. J. M., Aarts, M. G. M., Pereira, A., y Koornneef, M. 1999. ANTHOCYANINLESS2, a homeobox gene affecting anthocyanin distribution and root development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 11(7):1217-1226.
- Kumar, S., Stecher, G., y Tamura, K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7):1870-1874.
- Langfelder, P., y Horvath, S. 2008. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC bioinformatics*, 9(1):1-13.
- Lara, I., Belge, B., y Goulao, L. F. 2015. A focus on the biosynthesis and composition of cuticle in fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(16):4005-4019.
- Lara, I., Heredia, A., y Domínguez, E. 2019. Shelf life potential and the fruit cuticle: the unexpected player. *Frontiers in Plant Science*, 10:770.
- Lashbrooke, J., Adato, A., Lotan, O., Alkan, N., Tsimbalist, T., Rechav, K., Fernandez-Moreno, J.-P., Widemann, E., Grausem, B., y Pinot, F. 2015. The tomato MIXTA-like transcription factor coordinates fruit epidermis conical cell development and cuticular lipid biosynthesis and assembly. *Plant Physiology*, 169(4):2553-2571.
- Lee, S. B., Go, Y. S., Bae, H.-J., Park, J. H., Cho, S. H., Cho, H. J., Lee, D. S., Park, O. K., Hwang, I., y Suh, M. C. 2009. Disruption of glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein gene altered cuticular lipid composition, increased plastoglobules, and enhanced susceptibility to infection by the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. *Plant Physiology*, 150(1):42-54.
- Lee, S. B., y Suh, M. C. 2015. Advances in the understanding of cuticular waxes in *Arabidopsis thaliana* and crop species. *Plant cell reports*, 34:557-572.
- Lee, S. B., y Suh, M. C. 2015. Cuticular wax biosynthesis is up-regulated by the MYB94 transcription factor in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 56(1):48-60.
- Lee, S.-B., Jung, S.-J., Go, Y.-S., Kim, H.-U., Kim, J.-K., Cho, H.-J., Park, O. K., y Suh, M.-C. 2009. Two *Arabidopsis* 3-ketoacyl CoA synthase genes, KCS20 and KCS2/DAISY, are functionally redundant in cuticular wax and root suberin biosynthesis, but differentially controlled by osmotic stress. *The Plant Journal*, 60(3):462-475.
- Li, S., Wang, X., He, S., Li, J., Huang, Q., Imaizumi, T., Qu, L., Qin, G., Qu, L.-J., y Gu, H. 2016. CFLAP1 and CFLAP2 are two bHLH transcription factors participating in synergistic regulation of AtCFL1-mediated cuticle development in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics*, 12(1):e1005744.
- Li R, Sun S, Wang H, Wang K, Yu H, Zhou Z, Xin P, Chu J, Zhao T, Wang H, Li J, Cui X. 2020. FIS1 encodes a GA2-oxidase that regulates fruit firmness in tomato. *Nat Commun*. 11(1):5844.
- Liang, B., Sun, Y., Wang, J., Zheng, Y., Zhang, W., Xu, Y., Li, Q., y Leng, P. 2021. Tomato protein phosphatase 2C influences the onset of fruit ripening and fruit glossiness. *Journal of Experimental Botany*, 72(7):2403-2418.
- Lisso, J., Schröder, F., Schippers, J. H. M., y Müssig, C. 2012. NFXL2 modifies cuticle properties in *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior*, 7(5):551-555.
- Liu, C.-C., Chi, C., Jin, L.-J., Zhu, J., Yu, J.-Q., y Zhou, Y.-H. 2018. The bZip transcription factor

- HY5 mediates CRY1a-induced anthocyanin biosynthesis in tomato. *Plant, Cell & Environment*, 41(8):1762-1775.
- Liu, D.-C., Zeng, Q., Ji, Q.-X., Liu, C.-F., Liu, S.-B., y Liu, Y. 2012. A comparison of the ultrastructure and composition of fruits' cuticular wax from the wild-type 'Newhall' navel orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck cv. Newhall) and its glossy mutant. *Plant cell reports*, 31:2239-2246.
- Liu, K., Feng, S., Pan, Y., Zhong, J., Chen, Y., Yuan, C., y Li, H. 2016. Transcriptome analysis and identification of genes associated with floral transition and flower development in sugar apple (*Annona squamosa* L.). *Frontiers in Plant Science*, 7:1695.
- Lü, S., Zhao, H., Des Marais, D. L., Parsons, E. P., Wen, X., Xu, X., Bangarusamy, D. K., Wang, G., Rowland, O., y Juenger, T. 2012. Arabidopsis ECERIFERUM9 involvement in cuticle formation and maintenance of plant water status. *Plant Physiology*, 159(3):930-944.
- Ma, H., Yang, T., Li, Y., Zhang, J., Wu, T., Song, T., Yao, Y., y Tian, J. 2021. The long noncoding RNA MdLNC499 bridges MdWRKY1 and MdERF109 function to regulate early-stage light-induced anthocyanin accumulation in apple fruit. *The Plant Cell*, 33(10):3309-3330.
- Madritsch, S., Burg, A., y Sehr, E. M. 2021. Comparing de novo transcriptome assembly tools in di- and autotetraploid non-model plant species. *BMC bioinformatics*, 22:1-17.
- Mahjoub, A., Hernould, M., Joubès, J., Decendit, A., Mars, M., Barrieu, F., Hamdi, S., y Delrot, S. 2009. Overexpression of a grapevine R2R3-MYB factor in tomato affects vegetative development, flower morphology and flavonoid and terpenoid metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(7):551-561.
- Mandal, S., Ji, W., y McKnight, T. D. 2020. Candidate gene networks for acylsugar metabolism and plant defense in wild tomato *Solanum pennellii*. *The Plant Cell*, 32(1):81-99.
- Mandel, T., Rogachev, I., Venger, I., Mintz-Oron, S., Aharoni, A., y Adato, A. 2007. The ins and outs of tomato fruit peel metabolome. *Acta Horticulturae*. 814:465-474.
- Martin, L. B. B., Romero, P., Fich, E. A., Domozych, D. S., y Rose, J. K. C. 2017. Cuticle biosynthesis in tomato leaves is developmentally regulated by abscisic acid. *Plant Physiology*, 174(3):1384-1398.
- Martínez-González, M. E., Balois-Morales, R., Alia-Tejacal, I., Cortes-Cruz, M. A., Palomino-Hermosillo, Y. A., y López-Gúzman, G. G. 2017. Poscosecha de frutos: maduración y cambios bioquímicos. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 8(SPE19):4075-4087.
- Mehrtens, F., Kranz, H., Bednarek, P., y Weisshaar, B. 2005. The Arabidopsis transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Physiology*, 138(2):1083-1096.
- Minoia, S., Boualem, A., Marcel, F., Troadec, C., Quemener, B., Cellini, F., Petrozza, A., Vigouroux, J., Lahaye, M., y Carriero, F. 2016. Induced mutations in tomato *SlExp1* alter cell wall metabolism and delay fruit softening. *Plant Science*, 242:195-202.
- Monda, K., Mabuchi, A., Takahashi, S., Negi, J., Tohmori, R., Terashima, I., Yamori, W., y Iba, K. 2020. Increased Cuticle Permeability Caused by a New Allele of ACETYL-COA CARBOXYLASE1 Enhances CO₂ Uptake. *Plant Physiology*, 184(4):1917-1926.
- Moreno-Hernández, C. L., Sáyago-Ayerdi, S. G., García-Galindo, H. S., Mata-Montes De Oca, M.,

- y Montalvo-González, E. 2014. Effect of the application of 1-methylcyclopropene and wax emulsions on proximate analysis and some antioxidants of soursop (*Annona muricata* L.). *The Scientific World Journal*. 896853
- Nadakuduti, S. S., Pollard, M., Kosma, D. K., Allen Jr, C., Ohlrogge, J. B., y Barry, C. S. 2012. Pleiotropic phenotypes of the sticky peel mutant provide new insight into the role of CUTIN DEFICIENT2 in epidermal cell function in tomato. *Plant Physiology*, 159(3):945-960.
- Nagano, M., Kakuta, C., Fukao, Y., Fujiwara, M., Uchimiya, H., y Kawai-Yamada, M. 2019. Arabidopsis Bax inhibitor-1 interacts with enzymes related to very-long-chain fatty acid synthesis. *Journal of plant research*, 132:131-143.
- Naik, A. V., y Sellappan, K. 2020. In vitro evaluation of *Annona muricata* L.(Soursop) leaf methanol extracts on inhibition of tumorigenicity and metastasis of breast cancer cells. *Biomarkers*, 25(8):701-710.
- Nguyen, M. T., Nguyen, V. T., Minh, L. V., Trieu, L. H., Cang, M. H., Bui, L. B., Le, X. T., y Danh, V. T. 2020. Determination of the phytochemical screening, total polyphenols, flavonoids content, and antioxidant activity of soursop leaves (*Annona muricata* Linn.). *Materials Science and Engineering*.736(6):062011.
- Ni, Y., Guo, Y. J., Wang, J., Xia, R. E., Wang, X. Q., Ash, G., y Li, J. N. 2014. Responses of physiological indexes and leaf epicuticular waxes of *B. rassaica napus* to *S. clerotinia sclerotiorum* infection. *Plant Pathology*, 63(1):174-184.
- Oshima, Y., y Mitsuda, N. 2013. The MIXTA-like transcription factor MYB16 is a major regulator of cuticle formation in vegetative organs. *Plant Signaling & Behavior*, 8(11):e26826.
- Oshima, Y., Shikata, M., Koyama, T., Ohtsubo, N., Mitsuda, N., y Ohme-Takagi, M. 2013. MIXTA-like transcription factors and WAX INDUCER1/SHINE1 coordinately regulate cuticle development in *Arabidopsis* and *Torenia fournieri*. *The Plant Cell*, 25(5):1609-1624.
- Palomino-Hermosillo, Y. A., Berumen-Varela, G., Ochoa-Jiménez, V. A., Balois-Morales, R., Jiménez-Zurita, J. O., Bautista-Rosales, P. U., Martínez-González, M. E., López-Guzmán, G. G., Cortés-Cruz, M. A., y Guzmán, L. F. 2022. Transcriptome Analysis of Soursop (*Annona muricata* L.) Fruit under Postharvest Storage Identifies Genes Families Involved in Ripening. *Plants*, 11(14):1798.
- Panikashvili, D., Shi, J. X., Bocobza, S., Franke, R. B., Schreiber, L., y Aharoni, A. 2010. The *Arabidopsis* DSO/ABCG11 transporter affects cutin metabolism in reproductive organs and suberin in roots. *Molecular plant*, 3(3):563-575.
- Park, C. S., Go, Y. S., y Suh, M. C. 2016. Cuticular wax biosynthesis is positively regulated by WRINKLED 4, an AP 2/ERF-type transcription factor, in *Arabidopsis* stems. *The Plant Journal*, 88(2):257-270.
- Pearson, W. R. 2013. An introduction to sequence similarity (“homology”) searching. *Current protocols in bioinformatics*, 42(1):1-8.
- Pertea, M., Pertea, G. M., Antonescu, C. M., Chang, T.-C., Mendell, J. T., y Salzberg, S. L. 2015. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. *Nature biotechnology*, 33(3): 290-295.
- Peschel, S., Franke, R., Schreiber, L., y Knoche, M. 2007. Composition of the cuticle of developing

sweet cherry fruit. *Phytochemistry*, 68(7):1017-1025.

- Petit, J., Bres, C., Just, D., Garcia, V., Mauxion, J.-P., Marion, D., Bakan, B., Joubès, J., Domergue, F., y Rothan, C. 2014. Analyses of tomato fruit brightness mutants uncover both cutin-deficient and cutin-abundant mutants and a new hypomorphic allele of GDSL lipase. *Plant Physiology*, 164(2):888-906.
- Petit, J., Bres, C., Reynoud, N., Lahaye, M., Marion, D., Bakan, B., y Rothan, C. 2021. Unraveling cuticle formation, structure, and properties by using tomato genetic diversity. *Frontiers in Plant Science*, 12:778131.
- Petit-Jiménez, D., González-León, A., González-Aguilar, G., Sotelo-Mundo, R., y Báez-Sañudo, R. 2007. Cambios de la cutícula durante la ontogenia del fruto de *Mangifera indica* L. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(1):51-51.
- Philippe, G., Geneix, N., Petit, J., Guillon, F., Sandt, C., Rothan, C., Lahaye, M., Marion, D., y Bakan, B. 2020. Assembly of tomato fruit cuticles: a cross-talk between the cutin polyester and cell wall polysaccharides. *New Phytologist*, 226(3):809-822.
- Prasanna, V., Prabha, T. N., y Tharanathan, R. N. 2007. Fruit ripening phenomena—an overview. *Critical reviews in food science and nutrition*, 47(1):1-19.
- Qiu, Z., Wang, H., Li, D., Yu, B., Hui, Q., Yan, S., Huang, Z., Cui, X., y Cao, B. 2019. Identification of candidate HY5-dependent and-independent regulators of anthocyanin biosynthesis in tomato. *Plant and Cell Physiology*, 60(3):643-656.
- Rains, M. K., Gardiyehewa de Silva, N. D., & Molina, I. 2018. Reconstructing the suberin pathway in poplar by chemical and transcriptomic analysis of bark tissues. *Tree Physiology*, 38(3):340-361.
- Richardson, A., Boscari, A., Schreiber, L., Kerstiens, G., Jarvis, M., Herzyk, P., y Fricke, W. 2007. Cloning and expression analysis of candidate genes involved in wax deposition along the growing barley (*Hordeum vulgare*) leaf. *Planta*, 226:1459-1473.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., y Smyth, G. K. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1):139-140.
- Ryan, D. P., y Owen-Hughes, T. 2011. Snf2-family proteins: chromatin remodellers for any occasion. *Current opinion in chemical biology*, 15(5):649-656.
- Saladié, M., Matas, A. J., Isaacson, T., Jenks, M. A., Goodwin, S. M., Niklas, K. J., Xiaolin, R., Labavitch, J. M., Shackel, K. A., y Fernie, A. R. 2007. A reevaluation of the key factors that influence tomato fruit softening and integrity. *Plant Physiology*, 144(2):1012-1028.
- Saladie, M., Rose, J. K. C., y Watkins, C. B. 2004. Characterization of DFD (delayed fruit deterioration): A new tomato mutant. *Acta Horticulturae*. 682:79-84.
- Samuels, L., Kunst, L., y Jetter, R. 2008. Sealing plant surfaces: cuticular wax formation by epidermal cells. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59:683-707.
- Santos-Mendoza, M., Dubreucq, B., Baud, S., Parcy, F., Caboche, M., y Lepiniec, L. 2008. Deciphering gene regulatory networks that control seed development and maturation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 54(4):608-620.

- Seo, P. J., Lee, S. B., Suh, M. C., Park, M.-J., Go, Y. S., y Park, C.-M. 2011. The MYB96 transcription factor regulates cuticular wax biosynthesis under drought conditions in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 23(3):1138-1152.
- Servicio de Información Agrícola y Pesquera (SIAP). (2017). Cierre de la Producción Agrícola. México: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>.
- Shepherd, T., y Wynne Griffiths, D. 2006. The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytologist*, 171(3):469-499.
- Shi, J. X., Adato, A., Alkan, N., He, Y., Lashbrooke, J., Matas, A. J., Meir, S., Malitsky, S., Isaacson, T., y Prusky, D. 2013. The tomato S I SHINE 3 transcription factor regulates fruit cuticle formation and epidermal patterning. *New Phytologist*, 197(2):468-480.
- Shi, J. X., Malitsky, S., De Oliveira, S., Branigan, C., Franke, R. B., Schreiber, L., y Aharoni, A. 2011. SHINE transcription factors act redundantly to pattern the archetypal surface of *Arabidopsis* flower organs. *PLoS Genetics*, 7(5):e1001388.
- Siang, L. M., Ding, P., y Mohamed, M. T. M. 2019. Response of 1-Methycyclopropene on postharvest quality of local soursop (*Annona muricata* L.). *Sains Malaysiana*, 48(3):571-579.
- Sohn, J.-i., y Nam, J.-W. 2018. The present and future of de novo whole-genome assembly. *Briefings in bioinformatics*, 19(1):23-40.
- Strijk, J. S., Hinsinger, D. D., Roeder, M. M., Chatrou, L. W., Couvreur, T. L. P., Erkens, R. H. J., Sauquet, H., Pirie, M. D., Thomas, D. C., y Cao, K. 2021. Chromosome-level reference genome of the soursop (*Annona muricata*): A new resource for Magnoliid research and tropical pomology. *Molecular Ecology Resources*, 21(5):1608-1619.
- Sun, Y., Hegebarth, D., y Jetter, R. 2021. Acyl-CoA desaturase ADS4. 2 is involved in the formation of characteristic wax alkenes in young *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiology*, 186(4):1812-1831.
- Tafolla-Arellano, J. C., Báez-Sañudo, R., y Tiznado-Hernández, M. E. 2018. The cuticle as a key factor in the quality of horticultural crops. *Scientia Horticulturae*, 232:145-152.
- Tafolla-Arellano, J. C., González-León, A., Tiznado-Hernández, M. E., Zacarías García, L., y Báez-Sañudo, R. 2013. Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en plantas. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(1):3-12.
- Tafolla-Arellano, J. C., Zheng, Y., Sun, H., Jiao, C., Ruiz-May, E., Hernández-Oñate, M. A., González-León, A., Báez-Sañudo, R., Fei, Z., y Domozych, D. 2017. Transcriptome analysis of mango (*Mangifera indica* L.) fruit epidermal peel to identify putative cuticle-associated genes. *Scientific Reports*, 7(1):46163.
- To, A., Joubès, J., Barthole, G., Lécureuil, A., Scagnelli, A., Jasinski, S., Lepiniec, L., y Baud, S. 2012. WRINKLED transcription factors orchestrate tissue-specific regulation of fatty acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24(12):5007-5023.
- Tovar-Gómez, B., Mata-Montes de Oca, M., García-Galindo, H. S., y Montalvo-González, E. 2011. Efecto de emulsiones de cera y 1-metilciclopropeno en la conservación poscosecha de guanabana. *Revista Chapingo*. 17(SPE1):53-61.
- Uluşik, S., & Seymour, G. B. 2020. Pectate lyases: Their role in plants and importance in fruit ripening. *Food Chemistry*. 309:125559.

- Vogg, G., Fischer, S., Leide, J., Emmanuel, E., Jetter, R., Levy, A. A., y Riederer, M. 2004. Tomato fruit cuticular waxes and their effects on transpiration barrier properties: functional characterization of a mutant deficient in a very-long-chain fatty acid β -ketoacyl-CoA synthase. *Journal of Experimental Botany*, 55(401):1401-1410.
- Vrebalov, J., Pan, I. L., Arroyo, A. J. M., McQuinn, R., Chung, M., Poole, M., Rose, J., Seymour, G., Grandillo, S., y Giovannoni, J. 2009. Fleshy fruit expansion and ripening are regulated by the tomato SHATTERPROOF gene TAGL1. *The Plant Cell*, 21(10):3041-3062.
- Wang, J., Sun, L., Xie, L., He, Y., Luo, T., Sheng, L., Luo, Y., Zeng, Y., Xu, J., y Deng, X. 2016. Regulation of cuticle formation during fruit development and ripening in 'Newhall' navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck) revealed by transcriptomic and metabolomic profiling. *Plant Science*, 243:131-144.
- Wang, T., Wei, Q., Wang, Z., Liu, W., Zhao, X., Ma, C., Gao, J., Xu, Y., y Hong, B. 2022. CmNF-YB8 affects drought resistance in chrysanthemum by altering stomatal status and leaf cuticle thickness. *Journal of Integrative Plant Biology*, 64(3):741-755.
- Wang, W., Zhang, Y., Xu, C., Ren, J., Liu, X., Black, K., Gai, X., Wang, Q., y Ren, H. 2015. Cucumber ECERIFERUM1 (CsCER1), which influences the cuticle properties and drought tolerance of cucumber, plays a key role in VLC alkanes biosynthesis. *Plant Molecular Biology*, 87:219-233.
- Wang, X., Wang, X., Hu, Q., Dai, X., Tian, H., Zheng, K., Wang, X., Mao, T., Chen, J.-G., y Wang, S. 2015. Characterization of an activation-tagged mutant uncovers a role of GLABRA 2 in anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 83(2):300-311.
- Wang, X., Zhi, P., Fan, Q., Zhang, M., y Chang, C. 2019. Wheat CHD3 protein TaCHR729 regulates the cuticular wax biosynthesis required for stimulating germination of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *Journal of Experimental Botany*, 70(2):701-713.
- Wang, Z., Guhling, O., Yao, R., Li, F., Yeats, T. H., Rose, J. K. C., y Jetter, R. 2011. Two oxidosqualene cyclases responsible for biosynthesis of tomato fruit cuticular triterpenoids. *Plant Physiology*, 155(1):540-552.
- Wei, W. E. I., Zhongqi, F. A. N., Jianye, C., Kuang, J., Wangjin, L. U., y Wei, S. 2017. A Banana PHD-Type Transcription Factor MaPHD1 Represses a Cell Wall-Degradation Gene MaXTH6 during Fruit Ripening. *Horticultural Plant Journal*, 3(5):190-198.
- Weirauch, M. T. 2011. Gene coexpression networks for the analysis of DNA microarray data. *Applied statistics for network biology: methods in systems biology*, 1:215-250.
- Wellesen, K., Durst, F., Pinot, F., Benveniste, I., Nettesheim, K., Wisman, E., Steiner-Lange, S., Saedler, H., y Yephremov, A. 2001. Functional analysis of the LACERATA gene of *Arabidopsis* provides evidence for different roles of fatty acid ω -hydroxylation in development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(17):9694-9699.
- Weng, H., Molina, I., Shockey, J., y Browse, J. 2010. Organ fusion and defective cuticle function in a *lacs1 lacs2* double mutant of *Arabidopsis*. *Planta*, 231:1089-1100.
- Worrell, D. B., Sean, C. M., y Huber, D. J. 1994. Growth, maturation and ripening of soursop (*Annona muricata* L.) fruit. *Scientia Horticulturae*, 57(1-2):7-15.
- Wu, G.Z., y Xue, H.W. 2010. *Arabidopsis* β -ketoacyl-[acyl carrier protein] synthase I is crucial for

fatty acid synthesis and plays a role in chloroplast division and embryo development. *The Plant Cell*, 22(11):3726-3744.

- Xiao, F., Mark Goodwin, S., Xiao, Y., Sun, Z., Baker, D., Tang, X., Jenks, M. A., y Zhou, J.-M. 2004. *Arabidopsis* CYP86A2 represses *Pseudomonas syringae* type III genes and is required for cuticle development. *The EMBO journal*, 23(14):2903-2913.
- Xing, S., van Deenen, N., Magliano, P., Frahm, L., Forestier, E., Nawrath, C., Schaller, H., Gronover, C. S., Prüfer, D., y Poirier, Y. 2014. ATP citrate lyase activity is post-translationally regulated by sink strength and impacts the wax, cutin and rubber biosynthetic pathways. *The Plant Journal*, 79(2):270-284.
- Xiong, C., Xie, Q., Yang, Q., Sun, P., Gao, S., Li, H., Zhang, J., Wang, T., Ye, Z., y Yang, C. 2020. WOOLLY, interacting with MYB transcription factor MYB31, regulates cuticular wax biosynthesis by modulating CER6 expression in tomato. *The Plant Journal*, 103(1):323-337.
- Xu, X., Xue, K., Tang, S., He, J., Song, B., Zhou, M., Zou, Y., Zhou, Y., y Jenks, M. A. 2019. The relationship between cuticular lipids and associated gene expression in above ground organs of *Thellungiella salsugineum* (Pall.) Al-Shehbaz & Warwick. *Plant Science*, 287:110200.
- Xue, Y., Xiao, S., Kim, J., Lung, S.-C., Chen, L., Tanner, J. A., Suh, M. C., y Chye, M.-L. 2014. *Arabidopsis* membrane-associated acyl-CoA-binding protein ACBP1 is involved in stem cuticle formation. *Journal of Experimental Botany*, 65(18):5473-5483.
- Yan, S., Yang, X.-F., Liu, H.-L., Fu, N., Ouyang, Y., y Qing, K. 2015. Long-chain acyl-CoA synthetase in fatty acid metabolism involved in liver and other diseases: an update. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 21(12):3492.
- Yang, S. F., y Oetiker, J. H. 1994. The role of ethylene in fruit ripening. *Postharvest Physiology of Fruits* 398:167-178.
- Yang, L., Huang, W., Xiong, F., Xian, Z., Su, D., Ren, M., & Li, Z. 2017. Silencing of Sl PL, 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.
- Yeats, T. H., Martin, L. B. B., Viart, H. M. F., Isaacson, T., He, Y., Zhao, L., Matas, A. J., Buda, G. J., Domozych, D. S., y Clausen, M. H. 2012. The identification of cutin synthase: formation of the plant polyester cutin. *Nature Chemical Biology*, 8(7):609-611.
- Yeats, T. H., y Rose, J. K. C. 2013. The formation and function of plant cuticles. *Plant Physiology*, 163(1), 5-20.
- Yip, K. Y., Yu, H., Kim, P. M., Schultz, M., y Gerstein, M. 2006. The tYNA platform for comparative interactomics: a web tool for managing, comparing and mining multiple networks. *Bioinformatics*, 22(23):2968-2970.
- Yu, B., Gruber, M. Y., Khachatourians, G. G., Zhou, R., Epp, D. J., Hegedus, D. D., Parkin, I. A. P., Welsch, R., y Hannoufa, A. 2012. *Arabidopsis* cpSRP54 regulates carotenoid accumulation in *Arabidopsis* and *Brassica napus*. *Journal of Experimental Botany*, 63(14):5189-5202.
- Yung, W.-S., Li, M.-W., Sze, C.-C., Wang, Q., y Lam, H.-M. 2021. Histone modifications and chromatin remodelling in plants in response to salt stress. *Physiologia Plantarum*, 173(4):1495-1513.

- Zhang, J.-Y., Broeckling, C. D., Blancaflor, E. B., Sledge, M. K., Sumner, L. W., y Wang, Z.-Y. 2005. Overexpression of WXP1, a putative *Medicago truncatula* AP2 domain-containing transcription factor gene, increases cuticular wax accumulation and enhances drought tolerance in transgenic alfalfa (*Medicago sativa*). *The Plant Journal*, 42(5):689-707.
- Zhang, J.-Y., Broeckling, C. D., Sumner, L. W., y Wang, Z.-Y. 2007. Heterologous expression of two *Medicago truncatula* putative ERF transcription factor genes, WXP1 and WXP2, in *Arabidopsis* led to increased leaf wax accumulation and improved drought tolerance, but differential response in freezing tolerance. *Plant Molecular Biology*, 64:265-278.
- Zhang, P., Wang, R., Yang, X., Ju, Q., Li, W., Lü, S., Tran, L.-S. P., y Xu, J. 2020. The R2R3-MYB transcription factor AtMYB49 modulates salt tolerance in *Arabidopsis* by modulating the cuticle formation and antioxidant defence. *Plant, Cell & Environment*, 43(8):1925-1943.
- Zheng, H., Rowland, O., y Kunst, L. 2005. Disruptions of the *Arabidopsis* enoyl-CoA reductase gene reveal an essential role for very-long-chain fatty acid synthesis in cell expansion during plant morphogenesis. *The Plant Cell*, 17(5):1467-1481.
- Zheng, Y., Jiao, C., Sun, H., Rosli, H. G., Pombo, M. A., Zhang, P., Banf, M., Dai, X., Martin, G. B., y Giovannoni, J. J. 2016. iTAK: a program for genome-wide prediction and classification of plant transcription factors, transcriptional regulators, and protein kinases. *Molecular plant*, 9(12):1667-1670.
- Zhu, X., Gerstein, M., y Snyder, M. 2007. Getting connected: analysis and principles of biological networks. *Genes & development*, 21(9):1010-1024.