

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR TIEMPO REAL DURANTE
EL SUAVIZAMIENTO DE FRUTOS DE PAPAYA

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de
Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales para optar al grado y título
de Maestría Académica en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales

DESSIREÉ PATRICIA ZERPA CATANHO

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2014

Dedicatoria

A Dios, por las oportunidades y bendiciones brindadas durante toda mi vida.

A mi familia, especialmente a mis hermanos y mi mamá, por el apoyo incondicional durante toda mi educación.

A mis amigos, por el apoyo y el impulso durante las épocas difíciles.

Agradecimientos

Dr. Victor Jiménez, profesor y amigo, por la guía brindada durante mi educación y colaboración durante el desarrollo de mi tesis.

Dra. Patricia Esquivel, profesora y amiga, por su colaboración para los análisis físicos y químicos de los frutos y la revisión de mi tesis como asesora.

Dr. Raúl Herrera, por su colaboración como asesor externo.

M.Sc. Marco Vinicio Sáenz, coordinador del laboratorio de Tecnología Poscosecha del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) de la Universidad de Costa Rica (UCR), por su colaboración en la consecución de los frutos de papaya para los ensayos de expresión génica y tratamientos poscosecha.

M.Sc. Eric Mora Newcomer, por su colaboración en la consecución de frutos de papaya para los ensayos de correlación.

Dr. Kenneth Madriz, profesor, jefe y amigo, por la introducción a la biología molecular y colaboración durante el desarrollo de mi tesis.

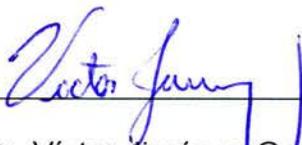
Señor Giovanni González, técnico del Laboratorio de Química de la Escuela de Tecnología de Alimentos, por su colaboración durante parte del desarrollo experimental de mi tesis.

Grupo de trabajo de estudiantes y asistentes del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica (UCR): Yira Alfaro, Andrea Holst, Paúl Solórzano, Ester Vargas, y especialmente a Jennifer Gonzaga Soto, por su colaboración durante el desarrollo experimental de mi tesis.

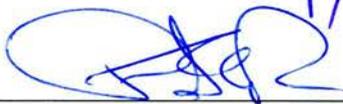
“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de Maestría Académica en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales con énfasis en Biotecnología.”



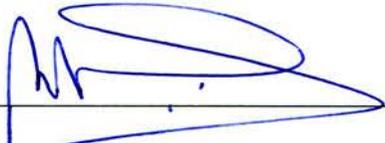
Dr. Federico Albertazzi Castro
Representante de Decana
Sistema de Estudios de Posgrado



Dr. Víctor Jiménez García
Director de Tesis



Dra. Patricia Esquivel Rodríguez
Asesora



Dr. Raúl Herrera Faúndez
Asesor



Dr. Eric Guevara Berger
Director

Programa de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales



Dessireé Patricia Zerpa Catanho
Candidata

Índice

Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Índice.....	v
Resumen.....	vii
Review.....	viii
Lista de cuadros.....	ix
Lista de figuras.....	x
Lista de anexos.....	xii
Introducción.....	1
Marco teórico.....	3
Papaya (<i>Carica papaya</i> L.).....	3
Maduración de frutos de papaya.....	4
Estructura de la pared celular en las células vegetales.....	8
Enzimas responsables del suavizamiento de frutos de papaya.....	9
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real.....	13
Antecedentes y Justificación.....	15
Objetivos.....	20
Objetivo general.....	20
Objetivos específicos.....	20
Materiales y métodos.....	21
Ensayo I.....	21
Material vegetal.....	21
Tratamientos poscosecha.....	22
Parámetros físicos de maduración: firmeza y color.....	23
Parámetros químicos de maduración: pH, sólidos solubles y acidez.....	24
Extracción de ARN.....	25
Purificación del ARN extraído.....	26

Cuantificación del ARN extraído y purificado	26
Obtención de ADNc a partir de ARN	27
Expresión génica por medio de PCR en tiempo real	27
Análisis estadístico de los resultados	31
Ensayo II.....	32
Material vegetal.....	32
Análisis estadístico de los resultados	32
Resultados	34
Ensayo I.....	34
Parámetros físicos de maduración: firmeza y color	34
Parámetros químicos de maduración: pH, sólidos solubles y acidez.....	38
Expresión génica por medio de PCR en tiempo real	39
Ensayo II.....	55
Correlación entre la firmeza y la expresión génica	55
Discusión	59
Firmeza.....	59
Color	61
pH, acidez titulable y sólidos solubles	63
Expresión génica y correlación con pérdida de firmeza	65
Conclusiones y perspectivas.....	80
Literatura citada	83
Anexos	95

Resumen

La papaya (*Carica papaya* L.) es un cultivo de gran importancia que presenta algunos problemas durante su maduración ya que el rápido suavizamiento del fruto en esta etapa reduce su vida útil. Dicho suavizamiento se ha relacionado con degradación o modificación de paredes celulares, debido a la actividad de enzimas hidrolasas y otras proteínas asociadas a la pared celular. El estudio, entendimiento y eventual regulación del proceso de suavizamiento de los frutos permitiría buscar alternativas para incrementar la vida útil de los mismos. El objetivo de este trabajo fue determinar y comparar el patrón de transcripción de cuatro genes involucrados en el suavizamiento de frutos de papaya y un gen candidato para la enzima ACC deaminasa durante el proceso de maduración y en relación con la aplicación de diferentes tratamientos poscosecha, así como correlacionar la transcripción de dichos genes con la pérdida de firmeza de los frutos. Para ello, se utilizaron frutos de papaya del híbrido "Pococi" (con un grado de maduración 1-2) tratados con etileno (275-300 ppm), 1-metilciclopropeno (1-MCP, 300 ppb) o sin tratar. Dichos frutos se colocaron en cámara de maduración por 11 días (18-20°C, 95% H.R). Durante el período de evaluación se determinó firmeza (N) y color (L^* , a^* y b^*) de la pulpa y la cáscara; pH, acidez titulable y sólidos solubles de la pulpa; además se extrajo ARN de la pulpa y la cáscara de cinco frutos para cada tratamiento. Posteriormente, se determinó el patrón de acumulación de transcritos de los genes que codifican para poligalacturonasa, endoxilanasas, pectinesterasa, expansina y un gen candidato para la ACC deaminasa mediante PCR en tiempo real. Los tratamientos presentaron diferencias en cuanto a cambio de firmeza, color, pH, acidez titulable y patrón de acumulación de transcritos de diferentes genes. La acumulación de transcritos de los genes de las enzimas poligalacturonasa y endoxilanasas se correlacionó negativamente con la firmeza de la pulpa y la cáscara de frutos de papaya; mientras que la acumulación de transcritos del gen de la pectinesterasa se correlacionó positivamente con la firmeza de la cáscara. Los resultados sugieren que el 1-MCP, al bloquear irreversiblemente el sitio de unión del etileno a su receptor, podría retardar la maduración y el suavizamiento de los frutos de papaya mediante una posterior inhibición de la transcripción de los genes que codifican para la poligalacturonasa y la endoxilanasas. Adicionalmente, el etileno exógeno podría inducir la transcripción de un gen candidato para una enzima ACC deaminasa en papaya.

Review

Papaya (*C. papaya* L.), an economically important crop, shows several problems during fruit ripening mainly caused by a quick softening that reduces its shelf life. This softening is directly related to degradation and modification of cell walls, due to activity of hydrolases and other enzymes related to the cell walls. Therefore, studying, understanding and, eventually, regulating the softening process are important to increase papaya's shelf life. The main objective of this work was to determine and compare the transcription pattern of different genes involved in papaya's fruit softening and one putative gene for the enzyme ACC deaminase during the ripening process and in relation to postharvest treatments, through real time PCR, and also to correlate the transcription of these genes with the softening process of the fruits. Papaya fruits ("Pococi" hybrid) were selected (ripening grade 1-2) and subjected to different treatments: control, ethylene (275-300 ppm) and 1-methylcyclopropene (1-MCP, 300 ppb). The fruits were stored for 11 days at 18-20°C and 95% relative humidity. During the evaluation period, firmness (N) and color (L*, a*, b*) of pulp and peels were determined; pH, titratable acidity and soluble solids of pulp were also measured; and RNA from pulp and peels of five fruits per treatment was extracted. Subsequently, the pattern of transcripts accumulation for polygalacturonase, endoxylanase, pectinesterase, expansin and one putative gene for the enzyme ACC deaminase were determined using real time PCR. Treatments showed differences in terms of firmness, color, pH, titratable acidity and pattern of transcripts accumulation for different genes. The transcript accumulation for polygalacturonase and endoxylanase genes negatively correlated with the firmness of the pulp and peels of papaya fruits; whereas the transcript accumulation for the pectinesterase gene was positively correlated with this characteristic. These results suggest that 1-MCP, by blocking the ethylene binding site to its receptor in an irreversible way, might retard ripening and softening of the papaya fruits and therefore transcription of polygalacturonase and endoxylanase genes might be subsequently inhibited. Moreover, the application of ethylene can induce the transcription of one putative gene for the enzyme ACC deaminase in papaya.

Lista de cuadros

Cuadro 1. Cebadores diseñados con Primer3Plus (Free Software Foundation, Inc., Boston, MA, Estados Unidos de América) para la detección de los diferentes genes involucrados en el suavizamiento de frutos de papaya	29
Cuadro 2. Composición de las mezclas maestra utilizadas para la PCR en tiempo real de los genes involucrados en el suavizamiento de frutos de papaya.....	30
Cuadro 3. Ciclo térmico utilizado para la PCR en tiempo real de los genes involucrados en el suavizamiento de frutos de papaya	31
Cuadro 4. Color (L^* , a^* y b^*) determinado en las cuatro fechas de evaluación en la pulpa de frutos de papaya “Pococi” sometidos a diferentes tratamientos	35
Cuadro 5. Color (L^* , a^* y b^*) determinado en las cuatro fechas de evaluación en la cáscara de frutos de papaya “Pococi” sometidos a diferentes tratamientos	37
Cuadro 6. Parámetros químicos de maduración determinados en la pulpa de frutos de papaya “Pococi” sometidos a diferentes tratamientos.....	38
Cuadro 7. Análisis de correlación entre la firmeza y la transcripción de diferentes genes en la pulpa y en la cáscara de frutos de papaya “Pococi”	55

Lista de figuras

Figura 1. Ruta metabólica para la síntesis del etileno	5
Figura 2. Firmeza de la pulpa (A) y la cáscara (B) de frutos de papaya “Pococi” para cada tratamiento..	34
Figura 3. Color observado en la cáscara de frutos de papaya “Pococi” para cada tratamiento durante diferentes días de evaluación (0, 5, 7 y 11 días). A. Testigo. B. 1-MCP. C. Etileno	36
Figura 4. Cuantificación relativa del ARNm del gen de la poligalacturonasa en la pulpa de frutos de papaya “Pococi” sometidos a diferentes tratamientos.....	41
Figura 5. Cuantificación relativa del ARNm del gen de la poligalacturonasa en la cáscara de frutos de papaya “Pococi” sometidos a diferentes tratamientos.	42
Figura 6. Cuantificación relativa del ARNm del gen de la endoxilanasas en la pulpa de frutos de papaya “Pococi” sometidos a diferentes tratamientos.....	44
Figura 7. Cuantificación relativa del ARNm del gen de la endoxilanasas en la cáscara de frutos de papaya “Pococi” sometidos a diferentes tratamientos.	45
Figura 8. Cuantificación relativa del ARNm del gen de la pectinesterasa en la pulpa de frutos de papaya “Pococi” sometidos a diferentes tratamientos.....	46
Figura 9. Cuantificación relativa del ARNm del gen de la pectinesterasa en la cáscara de frutos de papaya “Pococi” sometidos a diferentes tratamientos.	48
Figura 10. Cuantificación relativa del ARNm del gen de la expansina en la pulpa de frutos de papaya “Pococi” sometidos a diferentes tratamientos.....	49
Figura 11. Cuantificación relativa del ARNm del gen de la expansina en la cáscara de frutos de papaya “Pococi” sometidos a diferentes tratamientos.	51
Figura 12. Cuantificación relativa del ARNm del gen candidato de la ACC deaminasa en la pulpa de frutos de papaya “Pococi” sometidos a diferentes tratamientos	52
Figura 13. Cuantificación relativa del ARNm del gen de la ACC deaminasa en la cáscara de frutos de papaya “Pococi” sometidos a diferentes tratamientos.	53

Figura 14. Correlación entre los valores de firmeza y acumulación de transcritos del gen de poligalacturonasa en la pulpa (A) y la cáscara (B) de frutos de papaya “Pococi”	56
Figura 15. Correlación entre los valores de firmeza y acumulación de transcritos del gen de endoxilanasasa en la pulpa (A) y la cáscara (B) de frutos de papaya “Pococi”	56
Figura 16. Correlación entre los valores de firmeza y acumulación de transcritos del gen de pectinesterasa en la pulpa (A) y la cáscara (B) de frutos de papaya “Pococi”	57
Figura 17. Correlación entre los valores de firmeza y acumulación de transcritos del gen de expansina en la pulpa (A) y la cáscara (B) de frutos de papaya “Pococi”	58
Figura 18. Correlación entre los valores de firmeza y acumulación de transcritos del gen de la ACC deaminasa en la pulpa (A) y la cáscara (B) de frutos de papaya “Pococi”	58

Lista de anexos

Anexo 1. Tratamiento de los frutos de papaya con 'Etileno'. A. Detalles del generador de etileno. B. Generador de etileno colocado dentro de la segunda cámara de maduración con la fruta a tratar.	95
Anexo 2. Tratamiento de los frutos de papaya con '1-MCP'. A. Distribución de las canastas plásticas con la fruta. B. Ventilador de batería con la solución de 1-MCP. C. Estructura de la cámara hermética. D. Cámara hermética armada.	96
Anexo 3. Determinación de firmeza en frutos de papaya. A. Posición horizontal del fruto en texturómetro. B. Fuerza (N) registrada durante la penetración de un fruto de papaya con el texturómetro digital. Las flechas indican la fuerza máxima para penetrar 15 mm, correspondiente a la firmeza de la cáscara y el promedio de la fuerza de penetración (N) entre los 6 y 9 mm (4 a 6 s) correspondiente a la firmeza de la pulpa, respectivamente.	97
Anexo 4. Determinación de color de la cáscara en frutos de papaya. A. Posición horizontal del fruto sobre apertura. B. Tela negra colocada sobre el fruto.	97
Anexo 5. Determinación de color de la pulpa en frutos de papaya. A. Tamaño del trozo de pulpa colocado sobre apertura. B. Campana negra colocada sobre la pulpa.	98
Anexo 6. Determinación de parámetros químicos. A. pH. B. Sólidos solubles. C. Acidez titulable con NaOH por medio de cambio en el pH.	98
Anexo 7. Resumen del ANDEVA para las variables estudiadas en la pulpa de frutos de papaya "Pococi"	99
Anexo 8. Resumen del ANDEVA para las variables estudiadas en la cáscara de frutos de papaya "Pococi"	99
Anexo 9. Comparación del logaritmo de la expresión relativa de los diferentes genes en la pulpa de frutos de papaya de la variedad "Pococi"	100
Anexo 10. Comparación del logaritmo de la expresión relativa de los diferentes genes en la cáscara de frutos de papaya de la variedad "Pococi"	101

Introducción

La papaya (*Carica papaya* L.) es un cultivo frutal de gran importancia económica a nivel internacional. El fruto de papaya es consumido como fruta fresca en muchos países del mundo y presenta un alto potencial para ser industrializado (Manshardt y Drew, 1998; Teixeira da Silva *et al.*, 2007; Yeh *et al.*, 2007). Costa Rica es un país productor y exportador de frutos de papaya. Actualmente, Costa Rica cuenta con un híbrido de papaya conocido por el nombre de "Pococi", el cual reúne características favorables para su producción y cultivo (Mora y Bogantes, 2004). Según el Consejo Nacional de Producción, para el año 2010, el 60% del área de cultivo a nivel nacional fue sembrada con este híbrido y el total de las exportaciones del cultivo sumaron 1.974.800 kg con un valor de US\$ 1.223.758 (Mora y Bogantes, 2011).

A pesar de la importancia del cultivo y de los esfuerzos en mejoramiento genético, la comercialización de la papaya presenta limitaciones relacionadas con el proceso de maduración. El rápido suavizamiento de los frutos durante la maduración aumenta la susceptibilidad a daños mecánicos y ataques de agentes patógenos, reduciendo su vida poscosecha (Chen *et al.*, 2007). Las pérdidas poscosecha en este cultivo se estiman para Costa Rica en un 30%, de las cuales el 16% corresponde a pérdidas en fincas, 5% a pérdidas durante el transporte y 12% durante la comercialización (Arauz y Mora, 1983; Saborío *et al.*, 2000). Por lo tanto, el estudio, entendimiento y control del proceso de suavizamiento es necesario para incrementar su vida poscosecha.

El suavizamiento de la papaya, así como el de otros frutos, se ha relacionado con la degradación o modificación de paredes celulares por parte de enzimas hidrolasas y de otras proteínas asociadas a la pared celular, así como a la síntesis y sensibilidad de los frutos a la hormona etileno (Chen *et al.*, 2007; Sañudo-

Barajas *et al.*, 2008b; Shiga *et al.*, 2009; Thumdee *et al.*, 2010). Algunas de las enzimas hidrolasas que participan en este proceso son poligalacturonasa, pectin-metilesterasa, glucanasa, endoglucanasa, galactosidasa, xilosidasa y endoxilanasa (Lazan *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2007; Razali *et al.*, 2007; Thumdee *et al.*, 2007 y 2010). Otra proteína de la pared celular que se ha relacionado con el proceso de suavizamiento de frutos de “papaya de montaña” (*Vasconcellea pubescens* A.DC.) mediante la expansión de las paredes celulares, es la expansina (Cosgrove, 2005; Gaete-Eastman *et al.*, 2009). Adicionalmente, algunas enzimas, entre ellas la ACC (ácido 1-amino-ciclopropano-carboxílico) deaminasa, pueden desviar el ACC de la ruta de síntesis del etileno, interrumpir su biosíntesis y retrasar el suavizamiento del fruto (Plett *et al.*, 2009).

A pesar de que se han identificado y aislado algunos genes involucrados en el proceso de suavizamiento de la papaya, entre ellos los de enzimas hidrolasas y el de una proteína expansina (Chen y Paull, 2003; Devitt *et al.*, 2006; Manenoi y Paull, 2007b; Fabi *et al.*, 2009; Gaete-Eastman *et al.*, 2009; Fabi *et al.*, 2010), muchos de los estudios realizados sobre ablandamiento, calidad y efecto de los tratamientos poscosecha en frutos, se enfocan en la medición de la actividad o detección de dichas enzimas y no se reporta ningún estudio de la dinámica de expresión de estos genes durante la maduración de los frutos de papaya “Pococi”. Tampoco se reporta ningún estudio sobre la presencia de una enzima con actividad ACC deaminasa en *C. papaya* ni el aislamiento de su gen correspondiente.

Este estudio pretende incrementar el conocimiento de los patrones de transcripción de genes implicados en el ablandamiento de frutos de *C. papaya* L. (variedad “Pococi”) sometidos a diferentes tratamientos poscosecha, por medio de la técnica de PCR en tiempo real.

Marco teórico

Papaya (*Carica papaya* L.)

La papaya (*C. papaya* L.) es una planta herbácea dicotiledónea perteneciente a la familia Caricaceae. Dentro de esta familia, el género *Carica* comprende a la especie *C. papaya*, la cual se encuentra distribuida en las regiones tropicales y subtropicales del continente americano (Manshardt y Drew, 1998; Kyndt *et al.*, 2005; Teixeira da Silva *et al.*, 2007; Yeh *et al.*, 2007).

Las plantas de papaya constan de un único tallo herbáceo, erecto, con una corona de hojas grandes, lobuladas, de disposición espiral en su extremo superior. Sus flores se agrupan en inflorescencias que se originan en las axilas de las hojas, y pueden ser femeninas, masculinas o hermafroditas. Los frutos de papaya son carnosos y se asemejan a los frutos del melón. Su forma es dependiente de su origen: los frutos provenientes de plantas con flores femeninas son esféricos mientras que los provenientes de plantas hermafroditas son ovalados. Estos últimos son preferidos para el consumo ya que, en relación con los frutos femeninos, presentan menor cantidad de semillas y mayor grosor de la pulpa (Yeh *et al.*, 2007).

Actualmente, la papaya es un cultivo frutal de gran importancia económica a nivel internacional. El fruto de papaya, además de ser consumido como fruta fresca, tiene un gran potencial para ser industrializado, ya que presenta alto contenido de vitaminas y minerales, carotenoides, compuestos volátiles, látex y enzimas proteolíticas, lo cual lo convierte en un cultivo de interés (Manshardt y Drew, 1998; Teixeira da Silva *et al.*, 2007; Yeh *et al.*, 2007, Schweiggert *et al.*, 2011a).

Costa Rica es un país productor y exportador de frutos de papaya, principalmente hacia Canadá, Estados Unidos, Bélgica, Nicaragua y Holanda. Según el Consejo Nacional de Producción, para el año 2011 el 77,92% de las exportaciones totales

se destinaron a Canadá, el 8,99% a Estados Unidos, el 8,67% a diferentes países de Europa y el 4,42% a Nicaragua (CNP, 2012).

A pesar de la importancia del cultivo de la papaya, la comercialización de los frutos presenta gran cantidad de limitaciones fisiológicas relacionadas con su proceso de maduración, lo cual afecta el transporte, almacenamiento y distribución de los mismos. En Costa Rica, las pérdidas poscosecha de papaya se estiman en un 30%, del cual 16% corresponde a pérdidas en las fincas, 5% a pérdidas durante el transporte y 12% durante su comercialización (Arauz y Mora, 1983; Saborío *et al.*, 2000). Por lo tanto, el desarrollo de investigaciones asociadas al proceso de maduración de frutos de papaya es de gran interés (Chen *et al.*, 2007; Yeh *et al.*, 2007).

Maduración de frutos de papaya

El proceso de maduración de frutos involucra una serie de cambios fisiológicos coordinados, que conducen a la abscisión y senescencia de los mismos. La papaya es un fruto climatérico que empieza a madurar cuando aún se encuentra unido a la planta. Su maduración se encuentra asociada al incremento en la respiración celular y producción de etileno (Zhang y Paull, 1990; Purwoko *et al.*, 2002; López-Gómez *et al.*, 2004).

Adicionalmente, los procesos fisiológicos asociados a la maduración de frutos ocasionan cambios en el color, sabor, y textura de la fruta. Así, la papaya cambia progresivamente de color verde a amarillo o naranja, incrementa el contenido de azúcares y se empieza a suavizar la pulpa como consecuencia de la degradación o modificación de las paredes celulares durante el período de maduración (Zhang y Paull, 1990; Cano *et al.*, 1996; Krongyut *et al.*, 2008 y 2009; Shiga *et al.*, 2009).

El rápido suavizamiento del fruto posiblemente aumenta la susceptibilidad a daños mecánicos y ataques por parte de organismos patógenos, reduciendo la

vida poscosecha del mismo. Por lo tanto, el estudio, entendimiento y control del proceso de suavizamiento podría incrementar la vida poscosecha de la papaya (Chen *et al.*, 2007).

El etileno (C_2H_4) es una molécula gaseosa sintetizada en las plantas a partir del aminoácido metionina. Este aminoácido es adenosilado por la enzima S-adenosilmetionina (SAM) sintetasa a SAM y esta es posteriormente convertida en ACC (Figura 1). Este último a su vez es metabolizado a etileno, el cual participa en diversos procesos fisiológicos que ocurren en las plantas, incluyendo muchos de los cambios que ocurren durante la maduración de los frutos (Wang *et al.*, 2002; Handa *et al.*, 2012).

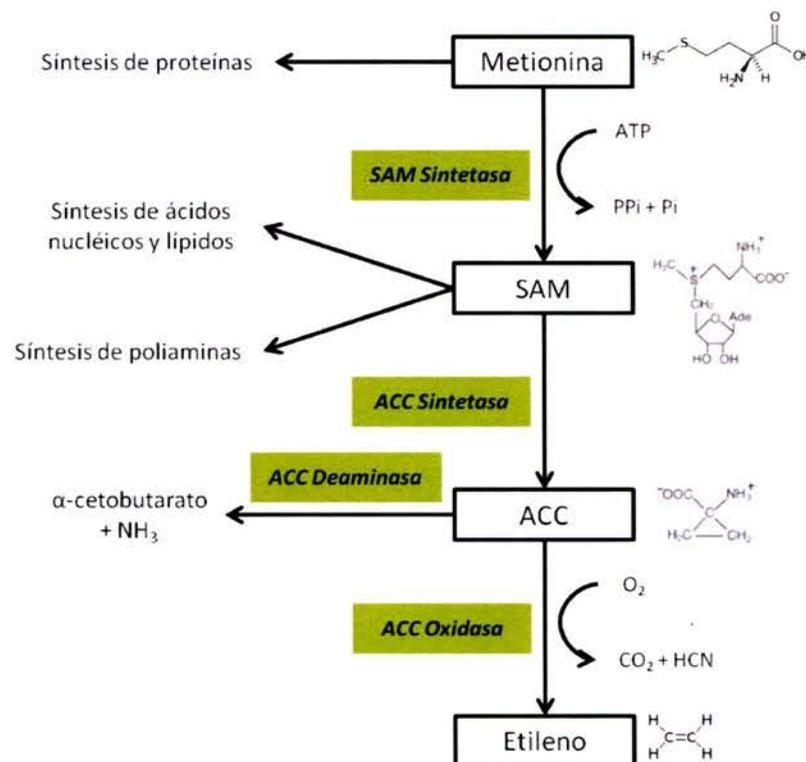


Figura 1. Ruta metabólica para la síntesis del etileno (modificado de Wang *et al.*, 2002).

Para retrasar la maduración e incrementar la vida poscosecha de la papaya se han empleado sustancias que bloquean la percepción del etileno y se han estudiado y caracterizado las enzimas responsables de la síntesis del mismo (ACC sintetasa y ACC oxidasa), con el fin de poder modificar genéticamente esta planta (Neupane *et al.*, 1998; Laurena *et al.* 2002; Magdalita *et al.*, 2002; López-Gómez *et al.*, 2004 y 2009).

Neupane *et al.* (1998) y Laurena *et al.* (2002) realizaron la caracterización molecular de las enzimas ACC sintetasa y ACC oxidasa en papaya, y estudiaron su expresión en relación con la maduración de la fruta. Además, Neupane *et al.* (1998), Laurena *et al.* (2002) y Magdalita *et al.* (2002) transformaron plantas de papaya con una secuencia antisentido de una enzima ACC sintetasa para reducir la síntesis de etileno y retrasar la maduración de los frutos.

López-Gómez *et al.* (2004) secuenciaron un gen que codifica para una enzima ACC oxidasa en papaya y relacionaron su expresión con el proceso de maduración y síntesis de etileno en el fruto. Este grupo confirmó que, durante la maduración de la papaya, se incrementa la síntesis del etileno y ese incremento se asocia con el aumento de la expresión y actividad de la enzima ACC oxidasa. Dicha enzima ha sido objeto de silenciamiento por medio de secuencias antisentido en plantas de papaya, al igual que la ACC sintetasa (López-Gómez *et al.*, 2009).

Recientemente, Ming *et al.* (2008 y 2012) demostraron que en el genoma de *C. papaya* existen como mínimo cuatro genes que codifican para SAM sintetasa, siete genes que codifican para ACC sintetasa, tres genes que codifican para ACC oxidasa y seis genes parecidos a los de ACC oxidasa (conocidos como ACC oxidasa-like). Por lo tanto, la existencia de varios genes en el genoma de *C. papaya* para las enzimas que participan en la síntesis de etileno dificultan la tecnología del silenciamiento de estos genes. Existe evidencia de que al menos dos genes para ACC sintetasa y dos genes para ACC oxidasa se expresan en el

fruto de papaya, en momentos diferentes, y en conjunto contribuyen al proceso de maduración (Mason y Botella, 1997; Chen *et al.*, 2003; López-Gómez *et al.*, 2009).

Purwoko *et al.* (2002) mostraron que la síntesis de etileno y, por tanto, la maduración de frutos de papaya, podían retrasarse mediante su tratamiento con poliaminas. Ellos observaron que el tratamiento de frutos de papaya con espermidina inhibió el ablandamiento del fruto, el cambio de color, la producción de etileno y la actividad de la enzima ACC oxidasa.

También, Moya-León *et al.* (2004) y, más recientemente, Manenoi y Paull (2007a), Nimitkeatkai *et al.* (2008) y Sañudo-Barajas *et al.* (2008a) han logrado retrasar la síntesis de etileno, la maduración y el ablandamiento de frutos de papaya de montaña (*Vasconcellea pubescens*) y de papaya tropical (*C. papaya*) mediante la aplicación de un inhibidor del receptor de etileno en forma temprana a la síntesis de la hormona, denominado 1-metilciclopropeno (1-MCP).

Bron y Jacomillo (2009) estudiaron el efecto del bloqueo de la producción de etileno, mediante tratamientos con 1-MCP y almacenamiento en frío, en la maduración de frutos de papaya del cultivar "Golden" y concluyeron que el ablandamiento del fruto, más que el cambio del color, es dependiente de la producción de esta hormona y que existe una determinada concentración de etileno a la cual la fruta comienza a perder la firmeza y posteriormente continúa ablandándose.

Todo lo anterior ejemplifica los distintos esfuerzos realizados por diversos grupos de investigación para comprender el proceso de ablandamiento de los frutos de papaya, por medio del estudio de las enzimas implicadas en el proceso y sus derivados, con el fin de ampliar el período poscosecha y aumentar la calidad del fruto.

En tomate, se ha estudiado la interferencia de la síntesis de etileno por medio de la expresión de la enzima ACC deaminasa (Klee *et al.*, 1991). Dicha enzima interrumpe la síntesis de etileno ya que convierte a su precursor inmediato: ACC

en ácido α -cetobutírico. Klee *et al.* (1991) transformaron plantas de tomate con el gen de la ACC deaminasa clonado de una cepa bacteriana denominada 6G5 perteneciente al género *Pseudomonas* sp. Las plantas que fueron transformadas produjeron frutos cuya maduración se retrasó significativamente y dichos frutos permanecieron firmes por mucho más tiempo que los frutos de las plantas que no fueron transformadas.

La existencia de genes que codifican para enzimas con actividad ACC deaminasa no sólo ha sido comprobada en gran cantidad de bacterias (Glick, 2005; Glick *et al.*, 2007). Debido al gran avance en la secuenciación genómica de diferentes especies de plantas, se ha descubierto la presencia de secuencias homólogas a las secuencias de los genes bacterianos para la ACC deaminasa en plantas (Plett *et al.*, 2009). En tomate se ha demostrado la existencia de actividad ACC deaminasa y que dicha actividad varía durante la maduración de los frutos, a pesar de que el gen de la enzima no ha sido identificado ni aislado aún, como en el caso de *Arabidopsis thaliana* (Plett *et al.*, 2009). En papaya, no se ha reportado la existencia inherente de actividad ACC deaminasa, tampoco se ha demostrado ni correlacionado dicha actividad enzimática con la maduración de los frutos ni se ha identificado o aislado algún gen que codifique para la enzima.

Estructura de la pared celular en las células vegetales

Para comprender la serie de eventos responsables de los cambios en la textura de los frutos durante el proceso de maduración es necesario comprender la estructura de la pared celular de las células vegetales. La pared de las células vegetales está compuesta principalmente por celulosa (homopolímero de glucosa), hemicelulosas (heteropolímeros de monosacáridos: glucosa, xilosa, galactosa, fucosa y arabinosa), pectinas (homopolímeros de ácido galacturónico llamados homogalacturonanos o heteropolímeros de ácido galacturónico llamados ramnogalacturonanos, con la presencia de otros monosacáridos como ramnosa,

xilosa, galactosa, fucosa, arabinosa, entre otros), proteínas estructurales y lignina (presente en paredes celulares secundarias). Sin embargo, el arreglo y cantidad de estos componentes varía entre las diferentes especies vegetales e incluso entre las células pertenecientes a diferentes tejidos según su estado de desarrollo (Brummell y Harpster, 2001; Wolf *et al.*, 2012).

En paredes vegetales primarias, la celulosa se halla en forma de una red de microfibrillas, que se encuentra unida a las hemicelulosas (xiloganos o arabinoxilanos), bien sea por enlaces covalentes, puentes de hidrógeno o por simple azar durante la síntesis de las microfibrillas de celulosa. A su vez, las hemicelulosas se encuentran unidas a las pectinas (homogalacturonanos o ramnogalacturonanos) y estas últimas se encuentran unidas entre sí por medio de calcio o boro. Durante la fase de crecimiento de las células vegetales, la pared celular se expande gracias a la presencia de grupos metilo en las pectinas (Cosgrove, 2005).

Enzimas responsables del suavizamiento de frutos de papaya

El suavizamiento de la papaya y de otros frutos durante el proceso de maduración se ha relacionado directamente con la degradación o modificación de paredes celulares de la pulpa y la cáscara mediante el análisis de los carbohidratos y polisacáridos presentes en extractos y fracciones de pared celular. Durante la maduración de frutos de papaya se ha demostrado que las pectinas y otros polisacáridos de la matriz de celulosa, que forman las paredes celulares, se solubilizan y depolimerizan fácilmente, debido a la pérdida de enlaces entre azúcares, como arabinosa y galactosa con las pectinas, o los xiloglucanos con la celulosa. El rompimiento de esos enlaces ocasiona que la pared celular se vuelva porosa y, por ende, enzimas que degradan los polisacáridos tengan mayor acceso a ellos, produciendo el ablandamiento de la pared celular. Diversas enzimas hidrolasas y otras proteínas han sido relacionadas con dicho proceso de

ablandamiento (Chen *et al.*, 2007; Shiga *et al.*, 2009; Sañudo-Barajas *et al.*, 2008b; Thumdee *et al.*, 2010).

Las enzimas cuya actividad se ha asociado con el proceso de ablandamiento de los frutos de papaya durante la maduración son: poligalacturonasa, pectin-metilesterasa o pectinesterasa, β -1,4-glucanasa, β -galactosidasa, xilosidasa y endoxilanasas (Chen *et al.*, 2007; Thumdee *et al.*, 2007 y 2010).

Estas enzimas degradan diferentes componentes de la pared celular. Las poligalacturonasas degradan los enlaces galacturónicos de las pectinas. Las pectin-metilesterasas o pectinesterasas remueven los grupos metilo de las pectinas esterificadas. Las glucanasas catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos (β -1,4) de glucanos. Las galactosidasas hidrolizan los residuos galactosil terminales no reductores en galactanos. Las endoxilanasas catalizan la hidrólisis de enlaces internos (β -1,4) de los xilanos y las xilosidasas catalizan la hidrólisis de enlaces terminales (β -1,4) de los xilanos (Thumdee *et al.*, 2007).

Lazan *et al.* (1995) determinaron que los tejidos de frutos de papaya del cultivar "Ekstotika" se suavizan diferencialmente. La parte interna del mesocarpo se suaviza y pierde firmeza rápidamente en comparación con la parte externa. Dicho suavizamiento se correlacionó de forma inversamente proporcional con la actividad de las enzimas β -galactosidasa, pectin-metilesterasa y poligalacturonasa; dado que los frutos perdían su firmeza a medida que aumentaba la actividad catalítica de las enzimas mencionadas.

Thumdee *et al.* (2007 y 2010) estudiaron la actividad enzimática de las hidrolasas pectin-metilesterasa, β -galactosidasa, endoglucanasa, endoxilanasas, β -xilosisidasa y poligalacturonasa, durante la maduración de frutos de *C. papaya* L. cv. "Sunset" y su relación con el proceso de suavizamiento en frutos tratados y no tratados con 1-MCP. Como resultado, lograron correlacionar de manera inversamente proporcional la actividad de las enzimas β -galactosidasa, endoglucanasa, endoxilanasas y β -xilosisidasa con el ablandamiento de los frutos no tratados con 1-

MCP. A medida que los frutos se ablandaban, la actividad enzimática de dichas enzimas era mayor y viceversa. Sin embargo, no lograron correlacionar la actividad de la poligalacturonasa con el ablandamiento de los frutos. A medida que los frutos se ablandaban, la actividad de la poligalacturonasa permaneció relativamente constante, tanto en los frutos tratados con 1-MCP como en los no tratados. Por otro lado, los investigadores encontraron que la actividad enzimática de la pectin-metilesterasa, parecía ser mayor en frutos tratados con 1-MCP que en frutos no tratados. Adicionalmente, confirmaron que la actividad de la enzima endoxilanasas era totalmente suprimida en los frutos tratados con 1-MCP y que dicha enzima es clave durante el proceso de ablandamiento de los frutos.

Razali *et al.* (2007) evaluaron la calidad de frutos de papaya del cultivar "Sekaki" en cuanto a peso, firmeza, contenido de ácido ascórbico y actividad de las enzimas α -galactosidasa, β -galactosidasa y pectin-metilesterasa durante el proceso de maduración. Ellos determinaron que la firmeza comenzaba a disminuir rápidamente una vez que el fruto presentaba un 50% de amarillamiento. Además, que la actividad de la α -galactosidasa comenzaba a incrementar exponencialmente cuando el fruto presentaba un 25% de amarillamiento, mientras que la actividad de las enzimas β -galactosidasa y pectin-metilesterasa incrementaba exponencialmente cuando el fruto presentaba un 50% de amarillamiento. Los resultados anteriores sugieren que las diferentes enzimas contribuyen al suavizamiento del fruto de papaya e influyen en la calidad del mismo.

Manenoi y Paull (2007b) cuantificaron la expresión del gen que codifica para la enzima endoxilanasas, la cantidad de enzima presente y su actividad, en cultivares de papaya con diferentes patrones de ablandamiento del fruto, así como en frutos tratados con 1-MCP. Los diferentes cultivares presentaron un patrón de expresión similar para el gen de la enzima, así como, cantidad de enzima y actividad. Durante el proceso de maduración, la expresión del gen de la endoxilanasas, la

cantidad de enzima producida y su actividad aumentaron. Sin embargo, lo anterior no se observó en los frutos tratados con 1-MCP.

Una proteína sin actividad catalítica que ha sido asociada con el proceso de ablandamiento de la pared celular de frutos de papaya de montaña (*Vasconcellea pubescens*) durante la maduración es la expansina (Gaete-Eastman *et al.*, 2009). Esta proteína induce la expansión y relajación de las paredes celulares mediante la interrupción de puentes de hidrógeno entre las microfibrillas de celulosa y otros polisacáridos de la pared (hemicelulosas y pectinas), permitiendo el acceso de diferentes enzimas hidrolasas a sus diferentes sustratos (Cosgrove, 2005; Gaete-Eastman *et al.*, 2009). Gaete-Eastman y colaboradores (2009) secuenciaron un gen de expansina en *V. pubescens*, estudiaron su expresión durante la maduración del fruto y su relación con la producción de etileno. El grupo concluyó que este gen se expresaba durante el proceso de maduración como respuesta a la síntesis de etileno y, por ende, participaba en el ablandamiento del fruto. Sin embargo, estos resultados no han sido confirmados en *C. papaya* L.

Actualmente, muchos de los estudios realizados acerca del ablandamiento y calidad de frutos de *C. papaya* L. se enfocan en la medición de la actividad o detección de las enzimas hidrolíticas responsables de la degradación de la pared celular y la determinación del grado de firmeza de los frutos. A pesar de que se han identificado genes involucrados en el proceso de maduración de papaya, entre ellos los de las enzimas hidrolasas de la pared celular (Devitt *et al.*, 2006), y se ha estudiado la transcripción de algunos de estos genes en las variedades de papaya "Golden" (Fabi *et al.*, 2009, 2010 y 2012) y "Sunset" (Manenoi y Paull, 2007b), no se encontró información documentada acerca del estudio de la dinámica de transcripción de los genes que codifican dichas enzimas durante el proceso de maduración del fruto de papaya "Pococi", por lo que, al tratarse de variedades diferentes, podrían existir diferencias en la dinámica de expresión asociadas al genotipo.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real

En general, una PCR origina múltiples copias de fragmentos específicos de ADN o ADNc molde de interés en forma exponencial, hasta que se ve limitada por reactivos (ADN o ADNc, nucleótidos, cebadores, enzimas, producción de moléculas de pirofosfato, entre otros). El producto obtenido de las reacciones puede ser determinado al finalizarse la reacción o durante la reacción, dependiendo de la técnica de PCR utilizada (Ginzinger, 2002).

Si la técnica de PCR empleada es la de tiempo real, puede medirse la cantidad de productos que se acumulan mientras la reacción se encuentra en fase exponencial, sin importar la cantidad de productos finales obtenidos en la reacción. No ocurre lo anterior con la técnica de PCR de tiempo final. Sólo durante la fase exponencial de la reacción puede extrapolarse la cantidad de ADN o ADNc molde que dio origen a los productos con PCR en tiempo real (Ginzinger, 2002; Wong y Medrano, 2005).

La cuantificación de los productos, en tiempo real, se realiza por medio de la medición de fluorescencia emitida por una sonda específica para el ADN o ADNc de interés (por ejemplo, TaqMan®) o por moléculas que producen la tinción del ADN doble banda contenido en la reacción (por ejemplo, SYBR Green). Para ello se define un límite de fluorescencia, conocido como "umbral". Todas las muestras deben alcanzar dicho nivel para poder ser comparadas y cuantificadas. El "umbral" se calcula en función de la fluorescencia de fondo emitida, es decir, corresponde al punto en la cual la fluorescencia emitida por los productos generados durante la fase exponencial es significativamente mayor a la fluorescencia de fondo. La cantidad de ciclos en la cual las muestras alcanzan este punto se denomina Ct. El Ct es directamente proporcional a la cantidad de ADN o ADNc diana inicial de la reacción, es decir, el ADN o ADNc de interés presente en una muestra. De esta forma, si se conoce el Ct de cada muestra y se tiene un patrón de concentración conocida, se puede cuantificar el ADN o ADNc

de interés contenido en ellas, o bien compararse entre diferentes muestras o tratamientos, por lo cual la técnica es bastante útil para la cuantificación de ADN o ADNc y medición de la acumulación de transcritos (Ginzinger, 2002; Wong y Medrano, 2005).

En resumen, la emisión de fluorescencia durante la fase exponencial de la reacción de PCR en tiempo real equivale a la concentración del material inicial (ADN o ADNc) incorporado a la reacción, lo cual permite la cuantificación inicial de ADN o ADNc del cual se sintetizan los productos de PCR con bastante exactitud a partir de los valores de "Ct" y por tanto permite cuantificar los niveles de expresión génica de los transcritos presentes en las muestras (Gachon *et al.*, 2004; Pfaffl, 2004; Bustin *et al.*, 2005; Deepak *et al.*, 2007).

La cuantificación realizada por medio de la técnica de PCR tiempo real para medir la expresión o transcripción génica puede ser de dos tipos: absoluta o relativa. La cuantificación absoluta se realiza con base en una curva estándar o diluciones de concentraciones conocidas de ADN genómico o recombinante, ARN o ARN recombinante, productos de RT-PCR, entre otros. La cuantificación relativa se realiza con base en una muestra control o de calibración y genes endógenos cuya expresión es necesaria y casi constante en casi todas las células (como los genes de GAPDH, albumina, actina, tubulina, ciclofilina, microglobulina y ARNr 18S o 28S). La cuantificación relativa es más utilizada para estudiar la expresión génica (Volkov *et al.*, 2003; Brunner *et al.*, 2004; Pfaffl, 2004).

Independientemente del tipo de cuantificación a emplear, la técnica de PCR en tiempo real para cuantificar expresión génica involucra la extracción de ARN, su cuantificación y purificación (tratamiento con DNasas), la normalización de su concentración, retrotranscripción a ADNc, optimización de la reacción de PCR para los genes que se desean analizar, cuantificación de los amplicones y análisis de resultados (Bustin, 2000; Pfaffl, 2004).

Antecedentes y Justificación

Mediante un programa de mejoramiento genético de papaya llevado a cabo por el Instituto Nacional de Innovación y Transferencia de Tecnología (INTA) del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) y la Universidad de Costa Rica (UCR), se desarrolló el híbrido de papaya "Perfecta", también conocido como "Pococi". El híbrido "Pococi" se obtuvo mediante el cruce entre una variedad de papaya hawaiana "Sunrise Solo" y una variedad criolla. Dicho híbrido reúne características favorables, tanto para su producción como para su consumo. Por ello, desde que se implementó la producción y comercialización de la papaya "Perfecta", la productividad, exportación y el consumo de la fruta ha incrementado a nivel nacional (Mora y Bogantes, 2004).

Así, a pesar de que Costa Rica es un país pequeño y posee aproximadamente 0,2% del territorio nacional destinado a la producción de papaya, la productividad registra valores más altos que el promedio mundial. Para el 2005, Costa Rica registró una productividad de 59,673 toneladas por ha, y para el año 2010, 71,325 toneladas por ha. De hecho, la productividad promedio calculada para Costa Rica entre los años 1992 y 2010 fue de 53,04 toneladas por ha, la segunda más alta a nivel mundial. Sin embargo, dicho valor continúa fluctuando con el tiempo, dependiendo de diversos factores, entre ellos las pérdidas poscosecha (Umaña *et al.*, 2011; FAO, 2011).

Debido a que las pérdidas poscosecha del cultivo de papaya se deben principalmente al suavizamiento acelerado de la fruta, sería de gran importancia identificar los genes que participan específicamente en el ablandamiento de la pared celular durante la maduración del fruto de papaya del cultivar "Pococi". Actualmente, existen pocas investigaciones relacionadas con expresión génica durante la maduración de frutos de papaya que puedan tomarse como referencia para la realización de este estudio (Chen *et al.*, 2007; Yeh *et al.*, 2007).

Fabi *et al.* (2010) dilucidaron la expresión diferencial de distintos genes involucrados en el proceso de maduración de frutos de papaya del cultivar "Golden" sometidos a un tratamiento con etileno (100 ppm). Por medio de la técnica de ADNc-AFLP, los investigadores identificaron 1200 transcritos, de los cuales 350 se expresaban diferencialmente entre frutos sometidos al tratamiento con etileno y los que no. De los 350 transcritos anteriores únicamente se lograron clonar y secuenciar 185; y de éstos últimos únicamente se pudieron identificar 71 por medio de un alineamiento con secuencias existentes en bases de datos. De los transcritos identificados, únicamente cuatro correspondieron a proteínas relacionadas con la pared celular, entre ellas la enzima pectin-metilesterasa. Sin embargo, los 67 transcritos restantes correspondieron a proteínas relacionadas con la síntesis de etileno, estrés, defensa, factores de transcripción, metabolismo primario y secundario, entre otras funciones.

A pesar de que pocos genes identificados por Fabi *et al.* (2010) correspondieron a proteínas relacionadas con modificaciones de la pared celular, ellos observaron que la expresión del gen de la pectin-metilesterasa se reprimía durante la maduración de los frutos de papaya tratados con etileno a diferencia de aquellos que no, lo cual podría ser un indicio de que dicha enzima no se encuentra bajo el control directo de esta hormona durante la maduración de los frutos. Estos resultados concuerdan con los resultados reportados por Thumdee *et al.* (2007 y 2010) respecto a la actividad enzimática de la pectin-metilesterasa determinada durante la maduración de frutos de papaya del cultivar "Sunset" tratados con 1-MCP. Sin embargo, no sucede lo mismo con los resultados de actividad enzimática obtenidos en los cultivares "Eksotika" o "Sekaki", lo cual es indicio de que la pectin-metilesterasa juega un papel diferencial en la pérdida de firmeza de los frutos de distintas variedades de papaya (Lazan *et al.*, 1995; Razali *et al.*, 2007). Por ello es fundamental estudiar la expresión del gen de dicha enzima en frutos de papaya de otros cultivares, como en el caso del híbrido "Pococi".

En la base de datos del GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information, por sus siglas en inglés) se ha reportado la secuencia de un transcrito que codifica para la enzima pectin-metilesterasa de *C. papaya* con el número de accesión Y07899.1 (Gouveia *et al.*, sin publicar). Dicho transcrito fue identificado en frutos de papaya, por lo que podría ser utilizado para el estudio de la expresión del gen en frutos de papaya "Pococi" y correlacionarse con la pérdida de firmeza en el fruto para este cultivar.

El estudio realizado por Fabi *et al.* (2010) tampoco hace referencia a la expresión de genes de las enzimas poligalacturonasa y endoxilanasas, que han sido relacionadas con la pérdida de firmeza en frutos de papaya por otros grupos de investigadores (Lazan *et al.*, 1995; Thumdee *et al.*, 2007 y 2010).

Fabi *et al.* (2009) lograron aislar y clonar el transcrito del gen que codifica para la enzima poligalacturonasa de frutos de papaya del cultivar "Golden" y reportaron su acumulación y expresión durante la maduración de frutos de papaya sometidos a tratamientos con etileno y 1-MCP, utilizando un análisis de Northern blot. Adicionalmente, los investigadores lograron correlacionar la expresión de dicho gen, con la actividad enzimática y la pérdida de firmeza de los frutos, con lo cual concluyeron que el gen que codifica para la enzima poligalacturonasa podría ser un candidato importante a manipulación genética para controlar el suavizamiento y la pérdida de firmeza de los frutos.

El gen que codifica para la enzima poligalacturonasa y el transcrito correspondiente a dicha enzima se encuentran también reportados para los frutos de *C. papaya* en la base de datos del GenBank del NCBI con los números de accesión FJ007645.2 y FJ007644.1, respectivamente (Fabi *et al.*, 2009). Otros transcritos identificados en frutos de papaya correspondientes a enzimas poligalacturonasas se encuentran reportados en la base de datos del NCBI con los números de accesión GQ479796.1, GQ479795.1, GQ479794.1 y AJ505750.1.

Sin embargo, no existen publicaciones acerca de la acumulación o expresión de dichos transcritos y su correlación con la pérdida de firmeza de frutos de papaya.

Manenoi y Paull (2007b) estudiaron la expresión del transcrito que codifica para la enzima endoxilanasas en frutos de papaya de diferentes cultivares ("Line 8", "Line 4-16" y "Sunset") por medio de la técnica de Northern blot, basados en la clonación, caracterización e identificación del transcrito que realizaron Chen y Paull (2003). En los dos trabajos también se logró correlacionar la expresión y acumulación del gen de la endoxilanasas con la pérdida de firmeza de los frutos de papaya; por tanto, puede utilizarse la secuencia reportada en la base de datos GenBank del NCBI, cuyo número de acceso es AY138968.1, como base para el estudio de la expresión del gen de la endoxilanasas en frutos del cultivar "Pococi", ya que existen publicaciones que reportan a dicha enzima como un factor clave responsable del suavizamiento o pérdida de firmeza en el fruto (Thumdee *et al.*, 2007 y 2010).

Fabi *et al.* (2010) tampoco hacen referencia a proteínas involucradas en modificaciones a la pared celular, como lo son las expansinas. Gaete-Eastman *et al.* (2009) han identificado la participación de dicha proteína en la maduración de frutos de papaya de montaña (*Vasconcellea pubescens*) y han correlacionado la expresión del transcrito de dicha proteína y su actividad con la pérdida de la firmeza de los frutos. En la base de datos GenBank del NCBI existe reportada una proteína de la familia de las expansinas identificada en el fruto de *C. papaya*, cuyo número de acceso es el DQ321829.2 (Niu *et al.*, sin publicar). No existen publicaciones conocidas donde se relacione la expresión del transcrito de esta proteína con la pérdida de firmeza de los frutos de papaya, por tanto el estudio de los niveles de expresión de dicha expansina en el fruto de papaya de la variedad "Pococi" es innovador y puede esclarecer la participación de la proteína en el suavizamiento de los frutos.

Finalmente, en la base de datos de GenBank del NCBI tampoco se reporta el aislamiento de ningún gen que codifique para la enzima ACC deaminasa en *C. papaya*. El estudio de la existencia de secuencias homólogas al gen de la ACC deaminasa descubierto en *Arabidopsis*, así como la evaluación de la expresión de dichos genes homólogos durante la maduración de los frutos de papaya, ofrecería posteriormente la posibilidad de controlar la síntesis de etileno y retrasar así el ablandamiento de frutos de papaya por medio técnicas de transformación genética.

En conclusión, este estudio incrementará el conocimiento de los patrones de expresión de los genes implicados en el ablandamiento del fruto de *C. papaya* de la variedad "Pococi", lo cual a su vez puede permitir comparar los patrones de expresión entre diferentes cultivares y contribuir con la búsqueda de marcadores moleculares ligados a los genes de interés para la producción de nuevas variedades comerciales de papaya cuya vida poscosecha sea mayor. La información generada por esta investigación también podrá ser utilizada para el desarrollo de otras investigaciones (como parte de programas de mejoramiento genético de papaya), en las cuales los genes responsables del ablandamiento o fortalecimiento de la fruta puedan ser silenciados o inducidos, respectivamente, por medio de tecnologías similares a las empleadas para silenciar los genes de las enzimas responsables de la síntesis de etileno u otras técnicas de transformación genética, y así, originar una nueva tecnología para reducir las pérdidas poscosecha, retrasando la degradación de las paredes celulares.

Objetivos

Objetivo general

Determinar el patrón de expresión de los genes involucrados en el suavizamiento de los frutos de papaya del híbrido "Pococi" durante el proceso de maduración y en relación con la aplicación de tratamientos poscosecha.

Objetivos específicos

1. Cuantificar la expresión de los genes relacionados con el suavizamiento de frutos de papaya durante las etapas finales del proceso de maduración, mediante PCR en tiempo real.
2. Comparar el patrón de expresión de los genes involucrados en el suavizamiento de frutos de papaya entre diferentes tratamientos poscosecha.
3. Correlacionar la expresión de los genes implicados en el suavizamiento con el cambio en el grado de firmeza de los frutos.

Materiales y métodos

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica, San Pedro, Montes de Oca, con la colaboración del Laboratorio de Tecnología Poscosecha del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) y el Laboratorio de Química de Alimentos de la Escuela de Tecnología de Alimentos de la misma universidad.

Se llevaron a cabo dos experimentos. El primero (Ensayo I) consistió en la cuantificación relativa y comparación de la acumulación de transcritos de los genes relacionados con el suavizamiento de frutos de papaya (durante las etapas finales del proceso de maduración) sometidos a diferentes tratamientos poscosecha. Mientras que el segundo (Ensayo II) consistió en determinar la correlación de la acumulación de transcritos de los genes implicados en el suavizamiento con el cambio en el grado de firmeza de los frutos.

Ensayo I

Material vegetal

En octubre del 2011 se seleccionaron aproximadamente 150 frutos de papaya (*C. papaya* L.) del híbrido "Pococí" de un mismo lote de producción en la empacadora del "Centro Agrícola Cantonal de Guácimo" (Limón, Costa Rica) con grado de madurez "1" (10% de área amarilla en cáscara, Umaña *et al.*, 2011), de tamaño similar (frutos medianos, entre 1,0 y 1,2 kg; 20 a 24 cm de largo y 15 a 18 cm de diámetro) y sin daños físicos aparentes. Cada uno de los frutos se envolvió en varias hojas de papel periódico y se colocaron en canastas plásticas para ser transportados hasta el Laboratorio de Tecnología Poscosecha del CIA.

Tratamientos poscosecha

Todos los frutos se desinfectaron por inmersión en una solución de cloro (Cloro, Lemen de Costa Rica S.A., San José, Costa Rica) a 100 ppm durante 1 min. Posteriormente, se trataron por inmersión durante 1 min con una solución de fungicidas: Mirage[®] 45 EC (Procloraz, Makhteshim Chemical Works Ltd., Beer Sheva, Israel) a 250 ppm y Mertect[®] 50 SC (Tiabendazol, Syngenta S.A., Bogotá, Colombia) a 250 ppm, sin utilizar adherentes. Una vez desinfectados, los frutos se dejaron secar y se almacenaron en una cámara de maduración (temperatura entre 18 y 20°C). Cuando los frutos alcanzaron un grado de madurez entre “1-2” (10-15% de área amarilla en cáscara, Umaña *et al.*, 2011), fueron divididos en tres grupos (de aproximadamente 50 frutos cada uno): 1. Grupo sin tratar o ‘Testigo’, 2. Grupo tratado durante 21 horas con 275-300 ppm de ‘Etileno’ gaseoso, 3. Grupo tratado durante 21 horas con 300 nL/L ó 300 ppb de ‘1-MCP’ gaseoso (SmartFresh[™] 0,14% Technology, AgroFresh Inc. y Rohm and Haas Company, Spring House PA 19477-0904, Estados Unidos de América).

Se incluyeron los tratamientos ‘Etileno’ y ‘1-MCP’ en este estudio para identificar si los genes seleccionados se transcriben en forma dependiente o independiente de la ruta de señalización del etileno, ya que el ‘1-MCP’ impide la transcripción de los genes que responden a esta hormona mediante el bloqueo de su receptor; así como para identificar cuáles de los genes estudiados son determinantes para la pérdida o para el mantenimiento de la firmeza de los frutos.

El grupo de frutos sin tratar permaneció dentro de la primera cámara de maduración (temperatura entre 18 y 20°C), mientras se realizaron los otros dos tratamientos. El tratamiento con etileno se realizó en una segunda cámara de maduración (temperatura entre 18 y 20°C), utilizando un generador de etileno para deshidratar 500 ml de etanol (ARCO Ethylene Generator Model #100, American Ripener Company Inc., Charlotte NC 28217, Estados Unidos de América). El generador fue programado en descarga constante para un ciclo lento

(30 horas) y fue colocado dentro de la cámara de maduración con la fruta a tratar (Anexo 1). El tratamiento con 1-MCP se llevó a cabo en una cámara hermética de 400 m³ (hecha con tubos de PVC y cubierta de plástico) a temperatura ambiente, dentro de la cual se colocaron seis canastas plásticas con frutos de papaya sobre una repisa de madera. Dentro de la cámara se colocó la solución de ácido cítrico con '1-MCP' y dos ventiladores portátiles a batería para distribuir el gas a toda la cámara (Anexo 2).

Una vez realizados los tratamientos, se ventilaron las cámaras por aproximadamente una hora y se colocaron los frutos pertenecientes al tratamiento con '1-MCP' y los frutos 'Testigo' en una misma cámara de maduración (temperatura entre 18 y 20°C), mientras que los frutos tratados con 'Etileno' permanecieron en la segunda cámara de maduración bajo las mismas condiciones durante todo el período de evaluación, ya que podrían afectar la maduración de los otros frutos, principalmente del 'Testigo', mediante producción autocatalítica de etileno. Por el contrario, se esperaba que el tratamiento '1-MCP' no afectara al 'Testigo' en cuanto a producción catalítica de etileno; ni viceversa.

Parámetros físicos de maduración: firmeza y color

A los 0, 3, 5, 7 y 11 días posteriores al tratamiento, se determinó la firmeza y el color de la cáscara y de la pulpa de cinco frutos pertenecientes a cada tratamiento. Para ello, los frutos seleccionados aleatoriamente fueron trasladados al Laboratorio de Química de Alimentos de la Escuela de Tecnología de Alimentos.

La firmeza se midió utilizando un texturómetro digital (TA-TX Plus Texture Analyzer, Stable Micro Systems LTD., Godalming, Reino Unido) equipado con una punta cilíndrica (2 mm de diámetro) que penetró una distancia de 15 mm de profundidad sobre el fruto, a una velocidad de 1,5 mm/s. La medición de firmeza se realizó sobre cada uno de los carpelos del fruto, en la zona ecuatorial y por

duplicado como se describe en Schweiggert *et al.* (2011b). La firmeza de la cáscara correspondió a la fuerza máxima (N) registrada para penetrar los 15 mm; mientras que la firmeza de la pulpa correspondió a un promedio de la fuerza de penetración (N) entre los 6 y 9 mm ó 4 y 6 s (Anexo 3).

El color se midió, tanto en la cáscara como en la pulpa, con un colorímetro digital ColorFlex[®] (Hunterlab, Hunter Associates Laboratory Inc., Reston VA 20190, Estados Unidos de América) en la escala CIElab (L*, a* y b*) utilizando una iluminación D65 y un ángulo de observación de 10°. Para la medición del color sobre la cáscara, se colocó cada fruto en posición horizontal sobre la apertura del colorímetro y se cubrió con una tela de color negro. Sobre cada fruto se realizaron tres mediciones de color, rotando el fruto tres veces sobre un mismo punto para obtener un promedio de cada medición (Anexo 4). Para la medición del color en la pulpa, los frutos se cortaron por la mitad y de cada mitad se sacó un trozo de pulpa (5 cm de diámetro y aproximadamente 1 cm de grosor). Los trozos de pulpa fueron colocados sobre la apertura del colorímetro y se cubrieron con una campana negra. A cada trozo de pulpa se le determinó el color por triplicado, para obtener un promedio correspondiente a cada mitad (Anexo 5).

Parámetros químicos de maduración: pH, sólidos solubles y acidez

Al inicio y al final del período de evaluación (0 y 11 días posteriores al tratamiento), se determinaron los parámetros pH, sólidos solubles y acidez titulable en la pulpa de cinco frutos para cada tratamiento. Para ello los frutos seleccionados aleatoriamente fueron trasladados al Laboratorio de Química de Alimentos de la Escuela de Tecnología de Alimentos, donde se licuaron 300 gramos de pulpa de cada fruto y a partir del licuado se realizaron las determinaciones por triplicado para cada muestra.

El pH se determinó utilizando un pHmetro (Corning pH meter 430, Corning Incorporated y Nova Analytics Corporation, Woburn MA 01801, Estados Unidos

de América) según lo descrito por el método oficial 981.12 de la Association of Official Analytical Chemists por sus siglas en inglés (AOAC, 2005) (Anexo 6A). Los sólidos solubles se determinaron utilizando un refractómetro digital (AR200 Digital Refractometer, Reichert Technologies, Depew NY 14043, Estados Unidos de América) según lo descrito por el método oficial 932.12 (AOAC, 2005). Para ello, se colocó una punta de espátula del licuado en el lector del refractómetro (Anexo 6B). La acidez titulable se determinó como porcentaje de ácido cítrico por medio de titulación con una solución de NaOH (0,1377 N) de una dilución preparada de cada muestra (100 g de licuado en 100 ml de agua destilada) según lo descrito por el método oficial 942.15 (AOAC, 2005). La titulación se realizó hasta que el pH de la dilución alcanzara un pH de 8,0 (Anexo 6C) y se calculó el porcentaje de acidez con la ecuación:

$$\% \text{ ácido cítrico} = \frac{\text{ml de NaOH} \times \text{normalidad de NaOH (N)} \times 0,064 \times 100}{\text{peso de la muestra (g)}}$$

Extracción de ARN

A los 0, 3, 5, 7 y 11 días posteriores al tratamiento se tomaron muestras de cáscara y pulpa de cinco frutos adicionales de cada tratamiento para realizar la extracción de ARN, ya que los ensayos para la determinación de los parámetros físicos y químicos fueron destructivos y podrían haber acelerado la rapidez de degradación del ARN presente en las muestras o influenciado la expresión de los genes estudiados.

Para ello, los frutos seleccionados aleatoriamente fueron trasladados al Laboratorio de Biotecnología del CIGRAS. Las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido (-196°C) y se maceraron por separado hasta que se obtuvo un polvo fino. Se pesaron 150 mg del macerado vegetal para realizar la extracción de ARN según las instrucciones del kit RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Dusseldorf, Alemania). El volumen de resuspensión utilizado fue de 50 µl

(el volumen se hizo pasar dos veces por el filtro de las columnas). El ARN extraído se almacenó a -80°C hasta utilizarse.

Purificación del ARN extraído

Una vez extraído el ARN, se purificó por medio de un tratamiento con desoxirribonucleasa. Para ello se utilizó el kit de la enzima DNase I (Fermentas, Vilna, Lituania). A cada muestra se agregaron $3\ \mu\text{l}$ de buffer de reacción 10X, $3\ \mu\text{l}$ de la enzima DNase I y $4\ \mu\text{l}$ de agua libre de nucleasas (Fermentas, Vilna, Lituania). Las muestras se incubaron durante 30 min a 37°C en agitación (500 rpm). Transcurrido el período de incubación, se agregaron $3\ \mu\text{l}$ de EDTA (25 mM, Fermentas, Vilna, Lituania). Las muestras se incubaron durante 10 min a 65°C en agitación (500 rpm). Las muestras de ARN tratadas con DNase I, se mantuvieron a -20°C hasta utilizarse.

Para evaluar la calidad y pureza del ARN extraído y sometido al tratamiento con DNase I se realizó una electroforesis en gel de agarosa (1%) con buffer TBE 1X (Tris-borato-EDTA) durante 40 min a 80 V. El gel de agarosa se tiñó con GelRed 10000X (Biotium, Hayward, CA, Estados Unidos de América) utilizando $2\ \mu\text{l}$ del reactivo por cada 50 ml de gel. En cada pozo del gel se cargaron $7\ \mu\text{l}$: $5\ \mu\text{l}$ de cada muestra de ARN y $2\ \mu\text{l}$ de Loading dye 6X (Fermentas, Vilna, Lituania). Como marcador de peso molecular, se emplearon $7\ \mu\text{l}$ de RiboRuler™ High Range RNA Ladder (Fermentas, Vilna, Lituania). Una vez terminada la electroforesis, el gel se observó en un transiluminador de luz UV (UVITEC, Cambridge, Reino Unido) y se tomó una foto al gel.

Cuantificación del ARN extraído y purificado

El ARN de todas las muestras tratadas con DNase I se cuantificó por espectrofotometría con un nanofotómetro NanoPhotometer™ Pearl (Implen

GmbH, Munich, Alemania). La concentración de cada una de las muestras se midió en ng/μl y se determinó su pureza por medio de la relación A_{260}/A_{280} . El ARN extraído de muestras de pulpa se ajustó a una concentración de 20 ng/μl para realizar la retrotranscripción, mientras que el ARN de la cáscara se ajustó a 50 ng/μl.

Obtención de ADNc a partir de ARN

Para la obtención del ADNc a partir del ARN se realizó la retrotranscripción de todas las muestras de ARN purificados con el RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Vilna, Lituania). Para ello, se colocó en tubos Eppendorf (1,5 ml) un volumen equivalente a 0,2 y 0,5 μg de ARN total (de muestras de ARN de pulpa y cáscara, respectivamente), 1 μl de una solución de cebadores Random Hexamer Primer (100 μM) y agua libre de nucleasas (Fermentas, Vilna, Lituania) hasta completar un volumen de 12 μl. Los tubos se incubaron por 5 min a 65°C e inmediatamente después fueron colocados en hielo, para añadirles, en orden: 4 μl del buffer de reacción (5X), 1 μl de inhibidor de ribonucleasa Ribolock™ RNase Inhibitor (20 U/μl), 2 μl de una mezcla de dNTP's (10 mM) y 1 μl de la enzima retrotranscriptasa RevertAid™ H Minus M-MuIV (200 U/ μl). Una vez añadida la enzima, se incubaron los tubos por 5 min a 25°C, por 60 min a 42°C y finalmente 5 min a 70°C, para luego colocar las muestras en hielo. Una vez finalizada la retrotranscripción, las muestras se almacenaron a -80°C hasta utilizarse.

Evaluación de acumulación de transcritos por medio de PCR en tiempo real

La acumulación de transcritos de los genes: poligalacturonasa (GenBank: FJ007644.1), pectinesterasa (GenBank: Y07899.1), endoxilanasas (GenBank: AY138968.1), expansina (GenBank: DQ321829.2) y un gen candidato para la ACC deaminasa ('*evm.TU.supercontig_7.143*' en Phytozome v9.1:

<http://www.phytozome.net/>) se determinó según la metodología descrita por Pfaffl (2004) para cada uno de los tratamientos durante los días 0, 3, 5, 7 y 11; utilizando como gen endógeno el gen de la actina (GenBank: AY906938) y como calibrador las muestras del día 0 sin tratar.

Los cebadores utilizados para cuantificar los niveles de ARNm de cada uno de los genes se diseñaron utilizando el programa Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Las especificaciones para el diseño y la selección de los cebadores fueron (Dorak, 2006; Yuryev, 2007):

- 1- Amplificación de regiones compartidas por el ADNc y el ADN (exones), debido a que la optimización de las reacciones de PCR en tiempo real (para cuantificación de transcritos) se facilitan si se realizan con ADN de concentración conocida; ya que del ADNc generado a partir de ARN es difícil conocer con exactitud su concentración (dependerá de la eficiencia de la reacción de retrotranscripción y de la cantidad de ADNc del gen en cuestión presente en la muestra). Para ello, las secuencias de ARN de los distintos genes descritos en la base de datos del NCBI, fueron comparadas contra secuencias de ADN del genoma de papaya de la base de datos Phytozome v5.0 (<http://www.phytozome.net/>). Regiones compartidas por el ARN y el ADN fueron las regiones seleccionadas para el diseño de los imprimadores.
- 2- Longitud de cada cebador (forward y reverse): entre 16 y 28 nucleótidos o bp.
- 3- Longitud del producto de PCR: entre 100 y 250 bp.
- 4- Contenido de GC en cebador (pares de Guanina-Citosina): entre 35 y 65%, ya que un bajo contenido de GC podría incrementar la amplificación inespecífica o producir uniones muy débiles del cebador con el ADNc.
- 5- Temperatura de alineamiento (T_m): similar entre los pares de imprimadores y cercana a los 60°C.

De los pares de cebadores sugeridos por el programa Primer3Plus, se seleccionaron aquellos con longitud de 20 bp, menor diferencia entre los valores

de Tm, contenido de GC de 50%, y productos cercanos o menores a 200 bp. Dichos pares de imprimadores, fueron alineados contra las secuencias de los genes correspondientes para verificar su especificidad y corroborar el tamaño los productos. Para ello se empleó el programa BioEdit Sequence Alignment Editor (versión 7.0.5.3) y la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, por sus siglas en inglés) de la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Los cebadores utilizados para la amplificación del gen de la actina (GenBank: AY906938) de papaya por medio de PCR en tiempo real, fueron los descritos por McCafferty *et al.* (2008) y por lo tanto no debieron diseñarse.

Cuadro 1. Cebadores diseñados con Primer3Plus (Free Software Foundation, Inc., Boston, MA, Estados Unidos de América) para la detección de los diferentes genes involucrados en el suavizamiento de frutos de papaya

Gen	Cebadores	μM	Producto (pb)
Poligalacturonasa ^a	F: gtttctcaactcccggaaca R: aggagaggatggtgacatgg	0,1	185
Endoxilanasas ^b	F: catagcaatccgtggacaca R: cataaaacacagcgaagca	1,0	227
Pectinesterasa ^c	F: acacgctctccgtcaattct R: gtcggatcttccgtttgcta	0,1	157
Expansina ^c	F: atggcttgagctgtggttct R: cccagctctgtactgtgcaa	1,0	209
ACC deaminasa ^d	F: gcaccaacacatcaatctg R: gaagacgctagacgggagtg	1,0	177
Actina*	F: actacgagttgcctgatgga R: aaccaccactgagcacaatg	1,0	200

^aFabi *et al.* (2009) aislaron el gen. ^bChen y Paull (2003) y Manenoi y Paull (2007b) aislaron el gen. ^cGenes aislados y encontrados en el NCBI que aún no se encuentran publicados. ^dGen candidato para la enzima ACC deaminasa
*Cebadores descritos por McCafferty *et al.* (2008).

Las mezclas maestras se prepararon siguiendo las instrucciones del kit Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X (Fermentas, Vilna, Lituania) con cebadores a diferentes concentraciones, según la optimización previa realizada para cada gen (Cuadros 1 y 2) y un volumen de 2 µl de las muestras de ADNc para una reacción de 25 µl. El PCR se realizó en el termociclador de tiempo real Rotor Gene 6000 (Corbett, Sydney, Australia) utilizando el ciclo térmico recomendado para la Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X (Cuadro 3). El ciclo térmico contenía un análisis de disociación para confirmar la amplificación de un solo producto.

Cuadro 2. Composición de las mezclas maestras utilizadas para la PCR en tiempo real de los genes involucrados en el suavizamiento de frutos de papaya

Reactivo	Concentración inicial	Volumen agregado por reacción (1X)	Concentración final
Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Mezcla maestra (Fermentas, Vilna, Lituania)	2X	12,5 µl	1X
Cebador F	10 µM	Ajustable	0,1 ó 1 µM (Cuadro 1)
Cebador R	10 µM	Ajustable	0,1 ó 1 µM (Cuadro 1)
H ₂ O libre de nucleasas	-	Ajustable	-
ADNc	11 y 27,5 ng/µl	2 µl	22 y 55 ng
Volumen total de la reacción	25 µl	-	-

Cuadro 3. Ciclo térmico utilizado para la PCR en tiempo real de los genes involucrados en el suavizamiento de frutos de papaya

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	95°C	10 min	1
Desnaturalización	95°C	15 s	40
Alineamiento y Extensión*	60°C	1 min	
Curva de disociación o Melting Curve	Iniciando en 60°C y terminando en 95°C Con optimización del 'gain' automático	-	-

* La adquisición de datos se realizó durante el paso de alineamiento/extensión en el canal: Green (SYBR Green).

Análisis estadístico de los resultados

La normalidad y homogeneidad de varianza de los valores obtenidos para cada uno de los parámetros fue analizada previo al análisis estadístico, para comprobar que se ajustaran a los modelos lineales generalizados. Los datos para cuantificación de transcritos obtenidos según la fórmula descrita por Pfaffl (2004) se transformaron por medio de la función logarítmica: $\text{Log}_{10}(x)$ para ajustarlos al modelo lineal, ya que los niveles calculados no presentaban normalidad ni homogeneidad de varianza.

Posteriormente, se determinó la existencia de diferencias significativas entre tratamientos y entre diferentes días dentro de un mismo tratamiento por medio un ANDEVA (Análisis de Varianza) de múltiples factores, y se realizó una comparación de medias de Tukey, utilizando el programa estadístico Statistica versión 10 (StatSoft®, Oklahoma, Estados Unidos de América).

Ensayo II

Material vegetal

En febrero del 2012 se seleccionaron 21 frutos de papaya (*C. papaya* L.) del híbrido "Pococí" en diferentes estados de madurez (desde grado 0 hasta grado 5) de diferentes fincas ubicadas en los Diamantes (Limón, Costa Rica). La muestra se seleccionó lo más heterogénea posible para garantizar la representación de diferentes grados de firmeza de frutos que maduran en condiciones normales.

A cada uno de los frutos seleccionados se le determinó la firmeza de la cáscara y de la pulpa, únicamente en un carpelo del fruto, de la misma forma descrita anteriormente (Ensayo I). De ese mismo carpelo, se tomaron muestras de cáscara y de pulpa para realizar la extracción, purificación y retrotranscripción de ARN para determinar la acumulación de transcritos de los genes: poligalacturonasa (GenBank: FJ007644.1), pectinesterasa (GenBank: Y07899.1), endoxilanasas (GenBank: AY138968.1), expansina (GenBank: DQ321829.2) y el gen candidato para la ACC deaminasa, de la misma forma descrita anteriormente (Ensayo I).

Análisis estadístico de los resultados

La normalidad y homogeneidad de varianza de los valores obtenidos para cada uno de los parámetros fue analizada previo al análisis estadístico, para comprobar que se ajustaran a los modelos lineales generalizados. Los datos de firmeza no fueron transformados; sin embargo, los datos de cuantificación de transcritos sí se transformaron por medio de la función logarítmica: $\text{Log}_{10}(x)$, ya que los niveles calculados según la fórmula descrita por Pffafli (2004) no presentaban normalidad ni homogeneidad de varianza.

Posteriormente, se realizó el análisis de correlación entre la firmeza y los datos transformados de acumulación de transcritos de los diferentes genes, tanto para la pulpa como para la cáscara, utilizando el programa estadístico Statistica versión 10 (StatSoft®, Oklahoma, Estados Unidos de América).

Resultados

Ensayo I

Parámetros físicos de maduración: firmeza y color

La firmeza de la pulpa y de la cáscara de los frutos de papaya “Pococi” se vio afectada tanto por el tiempo ($p < 0,0001$) como por los diferentes tratamientos ($p < 0,0001$) (Anexos 7 y 8). En forma general, la pérdida de firmeza de los frutos de papaya “Pococi” fue más rápida en la pulpa que en la cáscara (Figuras 2A y 2B).

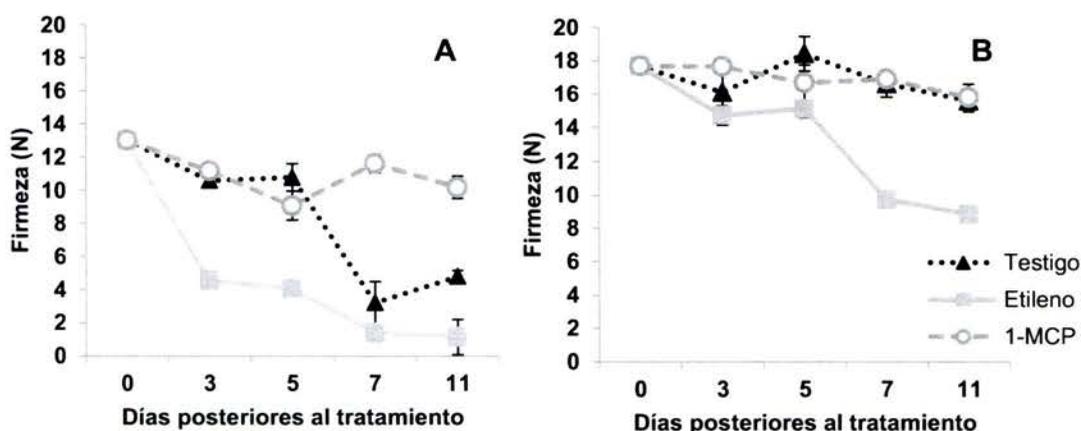


Figura 2. Firmeza de la pulpa (A) y la cáscara (B) de frutos de papaya “Pococi” para cada tratamiento. Las barras en el gráfico representan el error estándar.

En la pulpa, la firmeza de los frutos tratados con etileno disminuyó repentinamente el día 3 y continuó disminuyendo luego de forma más pausada hasta el día 11; mientras que en los frutos testigo, la firmeza disminuyó significativamente el día 7; y en los frutos tratados con 1-MCP la firmeza no disminuyó en el tiempo evaluado (Figura 2A). En la cáscara, la firmeza de los

frutos tratados con etileno disminuyó significativamente el día 7, mientras que en los frutos testigo y tratados con 1-MCP no disminuyó en el período evaluado, sin diferencias significativas entre ellos (Figura 2B).

En la pulpa, los valores de L*, a* y b* no se vieron afectados por los tratamientos ($p > 0,05$), pero sí por el tiempo ($p < 0,05$) (Anexo 7). Lo anterior sugiere que no hubo efecto alguno de los tratamientos sobre el color de la pulpa. El valor de L* (luminosidad) disminuyó significativamente el día 7 con respecto al día 0, lo cual indica oscurecimiento del color de la pulpa; mientras que el valor de a* (cambio de verde a rojo) aumentó los días 5, 7 y 11 (con respecto al día 0), lo cual indica que en general la pulpa se tornó más rojiza que al inicio del experimento; y el valor de b* (cambio de azul a amarillo) aumentó a partir del día 7 y se mantuvo estable, lo cual indica que también existió leve amarillamiento de la pulpa (Cuadro 4).

Cuadro 4. Color (L*, a* y b*) determinado en las cuatro fechas de evaluación en la pulpa de frutos de papaya "Pococi" sometidos a diferentes tratamientos

Tratamiento		Días posteriores al tratamiento			
		0	5	7	11
L*	1-MCP		53,72 ± 0,81ab	53,44 ± 0,84b	56,42 ± 1,28ab
	Testigo	55,90 ± 0,96a	54,35 ± 0,99ab	51,56 ± 1,49b	53,54 ± 0,02ab
	Etileno		54,53 ± 1,14ab	53,98 ± 0,68b	53,61 ± 0,16ab
a*	1-MCP		38,44 ± 1,09ab	37,56 ± 1,14a	35,74 ± 1,01b
	Testigo	31,72 ± 1,01c	36,32 ± 1,28ab	40,98 ± 2,05a	34,20 ± 0,75b
	Etileno		36,84 ± 0,96ab	38,96 ± 1,14a	38,30 ± 0,90b
b*	1-MCP		42,52 ± 0,79b	41,20 ± 0,32a	42,88 ± 0,92a
	Testigo	39,47 ± 0,47b	40,71 ± 0,64b	47,52 ± 0,92a	40,70 ± 0,53a
	Etileno		40,88 ± 1,07b	44,54 ± 1,14a	46,64 ± 1,34a

*Letras diferentes evidencian diferencias significativas únicamente en el tiempo (Tukey, $\alpha = 0,05$).

Las diferencias en el cambio de color de los frutos pertenecientes a los diferentes tratamientos fueron más evidentes en la cáscara (Figura 3). En la cáscara, los valores de L^* , a^* y b^* se vieron afectados por el tiempo y por los diferentes tratamientos ($p < 0,0001$) (Anexo 8). En forma general, los valores de L^* (luminosidad), a^* (cambio de verde a rojo) y b^* (cambio de azul a amarillo) aumentaron con el tiempo, siendo los frutos tratados con etileno y frutos testigo los que presentaron el mayor aumento (Cuadro 5).

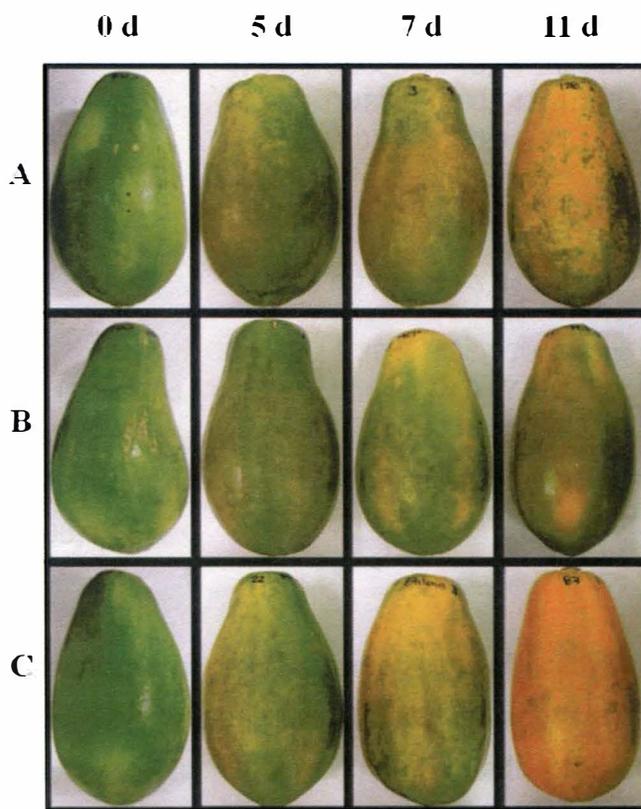


Figura 3. Color observado en la cáscara de frutos de papaya “Pococi” para cada tratamiento durante diferentes días de evaluación (0, 5, 7 y 11 días). A. Testigo. B. 1-MCP. C. Etileno.

Lo anterior indica que las cáscaras de los frutos, en general, presentaron un aclaramiento, enrojecimiento y amarillamiento con el paso del tiempo y que dicho cambio fue acelerado en la cáscara de los frutos tratados con etileno y frutos testigo, que en aquellos frutos tratados con el 1-MCP (Cuadro 5).

Cuadro 5. Color (L^* , a^* y b^*) determinado en las cuatro fechas de evaluación en la cáscara de frutos de papaya "Pococi" sometidos a diferentes tratamientos

Tratamiento	Días posteriores al tratamiento				
	0	5	7	11	
L^*	1-MCP		47,22 ± 0,95bc	49,24 ± 0,66b	47,41 ± 0,64bc
	Testigo	44,81 ± 0,53c	48,96 ± 0,48bc	50,74 ± 1,27b	55,61 ± 0,73a
	Etileno		48,85 ± 1,05b	50,91 ± 1,14b	59,18 ± 0,09a
a^*	1-MCP		-8,06 ± 0,41d	-7,54 ± 0,31d	-6,81 ± 0,57d
	Testigo	-10,59 ± 0,20e	-6,97 ± 0,18d	-3,32 ± 0,89c	0,02 ± 0,48b
	Etileno		-6,80 ± 0,77d	-3,94 ± 0,32c	10,86 ± 0,87a
b^*	1-MCP		34,03 ± 2,38c	33,96 ± 0,48bc	40,27 ± 0,61b
	Testigo	27,17 ± 0,73d	35,39 ± 1,50bc	40,07 ± 0,70bc	51,55 ± 0,77a
	Etileno		37,55 ± 0,72bc	36,91 ± 1,37bc	52,88 ± 0,42a

*Letras diferentes evidencian diferencias significativas entre tratamientos y en el tiempo (Tukey, $\alpha = 0,05$).

El tratamiento con etileno no presentó diferencias significativas con respecto al testigo para los valores de L^* y b^* en ninguna de las fechas evaluadas, pero fue significativamente mayor el valor de a^* en frutos tratados con etileno al final del período de evaluación (día 11) que en frutos pertenecientes al testigo, lo cual indica que la cáscara de frutos tratados con etileno se tornó más anaranjada.

El tratamiento con 1-MCP presentó valores significativamente menores con respecto al testigo y el tratamiento con etileno para los parámetros L^* y b^* al final del período de evaluación (día 11), lo cual indica un retraso del aclaramiento y

amarillamiento en la cáscara de los frutos tratados con 1-MCP. Sin embargo, el parámetro a^* fue significativamente menor (valores negativos) en frutos tratados con 1-MCP a partir del día 7, lo que indica que la cáscara de dichos frutos permaneció de color verde en comparación con la cáscara de frutos testigo y frutos tratados con etileno.

Parámetros químicos de maduración: pH, sólidos solubles y acidez titulable

El pH se vio afectado por los tratamientos y por el tiempo ($p < 0,0001$) (Anexo 7). El pH de los frutos de papaya al final del período de evaluación (día 11) disminuyó significativamente en comparación con los frutos al inicio del experimento (día 0). El valor más ácido se registró con el tratamiento de etileno al final del período de evaluación. Los frutos testigo y los tratados con 1-MCP no presentaron diferencias significativas al final del período de evaluación (Cuadro 6).

Asimismo, la acidez titulable (% ácido cítrico) se vio afectada por los tratamientos y por el tiempo ($p < 0,0001$) (Anexo 7). La acidez titulable de los frutos de papaya al final del período de evaluación (día 11) aumentó significativamente en frutos tratados con etileno en comparación con los frutos al inicio del experimento (día 0). No se observaron cambios en la acidez titulable de frutos testigo y frutos tratados con 1-MCP en el tiempo (Cuadro 6).

No se detectó variación significativa en sólidos solubles (grados brix) en el tiempo ni entre los diferentes tratamientos, por lo tanto, este parámetro no se vio afectado por los factores evaluados (Cuadro 6, Anexo 7).

Cuadro 6. Parámetros químicos de maduración determinados en la pulpa de frutos de papaya “Pococi” sometidos a diferentes tratamientos

	Tratamiento	Días posteriores al tratamiento	
		0	11
pH*	1-MCP		5,07 ± 0,03b
	Testigo	5,27 ± 0,01a	4,99 ± 0,02b
	Etileno		4,67 ± 0,03c
% ácido cítrico	1-MCP		0,08 ± 0,005b
	Testigo	0,08 ± 0,002b	0,09 ± 0,003b
	Etileno		0,15 ± 0,010a
grados brix	1-MCP		10,78 ± 0,25a
	Testigo	10,82 ± 0,16a	10,78 ± 0,31a
	Etileno		10,21 ± 0,10a

*Letras diferentes evidencian diferencias significativas entre tratamientos y en el tiempo (Tukey, $\alpha = 0,05$).

Evaluación de acumulación de transcritos por medio de PCR en tiempo real

En adelante, cada una de las figuras representa el logaritmo de la acumulación relativa del ARNm, o los niveles de transcripción, calculados para cada gen (Figuras 4 a la 13). Los niveles de transcripción calculados el día 0, utilizado como calibrador (acumulación relativa de ARNm equivalente a un valor de uno), están representados con un valor de cero, ya que el $\log(1) = 0$. Por lo tanto, los valores calculados el día 0 (calibrador) corresponden a la línea del eje “x” en cada figura; valores inferiores a los niveles de transcripción calculados para el día 0 (calibrador), es decir, valores de expresión relativa menores que uno, están representados en el eje “y” negativo ($y < 0$) en cada figura y valores superiores a los niveles de transcripción calculados para el día 0 (calibrador), es decir, valores

de expresión relativa mayores que uno, están representados en el eje "y" positivo ($y > 0$).

Además, el intervalo de confianza del 95% calculado para el día 0 (calibrador) está representado con líneas horizontales en color rojo paralelas al eje "x" en cada figura. Todos los datos del logaritmo de acumulación del ARNm, o los niveles de transcripción, calculados para cada gen (correspondientes a los días 0, 3, 5, 7 y 11) se encuentran reportados en los anexos 9 y 10. A continuación se describen los resultados caso por caso.

Poligalacturonasa

En la pulpa, el transcrito (ARNm) para el gen de la poligalacturonasa se acumuló en frutos testigo y tratados con etileno y disminuyó en frutos tratados con 1-MCP, es decir, en este último caso los niveles de transcripción para dicho gen fueron significativamente menores que el nivel calculado para el día 0 (calibrador) (Figura 4, Anexo 9).

Frutos pertenecientes al testigo y al tratamiento con etileno no presentaron diferencias significativas en cuanto al nivel de transcripción calculado para el gen de la poligalacturonasa, pero en ambos grupos dicho nivel fue significativamente mayor con respecto al día 0 (calibrador) y también, como se indicó anteriormente, con respecto al tratamiento con 1-MCP para todas las fechas evaluadas (Figura 4, Anexo 9).

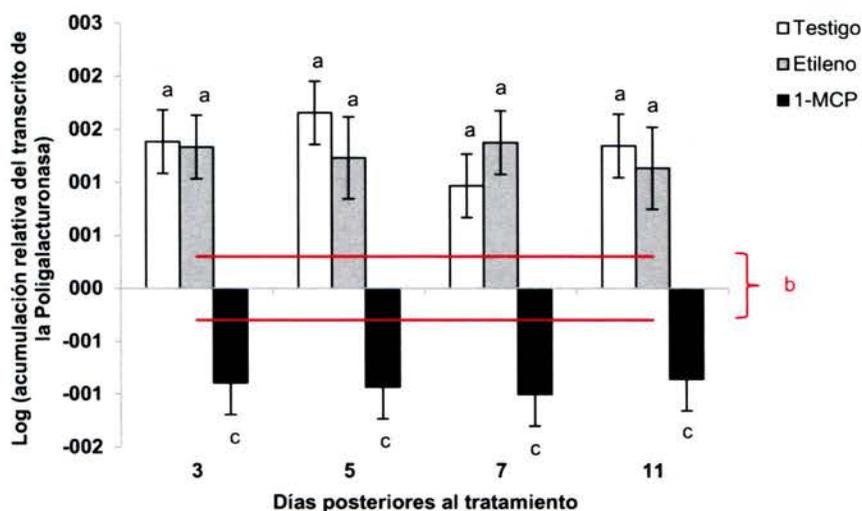


Figura 4. Cuantificación relativa del ARNm del gen de la poligalacturonasa en la pulpa de frutos de papaya “Pococi” sometidos a diferentes tratamientos. Las barras de error en el gráfico representan el intervalo de confianza del 95%. Las líneas horizontales en color rojo representan el intervalo de confianza del 95% calculado para el día 0 (calibrador). Letras diferentes en el gráfico indican la existencia de diferencias significativas en el tiempo y entre diferentes tratamientos ($p < 0,05$).

En la cáscara, en forma similar a la pulpa, el transcrito (ARNm) del gen de la poligalacturonasa se acumuló en frutos testigo y tratados con etileno, y disminuyó en frutos tratados con 1-MCP (Figura 5). Frutos pertenecientes al testigo y al tratamiento con etileno no presentaron diferencias significativas entre sí en cuanto al nivel de transcripción calculado para el gen de la poligalacturonasa, pero dicho nivel fue significativamente mayor con respecto al día 0 (día 11 para el testigo y a partir del día 7 para el tratamiento con etileno) y con respecto al tratamiento con 1-MCP (durante todo el período de evaluación para el testigo y a partir del día 5 para el tratamiento con etileno) (Figura 5, Anexo 10).

Lo anterior revela que el aumento en la acumulación del transcrito (ARNm) de este gen en comparación con el día 0 (calibrador) ocurrió más temprano en la cáscara de frutos tratados con etileno que en el testigo (al día 7). Además, por efecto del 1-MCP, los niveles del transcrito (ARNm) para el gen de la poligalacturonasa no incrementaron en forma significativamente diferente del día 0 (calibrador) durante todo el período de evaluación, pero fueron significativamente menores en comparación con frutos testigo y frutos tratados con etileno (Figura 5, Anexo 10).

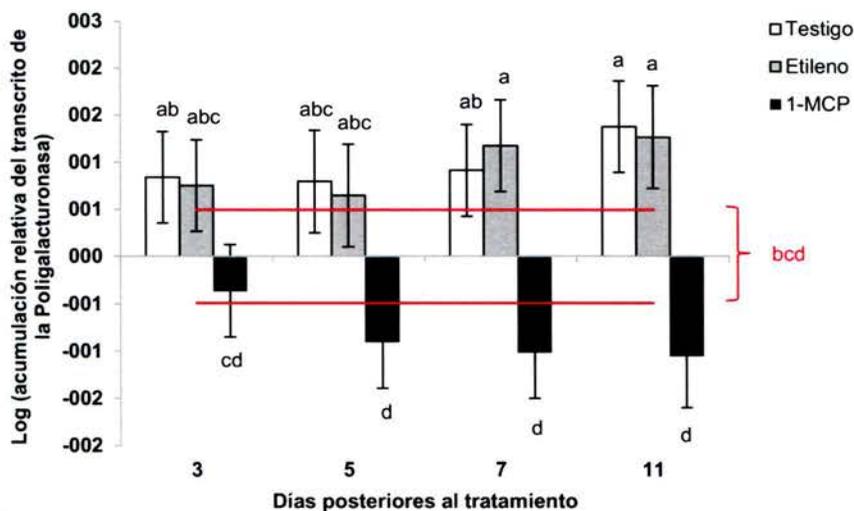


Figura 5. Cuantificación relativa del ARNm del gen de la poligalacturonasa en la cáscara de frutos de papaya “Pococi” sometidos a diferentes tratamientos. Las barras de error en el gráfico representan el intervalo de confianza del 95%. Las líneas horizontales en color rojo representan el intervalo de confianza del 95% calculado para el día 0 (calibrador). Letras diferentes en el gráfico indican la existencia de diferencias significativas en el tiempo y entre diferentes tratamientos ($p < 0,05$).

Endoxilanasas

En la pulpa, el transcrito (ARNm) del gen de la endoxilanasas se acumuló en forma similar en frutos testigo y frutos tratados con etileno, y se retardó su acumulación en frutos tratados con 1-MCP. Frutos pertenecientes al testigo y al tratamiento con etileno no presentaron diferencias significativas entre ellos en cuanto al nivel de transcripción calculado para el gen de la endoxilanasas durante todo el período de evaluación; pero dicho nivel fue significativamente mayor con respecto a los frutos del día 0 (calibrador) y con respecto a frutos tratados con 1-MCP (durante todo el período de evaluación para el testigo y hasta el día 7 para el tratamiento con etileno) (Figura 6, Anexo 9).

A diferencia del gen de la poligalacturonasa, el 1-MCP únicamente retardó la acumulación del transcrito (ARNm) del gen de la endoxilanasas. En frutos pertenecientes al tratamiento con 1-MCP, los niveles de transcripción calculados los días 3 y 5 no presentaron diferencias significativas con respecto al nivel calculado el día 0 (calibrador), pero sí con respecto a los frutos testigo y tratados con etileno, siendo la acumulación del transcrito (ARNm) del gen de la endoxilanasas significativamente menor en frutos tratados con 1-MCP. La acumulación del transcrito (ARNm) de este gen en frutos tratados con 1-MCP aumentó el día 7 y posteriormente no presentó diferencias significativas con respecto a frutos tratados con etileno, pero sí fue menor con respecto a los frutos pertenecientes al testigo (Figura 6, Anexo 9).

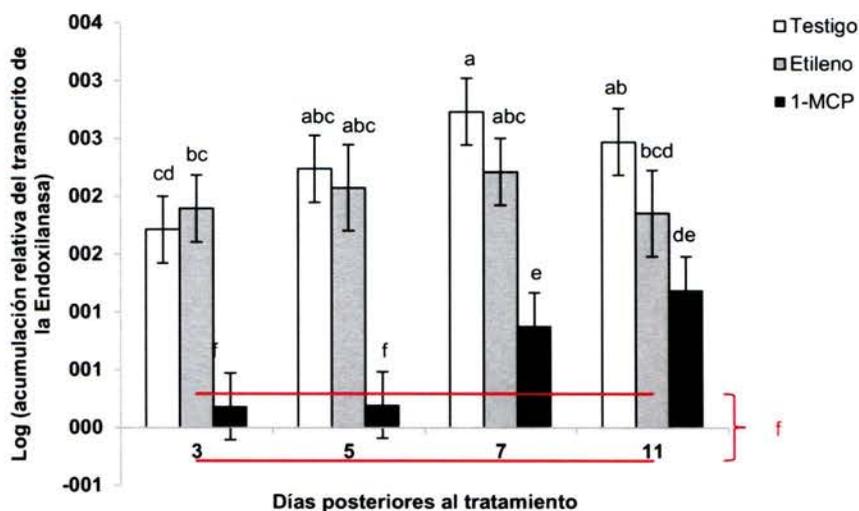


Figura 6. Cuantificación relativa del ARNm del gen de la endoxilanasasa en la pulpa de frutos de papaya “Pococí” sometidos a diferentes tratamientos. Las barras de error en el gráfico representan el intervalo de confianza del 95%. Las líneas horizontales en color rojo representan el intervalo de confianza del 95% calculado para el día 0 (calibrador). Letras diferentes en el gráfico indican la existencia de diferencias significativas en el tiempo y entre diferentes tratamientos ($p < 0,05$).

En la cáscara, el transcrito (ARNm) del gen de la endoxilanasasa se acumuló en todos los casos. Frutos pertenecientes al testigo y los tratamientos (tanto con etileno como con 1-MCP) no presentaron diferencias significativas entre sí en cuanto al nivel de transcripción calculado para el gen de la endoxilanasasa. En el caso de los frutos pertenecientes al testigo y frutos tratados con etileno, los niveles calculados a los días 7 y 11 fueron significativamente mayores que el día 0 (calibrador) (Figura 7, Anexo 10).

En frutos tratados con 1-MCP, el nivel de transcripción del gen aumentó significativamente el día 11, igualando los niveles calculados en frutos testigo y tratados con etileno y dicho nivel fue significativamente mayor que los días 0 (calibrador), 3 y 5 (Figura 7, Anexo 10). A diferencia del gen de la

poligalacturonasa, el 1-MCP únicamente retardó la acumulación del transcrito (ARNm) del gen de la endoxilanasas, coincidiendo con lo descrito anteriormente en el caso de la pulpa (Figuras 6 y 7, Anexos 9 y 10).

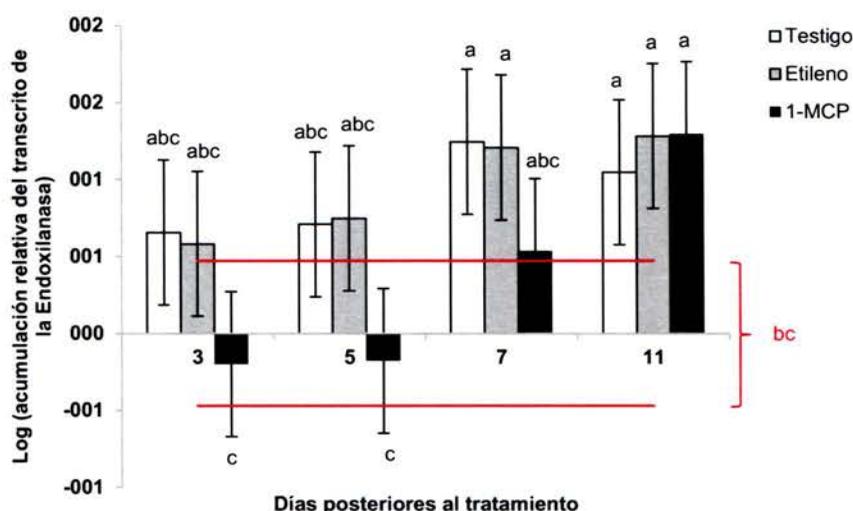


Figura 7. Cuantificación relativa del ARNm del gen de la endoxilanasas en la cáscara de frutos de papaya “Pococi” sometidos a diferentes tratamientos. Las barras de error en el gráfico representan el intervalo de confianza del 95%. Las líneas horizontales en color rojo representan el intervalo de confianza del 95% calculado para el día 0 (calibrador). Letras diferentes en el gráfico indican la existencia de diferencias significativas en el tiempo y entre diferentes tratamientos ($p < 0,05$).

Pectinesterasa

En la pulpa, el nivel del transcrito (ARNm) del gen de la pectinesterasa disminuyó en el testigo al día 11, y en frutos tratados (tanto con etileno como con 1-MCP) disminuyó en los días 7 y 11 (Figura 8, Anexo 9). En frutos pertenecientes al testigo los niveles de transcripción calculados los días 3, 5 y 7 no difirieron

significativamente del nivel calculado el día 0 (calibrador); sin embargo, dicho nivel disminuyó significativamente el día 11. En el caso de frutos tratados con etileno, se observó disminución de los niveles de transcripción del gen durante todo el período de evaluación, es decir, el transcrito (ARNm) disminuyó con respecto al nivel calculado el día 0 (calibrador) y fue significativamente menor el día 11 comparado con los días 3 y 5. En el caso de frutos tratados con 1-MCP, los niveles de transcripción calculados los días 3 y 5 no difirieron significativamente del nivel calculado el día 0 (calibrador); sin embargo, dicho nivel disminuyó significativamente a partir del día 7 (Figura 8, Anexo 9).

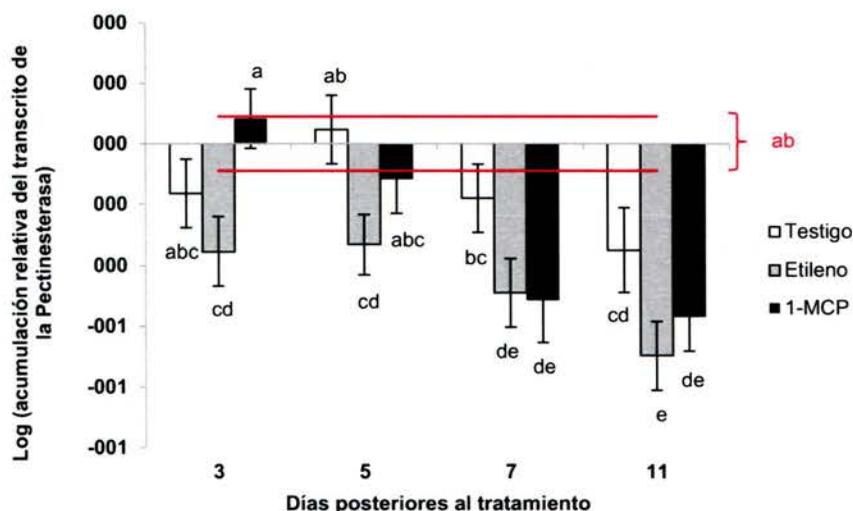


Figura 8. Cuantificación relativa del ARNm del gen de la pectinesterasa en la pulpa de frutos de papaya “Pococi” sometidos a diferentes tratamientos. Las barras de error en el gráfico representan el intervalo de confianza del 95%. Las líneas horizontales en color rojo representan el intervalo de confianza del 95% calculado para el día 0 (calibrador). Letras diferentes en el gráfico indican la existencia de diferencias significativas en el tiempo y entre diferentes tratamientos ($p < 0,05$).

Al comparar el testigo con los diferentes tratamientos, se observó que el testigo y el tratamiento con etileno presentaron diferencias significativas los días 5, 7 y 11, siendo los niveles calculados del transcrito (ARNm) del gen de la pectinesterasa significativamente mayores en el testigo y menores con etileno (Figura 8, Anexo 9). El testigo y el tratamiento con 1-MCP no presentaron diferencias significativas los días 3, 5 y 11 pero sí el día 7, siendo los niveles del transcrito (ARNm) del gen de la pectinesterasa significativamente mayores en el testigo y menores con 1-MCP (Figura 8, Anexo 9). El tratamiento con etileno y el tratamiento con 1-MCP difirieron significativamente el día 3, siendo los niveles del transcrito (ARNm) del gen de la pectinesterasa significativamente menores con etileno (Figura 8, Anexo 9).

En la cáscara, el transcrito (ARNm) del gen de la pectinesterasa se acumuló sin variaciones significativas con respecto al día 0 (calibrador) en frutos testigo y tratados con 1-MCP en todas las evaluaciones, así como hasta el día 7 en los frutos tratados con etileno. Considerando esta última excepción, tampoco varió significativamente entre tratamientos (Figura 9, Anexo 10). Sin embargo, al día 11 se observó una disminución significativa de los niveles del transcrito (ARNm) de este gen en frutos tratados con etileno (Figura 9, Anexo 10).

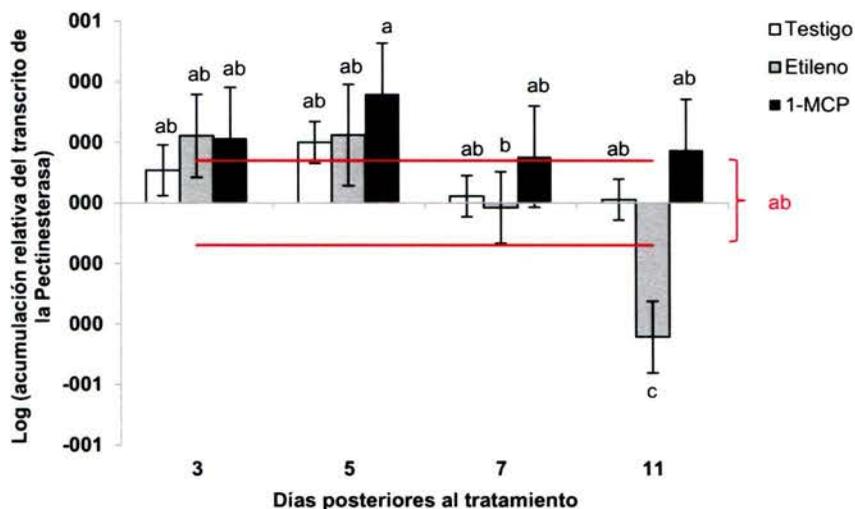


Figura 9. Cuantificación relativa del ARNm del gen de la pectinesterasa en la cáscara de frutos de papaya “Pococi” sometidos a diferentes tratamientos. Las barras de error en el gráfico representan el intervalo de confianza del 95%. Las líneas horizontales en color rojo representan el intervalo de confianza del 95% calculado para el día 0 (calibrador). Letras diferentes en el gráfico indican la existencia de diferencias significativas en el tiempo y entre diferentes tratamientos ($p < 0,05$).

Expansina

En la pulpa, se observó una disminución de la transcripción del gen de la expansina para todas las fechas evaluadas, debido a que se presentaron niveles del transcrito (ARNm) significativamente menores con respecto al nivel calculado el día 0 (calibrador) en todos los casos (Figura 10, Anexo 9).

En el caso de frutos pertenecientes al testigo, la mayor disminución de los niveles de transcripción del gen fue observada el último día de evaluación (día 11). En el caso de frutos tratados con etileno, la mayor disminución de los niveles de transcripción fue observada el día 7; dicha disminución en la transcripción se hizo

significativamente menor el día 11. En el caso de frutos tratados con 1-MCP, la mayor disminución se observó el día 11, pero sin diferencias con respecto al día 7 (Figura 10, Anexo 9).

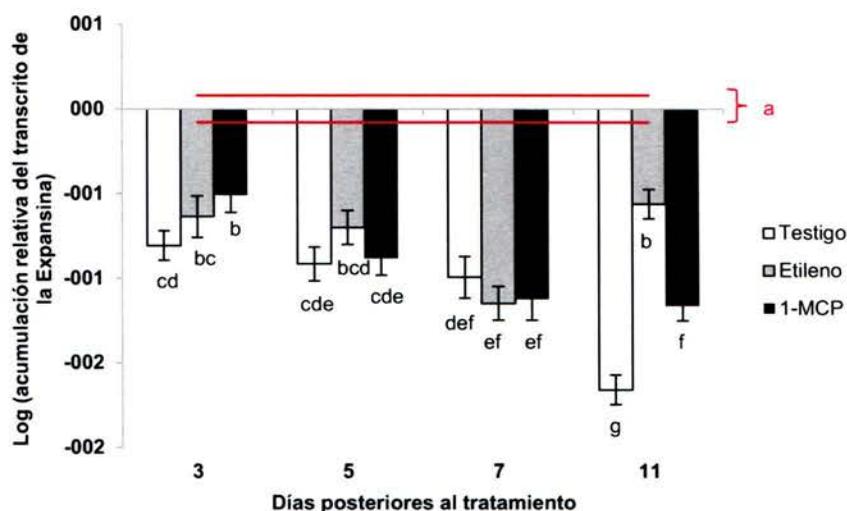


Figura 10. Cuantificación relativa del ARNm del gen de la expansina en la pulpa de frutos de papaya “Pococi” sometidos a diferentes tratamientos. Las barras de error en el gráfico representan el intervalo de confianza del 95%. Las líneas horizontales en color rojo representan el intervalo de confianza del 95% calculado para el día 0 (calibrador). Letras diferentes en el gráfico indican la existencia de diferencias significativas en el tiempo y entre diferentes tratamientos ($p < 0,05$).

El testigo y el tratamiento con etileno presentaron diferencias significativas entre sí únicamente el día 11, siendo la disminución de los niveles de transcripción del gen significativamente menor en el testigo (Figura 10, Anexo 9). Por otro lado, el testigo y el tratamiento con 1-MCP presentaron diferencias significativas entre ellos únicamente en los días 3 y 11, cuando, los niveles del transcrito (ARNm) observados en frutos tratados con 1-MCP fueron significativamente mayores en

comparación con los frutos testigo (Figura 10, Anexo 9). Adicionalmente, frutos tratados con etileno y frutos tratados con 1-MCP, no presentaron diferencias significativas durante el transcurso del tiempo, sino hasta el día 11, cuando la transcripción fue significativamente mayor en frutos tratados con etileno que en frutos tratados con 1-MCP (Figura 10, Anexo 9).

En la cáscara, a diferencia de la pulpa, se observó acumulación del transcrito (ARNm) del gen de la expansina para todas las fechas evaluadas (Figura 11, Anexo 10). En el caso de frutos pertenecientes al testigo, a partir del día 5 los niveles del transcrito (ARNm) del gen de la expansina fueron significativamente mayores que el nivel calculado el día 0 (calibrador). En el caso de frutos tratados con etileno, los niveles del transcrito (ARNm) del gen de la expansina fueron significativamente mayores que el nivel calculado el día 0 (calibrador) los días 5 y 11. En el caso de frutos tratados con 1-MCP, los niveles del transcrito (ARNm) del gen de la expansina fueron significativamente mayores que el nivel calculado el día 0 (calibrador) los días 5 y 7. Al comparar el testigo y los diferentes tratamientos, no se observaron diferencias significativas entre ellos durante todo el período de evaluación (Figura 11, Anexo 10).

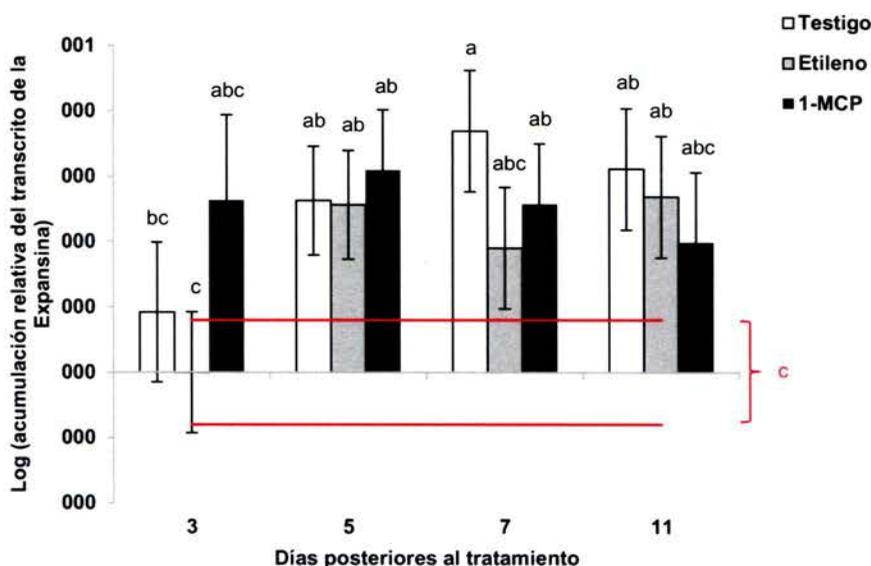


Figura 11. Cuantificación relativa del ARNm del gen de la expansina en la cáscara de frutos de papaya “Pococi” sometidos a diferentes tratamientos. Las barras de error en el gráfico representan el intervalo de confianza del 95%. Las líneas horizontales en color rojo representan el intervalo de confianza del 95% calculado para el día 0 (calibrador). Letras diferentes en el gráfico indican la existencia de diferencias significativas en el tiempo y entre diferentes tratamientos ($p < 0,05$).

ACC deaminasa

En la pulpa, la transcripción del gen candidato para la ACC deaminasa disminuyó en todos los casos, ya que los niveles del transcrito (ARNm) calculados fueron significativamente menores que el nivel calculado al día 0 (calibrador) (Figura 12, Anexo 9). En el caso de frutos pertenecientes al testigo, la transcripción fue significativamente menor que en frutos tratados con etileno y con 1-MCP (durante los días 3, 5 y 7), y se mantuvo sin variaciones significativas a través del tiempo (Figura 12, Anexo 9). En frutos tratados con etileno, la transcripción se hizo significativamente mayor los días 5 y 7 que en las otras fechas evaluadas;

mientras que en frutos tratados con 1-MCP la transcripción del gen fue significativamente mayor los días 3 y 5, al compararse con la observada los días 7 y 11 (Figura 12, Anexo 9).

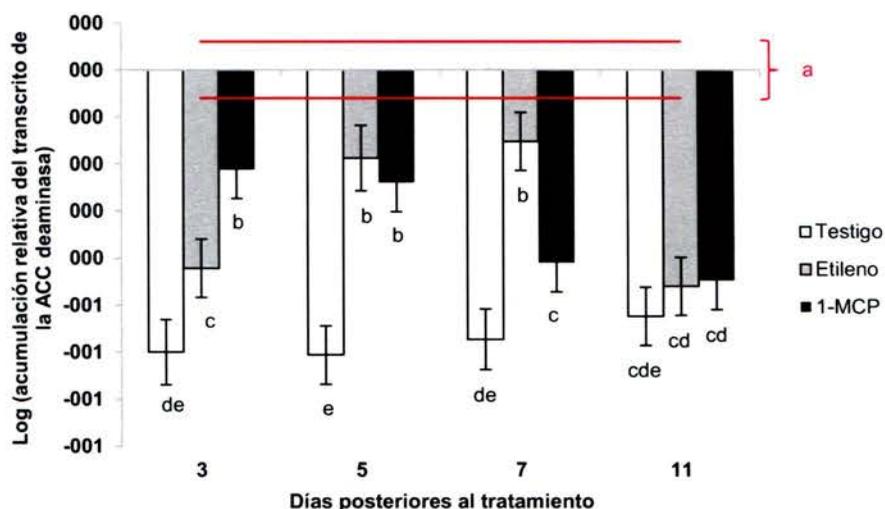


Figura 12. Cuantificación relativa del ARNm del gen candidato de la ACC deaminasa en la pulpa de frutos de papaya “Pococí” sometidos a diferentes tratamientos. Las barras de error en el gráfico representan el intervalo de confianza del 95%. Las líneas horizontales en color rojo representan el intervalo de confianza del 95% calculado para el día 0 (calibrador). Letras diferentes en el gráfico indican la existencia de diferencias significativas en el tiempo y entre diferentes tratamientos ($p < 0,05$).

En la cáscara, la acumulación del transcrito (ARNm) del gen candidato para la ACC deaminasa disminuyó en frutos testigo, frutos tratados con etileno y 1-MCP (Figura 13, Anexo 10). En el caso de frutos pertenecientes al testigo, la transcripción fue significativamente menor que en el caso de frutos tratados con

etileno y frutos tratados con 1-MCP (los días 5 y 7 en comparación al tratamiento con etileno y el día 5 en comparación al tratamiento con 1-MCP). Además, en frutos testigo el nivel de transcripción fue significativamente menor que el nivel de transcripción calculado el día 0 (calibrador) durante todo el período de evaluación (Figura 13, Anexo 10).

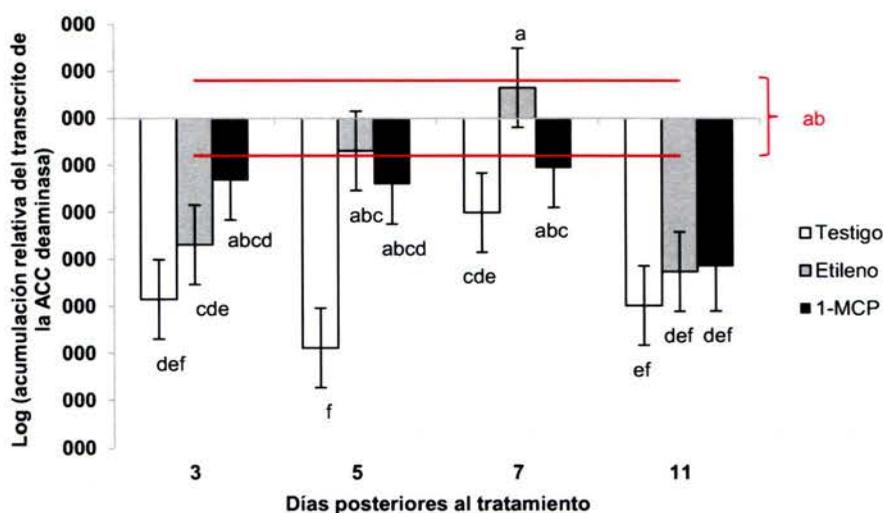


Figura 13. Cuantificación relativa del ARNm del gen candidato de la ACC deaminasa en la cáscara de frutos de papaya “Pococi” sometidos a diferentes tratamientos. Las barras de error en el gráfico representan el intervalo de confianza del 95%. Las líneas horizontales en color rojo representan el intervalo de confianza del 95% calculado para el día 0 (calibrador). Letras diferentes en el gráfico indican la existencia de diferencias significativas en el tiempo y entre diferentes tratamientos ($p < 0,05$).

En frutos tratados con etileno también se observó disminución de la transcripción del gen (los días 3 y 11) en comparación con los frutos del día 0 (calibrador); sin embargo, se produjeron cambios significativos a lo largo del tiempo en cuanto a la transcripción, ya que esta se hizo significativamente mayor el día 7 en comparación con el testigo, igualando los niveles de transcripción del día 0 (calibrador). En frutos tratados con 1-MCP también se observó disminución significativa de la transcripción del gen el día 11 en comparación con frutos del día 0 (calibrador); sin embargo, al inicio de la evaluación (días 3, 5 y 7) los niveles del transcrito (ARNm) no se diferenciaron significativamente del día 0 (calibrador) (Figura 13, Anexo 10).

Ensayo II

Correlación entre la firmeza y la acumulación de transcritos

Se buscó correlacionar la firmeza de la pulpa y de la cáscara de frutos de papaya "Pococi" con la acumulación de transcritos de los diferentes genes estudiados (Cuadro 7). A continuación se describe cada caso.

Cuadro 7. Análisis de correlación entre la firmeza y la acumulación de transcritos de diferentes genes en la pulpa y en la cáscara de frutos de papaya "Pococi"

Genes	Firmeza en pulpa			Firmeza en cáscara		
	r*	F	p	r	F	p
Poligalacturonasa	-0,86	53,51	< 0,05	-0,66	14,91	< 0,05
Endoxilanasas	-0,56	8,65	< 0,05	-0,18	0,64	0,43
Pectinesterasa	-0,01	0,001	0,97	0,68	16,32	< 0,05
Expansina	0,07	0,10	0,75	0,01	0,003	0,96
ACC deaminasa	-0,13	0,31	0,59	-0,15	0,43	0,52

*r = coeficiente de correlación de Pearson.

Poligalacturonasa

La acumulación de transcritos del gen de la poligalacturonasa se correlacionó negativamente con los valores de firmeza, tanto en la pulpa como en la cáscara (Figura 14A y 14B). Los coeficientes de correlación (r) calculados en ambos casos (Cuadro 7) indican que una mayor acumulación de transcritos de este gen coincide con la pérdida de firmeza del fruto y viceversa.

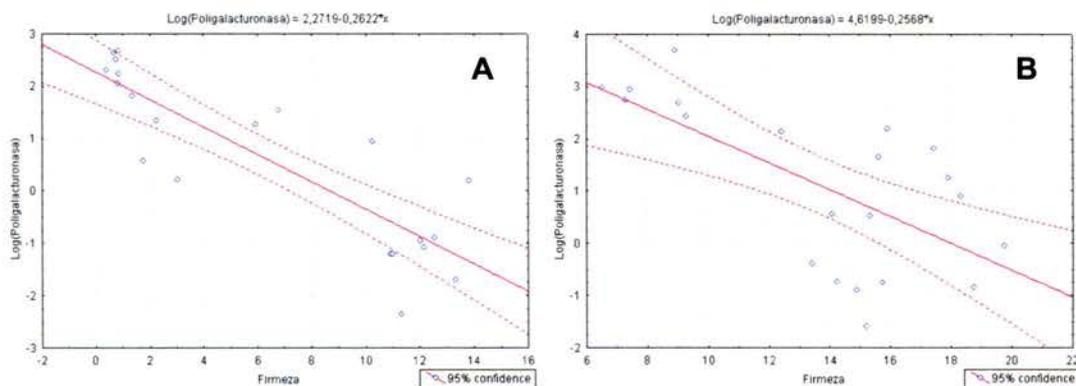


Figura 14. Correlación entre los valores de firmeza y acumulación de transcritos del gen de poligalacturonasa en la pulpa (A) y la cáscara (B) de frutos de papaya “Pococi”.

Endoxilanas

La acumulación de transcritos del gen de la endoxilanas también se correlacionó negativamente con los valores de firmeza en la pulpa y en la cáscara (Figura 15A y 15B), aunque dicha correlación fue más fuerte en la pulpa. Los valores de r calculados en ambos casos (Cuadro 7) indican que una mayor acumulación de transcritos de este gen coincide con la pérdida de firmeza del fruto y viceversa.

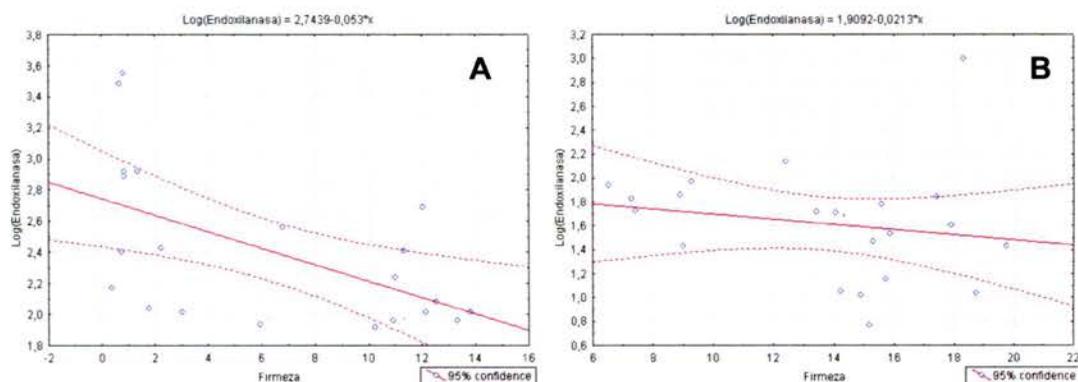


Figura 15. Correlación entre los valores de firmeza y acumulación de transcritos del gen de endoxilanas en la pulpa (A) y la cáscara (B) de frutos de papaya “Pococi”.

Pectinesterasa

La acumulación de transcritos del gen de la pectinesterasa no mostró ningún tipo de correlación con los valores de firmeza en la pulpa (Figura 16A), pero se correlacionó positivamente con los valores de firmeza de la cáscara (Figura 16B). En este último caso, el valor de r calculado (Cuadro 7) indica que una mayor acumulación de transcritos del gen, coincide con una mayor firmeza en la cáscara y viceversa.

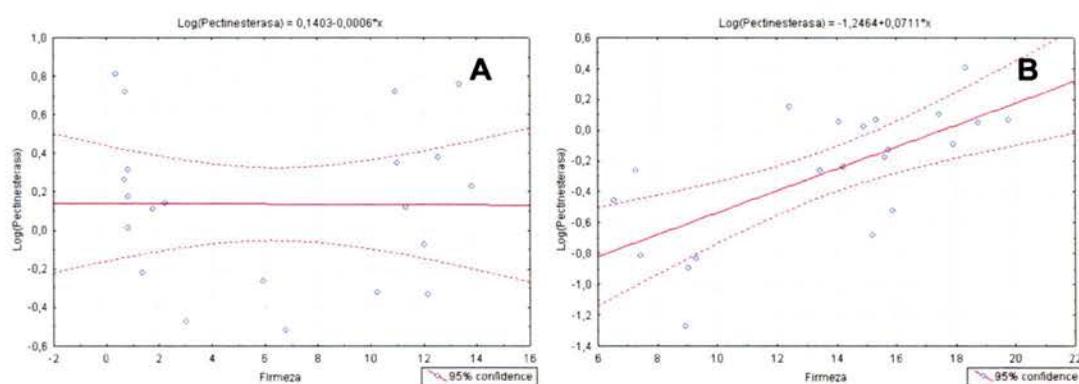


Figura 16. Correlación entre los valores de firmeza y acumulación de transcritos del gen de pectinesterasa en la pulpa (A) y la cáscara (B) de frutos de papaya “Pococí”.

Expansina

La acumulación de transcritos del gen de la expansina no mostró ninguna correlación con los valores de firmeza, ni en la pulpa ni en la cáscara (Figura 17A y 17B, Cuadro 7).

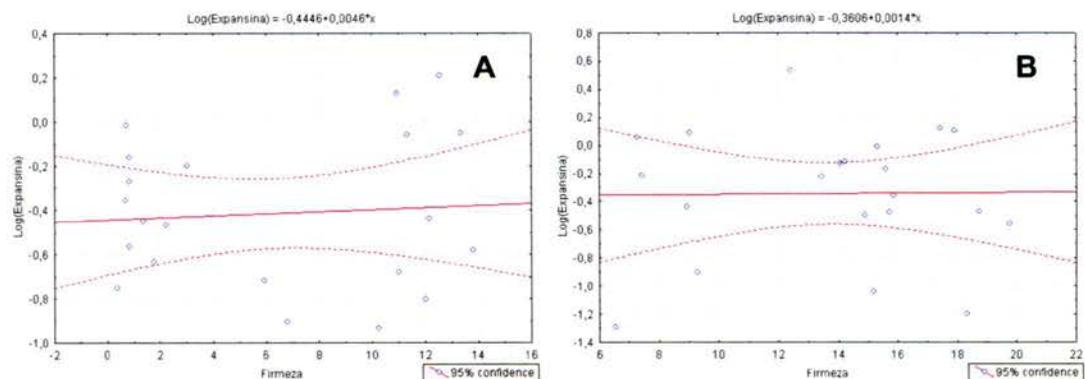


Figura 17. Correlación entre los valores de firmeza y acumulación de transcritos del gen de expansina en la pulpa (A) y la cáscara (B) de frutos de papaya “Pococi”.

ACC deaminasa

La acumulación de transcritos del gen candidato para la ACC deaminasa no mostró correlación con los valores de firmeza, ni en la pulpa ni en la cáscara (Figura 18A y 18B, Cuadro 7).

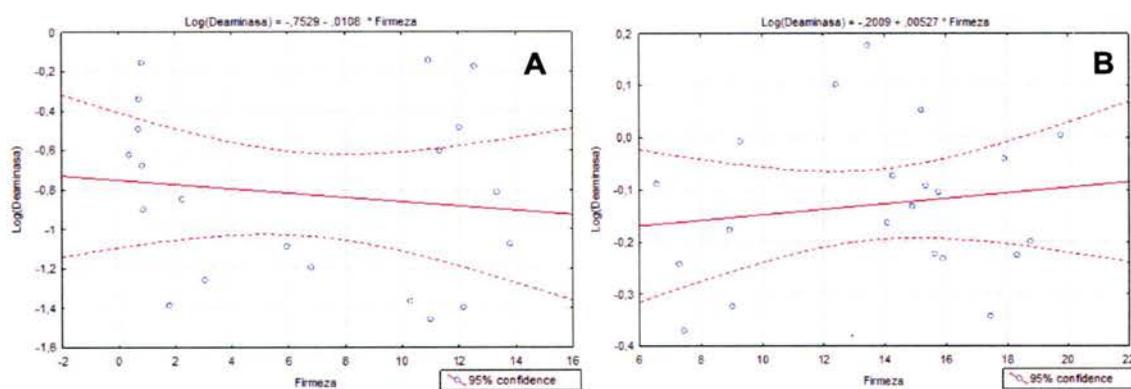


Figura 18. Correlación entre los valores de firmeza y acumulación de transcritos del gen candidato para la ACC deaminasa en la pulpa (A) y la cáscara (B) de frutos de papaya “Pococi”.

Discusión

Firmeza

La pérdida de firmeza observada en frutos de papaya “Pococi” tratados con etileno, tanto en la pulpa como en la cáscara, y en la pulpa de los frutos no tratados (Fig. 2), se debe posiblemente a que la papaya es un fruto climatérico y por lo tanto, los cambios que ocurren durante el proceso de su maduración, incluyendo el rápido suavizamiento, se encuentran asociados al incremento en la respiración celular, a la producción endógena y a la aplicación exógena de etileno (Zhang y Paull, 1990; Purwoko *et al.*, 2002; López-Gómez *et al.*, 2004; Rodrigo *et al.*, 2012).

El etileno es una molécula gaseosa sintetizada por las plantas, que califica como una hormona vegetal y actualmente se reconoce su participación y sus efectos en el proceso de maduración de los frutos (Argueso *et al.*, 2007; Bapat *et al.*, 2010; Rodrigo *et al.*, 2012). Jayawickrama *et al.* (2001) observaron la pérdida significativa de la firmeza en frutos preclimatéricos de papaya de la variedad “Rathna” que habían sido tratados con etileno gaseoso (250 ppm), Ethrel (1,65 ml) y carburo de calcio (CaC_2 , 1g por cada kg de fruta), el cual libera una molécula análoga al etileno denominada acetileno (C_2H_2). Lo anterior ejemplifica la relación de esta hormona con la pérdida de firmeza en frutos de papaya.

A pesar de que el suavizamiento o la pérdida de firmeza es uno de los cambios importantes asociados a la maduración de frutos en general, tanto climatéricos como no climatéricos, en frutos climatéricos como la papaya, este cambio se ha asociado a la alta sensibilidad que éstos presentan al etileno exógeno o moléculas análogas al mismo (Goulao y Oliveira, 2008; Bapat *et al.*, 2010; Rodrigo *et al.*, 2012; Gapper *et al.*, 2013). Está demostrado que aplicar etileno en forma exógena en cantidades tan pequeñas como 100 ppm, induce y acelera el

proceso de maduración, suavizamiento y cambio de color en frutos de papaya (Fabi *et al.*, 2007). Lo anterior, explicaría el por qué los frutos de papaya "Pococi" tratados con etileno exógeno se suavizaron más rápidamente que los que no fueron tratados. Fabi *et al.* (2007) observaron la pérdida de firmeza en frutos preclimatéricos de papaya de la variedad "Sunset", tan sólo 3 días después de haber aplicado etileno (100 $\mu\text{L/L}$). Dicha pérdida de firmeza ocurrió más rápido que en frutos no tratados, los cuales comenzaron a perder su firmeza 1 día después de los que habían sido tratados con etileno, y que en frutos tratados con 1-MCP (100 nL/L), los cuales no perdieron su firmeza. Sañudo-Barajas *et al.* (2008a) también observaron la aceleración de la pérdida de firmeza al aplicar Etefón (2.5 g/L) a frutos de papaya "Maradol", en comparación con frutos que no habían sido tratados y en frutos tratados con 1-MCP (300 nL/L).

Umaña *et al.* (2011) observaron que la mayor pérdida de firmeza en frutos de papaya "Pococi" con diferentes grados de madurez y almacenados a temperatura ambiente (22°C) se produce entre los días 3 y 9 del almacenamiento. Lo anterior coincide con la pérdida de firmeza observada en cáscara y pulpa para frutos tratados con etileno, y con la pérdida de firmeza en la pulpa para frutos sin tratar, almacenados entre 18-20°C en este estudio. Adicionalmente, durante el proceso de maduración, los tejidos del fruto de papaya se suavizan diferencialmente. La parte interna del mesocarpo se suaviza y pierde firmeza rápidamente en comparación con la parte externa (Lazan *et al.*, 1995), lo cual podría explicar el rápido suavizamiento observado de la pulpa con respecto a la cáscara en los frutos tratados con etileno y en frutos sin tratar.

Por otra parte, la retención de la firmeza de los frutos de papaya "Pococi" tratados con 1-MCP se debe probablemente a que el 1-MCP (C_4H_6), una molécula gaseosa análoga químicamente al etileno, aún en bajas concentraciones se une irreversiblemente a los receptores de etileno, bloqueando su acción e inhibiendo la síntesis autocatalítica del mismo (Blankenship y Dole, 2003; Moya-León *et al.*, 2004; Manenoi y Paull, 2007a; Nimitkeatkai *et al.*, 2008; Sañudo-Barajas *et al.*,

2008a; Bron y Jacomillo, 2009). Por lo tanto, el tratamiento de frutos de papaya con este compuesto inhibe el suavizamiento o la pérdida de firmeza durante la maduración de los mismos.

Color

En la pulpa, el cambio de color se evidenció y se logró cuantificar con una disminución leve de los valores de L^* (día 7) y un aumento de los valores de a^* y b^* (días 5 y 7) (Cuadro 4); lo cual indica que ocurrió un leve oscurecimiento, enrojecimiento y amarillamiento (respectivamente) con relación al color inicial de la pulpa en los frutos recién cosechados. La misma tendencia ha sido observada y cuantificada en la cáscara y en la pulpa de frutos de papaya de la variedad "Maradol" durante diferentes etapas de maduración (Santamaría-Basulto *et al.*, 2009), y está relacionado con el proceso normal de maduración de este fruto. Sin embargo, en la pulpa de esta última variedad los valores de L^* disminuyeron y los valores de a^* aumentaron en mayor medida que en la variedad "Pococi"; donde los cambios observados fueron menos pronunciados.

Además de los factores genéticos que pueden estar involucrados, los estados de madurez de los frutos en cada caso también pueden haber jugado un papel importante en las diferencias observadas. Así, en el presente estudio los frutos de papaya "Pococi" fueron cosechados con 10% de área amarilla en cáscara y color en pulpa, mientras que Santamaría-Basulto *et al.* (2009) determinaron como estadio inicial frutos de papaya "Maradol" sin área amarilla en la cáscara y sin color en la pulpa. Por lo tanto, los cambios pronunciados observados por Santamaría-Basulto *et al.* (2009) probablemente no fueron observados en este estudio, porque los frutos de papaya empleados de la variedad "Pococi" estaban en un estadio de madurez más avanzado que el de los frutos de papaya "Maradol".

Tampoco se observó un efecto de los tratamientos empleados sobre el cambio de color de la pulpa de los frutos de papaya "Pococi" probablemente debido a que al grado de madurez con el cual fueron cosechados estos frutos, la pulpa presentaba característicamente un 80% de color naranja, es decir, la pulpa prácticamente exhibía un grado avanzado en color, lo cual es característico de esta variedad de papaya (Umaña *et al.*, 2011).

Por el contrario, era de esperarse que los tratamientos sí tuvieran un efecto sobre el cambio de color en la cáscara, dado que sólo presentaban un 10% de amarillamiento al momento de la cosecha. En frutos tratados con etileno y sin tratar, el cambio de color en la cáscara se logró cuantificar debido a un aumento de los valores L^* , a^* y b^* (Cuadro 5), los cuales indican que ocurrió un aclaramiento y cambio de color de verde a amarillo o naranja en este tejido, entre los días 5 y 11 y que dicho cambio fue más pronunciado en frutos tratados con etileno que en frutos no tratados y en frutos tratados con 1-MCP (Fig. 3). En este último caso, se ven reflejados los efectos reportados del etileno y 1-MCP sobre el cambio de color en la cáscara de frutos de papaya. En frutos tratados con etileno se acelera el proceso de maduración y por tanto se acelera el cambio de color debido a la degradación de la clorofila y a la síntesis de carotenoides; mientras que en frutos tratados con 1-MCP el cambio de color se retrasa, posiblemente debido a que se inhibe la degradación de clorofila y la síntesis de carotenoides (Blankenship y Dole, 2003; Sañudo-Barajas *et al.*, 2008a).

Umaña *et al.* (2011) reportaron que en la cáscara de frutos de papaya "Pococi" sin tratar, almacenados a temperatura ambiente (22°C), ocurrió un incremento en el porcentaje de amarillamiento entre los días 5 y 9 del almacenamiento, lo cual coincide con lo observado para los frutos tratados con etileno y sin tratar, almacenados a 18-20°C en este trabajo, ya que los frutos utilizados pertenecen a la misma variedad y se almacenaron bajo condiciones similares a Umaña *et al.*, (2011).

pH, acidez titulable y sólidos solubles

La disminución o el aumento del pH en frutos, se atribuye a un mayor o menor contenido de ácidos orgánicos (ionizados) en los tejidos vegetales respectivamente (Montalvo-González *et al.*, 2009; Rodrigo *et al.*, 2012). En la pulpa de los frutos de papaya, tratados y no tratados, la disminución significativa en el pH puede deberse a la producción de ácidos orgánicos durante el proceso de maduración. Esa producción de ácidos orgánicos fue acelerada por efecto del etileno, ya que el valor registrado de pH en la pulpa de los frutos tratados con etileno fue menor que el de los frutos no tratados o tratados con 1-MCP. Lo anterior coincide con el incremento de la acidez titulable (% ácido cítrico) en frutos tratados con etileno, lo cual indica que la disminución del pH se podría asociar al incremento de ácidos orgánicos. En general, la variación del pH en frutos es inversamente proporcional a la variación de la acidez titulable, es decir, valores bajos de pH coinciden con altos valores de acidez titulable y viceversa (Montalvo-González *et al.*, 2009).

Varias razones podrían explicar el incremento de ácidos orgánicos durante el proceso de maduración en frutos de papaya. Una de las razones es que la maduración demanda mucha energía, la cual es obtenida a través del proceso de respiración celular. En dicho proceso participan diversos ácidos orgánicos (ionizados) como intermediarios del ciclo de Krebs o ciclo del ácido cítrico (citrato, isocitrato, succinato, fumarato, malato, oxalacetato, entre otros). Por lo tanto, en frutos climatéricos durante el proceso de maduración y gracias a la alta tasa respiratoria y metabólica, existe mayor contenido de ácidos orgánicos (Pinto *et al.*, 2006; Rodrigo *et al.*, 2012). Otra razón es el proceso mismo de degradación de las paredes celulares necesario para el suavizamiento de los frutos. La degradación de paredes celulares provoca la liberación de ácidos orgánicos como el ácido galacturónico (liberado por la actividad de la enzima poligalacturonasa) (Pinto *et al.*, 2006; Almeida-Castro *et al.*, 2011). Finalmente, una tercera razón es la síntesis autocatalítica del etileno, la cual genera una alta concentración de ACC

(que es un ácido) en tejidos de frutos que han madurado por completo, ya que en estos frutos la actividad enzimática de la ACC oxidasa es menor (De la Cruz *et al.*, 2010).

Lo anterior, podría explicar la disminución del pH y el aumento de la acidez titulable (% ácido cítrico) observados en los frutos de papaya "Pococi" tratados con etileno (Cuadro 6), dado que los efectos de la aplicación exógena de esta hormona en los frutos climatéricos consisten en el adelanto de la explosión de la tasa respiratoria, mayor suavizamiento del fruto y aumento de la concentración endógena de ACC. Asimismo, el uso de inhibidores de la síntesis de etileno o de su acción, las bajas temperaturas y las atmósferas ricas en CO₂, retrasan la explosión de la tasa respiratoria, el suavizamiento y la síntesis autocatalítica de etileno (Rodrigo *et al.*, 2012). Lo anterior también podría explicar porqué los frutos de papaya "Pococi" tratados con 1-MCP y no tratados presentaron mayor pH y menor acidez titulable (% ácido cítrico) en comparación con los frutos tratados con etileno.

Los sólidos solubles no mostraron variaciones entre tratamientos ni en el tiempo. Lo anterior coincide con los resultados obtenidos por Bron y Jacomillo (2006) y Umaña *et al.* (2011), ya que ambos grupos de investigadores observaron pocos cambios poscosecha en los sólidos solubles de frutos de papaya de las variedades "Golden" y "Pococi" con diferentes grados de madurez, almacenados a temperatura ambiente (22-23°C). Los pocos cambios observados en los sólidos solubles entre los tratamientos y en el tiempo, pueden atribuirse a que los frutos de papaya "Pococi" al igual que los frutos de papaya "Golden" y "Maradol", dejan de acumular azúcares una vez que han sido cosechados y presentan bajo contenido de almidón que pueda ser hidrolizado en azúcares para la obtención de energía durante la maduración (Bron y Jacomillo, 2006; De la Cruz *et al.*, 2010). Umaña *et al.* (2011) reportaron que durante el almacenamiento, a temperatura ambiente, de frutos de papaya "Pococi" cosechados con diferentes grados de maduración, los frutos alcanzaron un valor máximo de sólidos solubles de 10,8

grados; valores similares fueron obtenidos en este estudio (Cuadro 6), ya que los frutos utilizados pertenecen a la misma variedad y se almacenaron bajo condiciones similares.

Acumulación de transcritos y correlación con pérdida de firmeza

Poligalacturonasa

La poligalacturonasa cataliza la hidrólisis de los enlaces galacturonanos (enlaces del ácido galacturónico) de pectinas que forman parte de la pared celular. Durante la maduración de frutos de papaya "Pococi", el ARNm del gen de la poligalacturonasa se acumuló en los tejidos de los frutos tratados con etileno y sin tratar, pero no en frutos tratados con 1-MCP, tanto en la pulpa como en la cáscara (Figuras 4 y 5). Además, tanto en el testigo como en frutos tratados con etileno se evidenció un incremento tardío en la acumulación de transcritos del gen en la cáscara, en comparación con la pulpa, lo cual coincide con el patrón de maduración y suavizamiento del fruto de adentro hacia afuera (Lazan *et al.*, 1995).

Adicionalmente, la transcripción de dicho gen se correlacionó negativamente con la firmeza durante la maduración del fruto, tanto en pulpa como en cáscara, ya que a medida que el transcrito del gen se acumulaba, la firmeza de los frutos disminuía y viceversa (Fig. 14). Por lo tanto, el suavizamiento de los tejidos en el fruto corresponde a un aumento en la transcripción de la poligalacturonasa y posiblemente de su actividad enzimática.

Sañudo-Barajas *et al.* (2008b) mostraron que durante el suavizamiento de frutos de papaya "Maradol" tratados con etefón, la solubilización de la pared celular y la depolimerización de las pectinas fue mayor que en frutos tratados con 1-MCP y atribuyeron dicha depolimerización a la degradación extensiva de homogalacturonanos y liberación de oligómeros acídicos, lo cual sugirió la

participación de la enzima poligalacturonasa en el proceso de suavizamiento de los frutos. Más tarde, Fabi *et al.* (2009) reportaron la expresión de un gen que codifica para la poligalacturonasa durante la maduración de frutos de papaya del cultivar "Golden" y correlacionaron indirectamente la expresión de dicho gen con la actividad enzimática de la poligalacturonasa y la pérdida de firmeza del fruto.

Sin embargo, otros investigadores (Thumdee *et al.*, 2007 y 2010) no lograron correlacionar directamente el ablandamiento de frutos de papaya del cultivar "Sunset" con la actividad de la poligalacturonasa, pero sí con la actividad de otras enzimas, y atribuyeron el no ablandamiento de frutos tratados con 1-MCP del mismo cultivar a una supresión total de la actividad de la enzima endoxilanasas, pero no de la poligalacturonasa. En este estudio se muestra una fuerte disminución de la transcripción del gen de la poligalacturonasa, y no de la endoxilanasas, en frutos de papaya "Pococi" tratados con 1-MCP, lo cual podría ser la causa real de que estos frutos no se ablanden.

Está demostrado que en tomate (*Solanum lycopersicum* L.), el gen de la poligalacturonasa se expresa y el ARNm perteneciente a este gen se acumula como respuesta al etileno (endógeno y exógeno) y por lo tanto se considera como un gen dependiente y regulado positivamente por dicha hormona (Sitrit y Bennett, 1998). El etileno es una hormona percibida en las plantas por una familia de receptores transmembranales, ubicados en la membrana del retículo endoplasmático, denominados ETRs (*ethylene receptors*, por sus siglas en inglés). Dichos receptores tienen una serie de características que les permiten transmitir una señal al percibir etileno. La transducción de la señal, al percibir etileno, culmina con la expresión de factores de transcripción ERFs (*ethylene response factors*, por sus siglas en inglés). Estos factores de transcripción ERFs inducen a su vez la expresión de otros genes considerados dependientes del etileno que participan en diferentes respuestas a la hormona, entre ellas el proceso de maduración de frutos (Handa *et al.*, 2012).

En este estudio, se encontró que la transcripción del gen de la poligalacturonasa en frutos de papaya "Pococi" es inhibida por el 1-MCP. Si el 1-MCP bloquea la percepción del etileno (endógeno) por unión irreversible al receptor (Blankenship y Dole, 2003), la señal del etileno (endógeno o exógeno) no se transmite y, por ende, el gen de la poligalacturonasa no se traduce a proteína y los frutos no se suavizan. Li *et al.* (2013) estudiaron la expresión de cuatro genes pertenecientes a la familia de ERFs en papaya y demostraron que el tratamiento con 1-MCP inhibió la expresión de un gen que codifica para un factor de transcripción ERF denominado *CpERF2*, mientras que el etileno estimuló su expresión. Lo anterior, apoya la teoría de que el 1-MCP modifica la transducción de la señal del etileno y por ende la transcripción de los genes que el etileno regula.

El efecto del 1-MCP ha sido descrito como irreversible en frutos de papaya (Sañudo-Barajas *et al.*, 2008a), al igual que ocurre en manzanas (Dal Cin *et al.*, 2005). Un estudio comparativo de los efectos del 1-MCP entre manzanas y melocotones, reveló que la manzana no perdía firmeza después de la aplicación de 1-MCP; mientras que los melocotones sí perdían firmeza y se suavizaban normalmente después del período de incubación en 1-MCP. La diferencia observada entre la manzana y los melocotones fue atribuida a que en la manzana no se registraba actividad poligalacturonasa después de la aplicación de 1-MCP; mientras que en los melocotones la actividad de esta enzima se recuperaba rápidamente posterior al período de incubación con 1-MCP (Dal Cin *et al.*, 2005). De esa forma, la disminución observada de la transcripción del gen que codifica esta enzima en frutos de papaya "Pococi" tratados con 1-MCP, podría ser una de las razones que expliquen el efecto irreversible del compuesto sobre la firmeza del fruto.

Por lo tanto, los resultados de investigaciones previas, en conjunto con el presente estudio, sugieren que la transcripción del gen que codifica para la enzima poligalacturonasa y su posterior actividad es fundamental durante el proceso de suavizamiento de frutos de papaya, incluyendo al cultivar "Pococi" y

que la transcripción de dicho gen es reprimida por el 1-MCP y por lo tanto, la poligalacturonasa debe considerarse como una enzima cuyo gen es dependiente del etileno, al igual que ocurre en el caso del tomate; es decir, el etileno regula positivamente la expresión de este gen en los frutos de papaya.

Sin embargo, la transcripción de este gen y su posterior actividad poligalacturonasa no deben considerarse como los únicos factores responsables del proceso de suavizamiento de los frutos de papaya "Pococi", dado que existieron diferencias en el patrón de pérdida de firmeza entre frutos tratados con etileno y frutos testigo, pero no existieron diferencias en cuanto al patrón de transcripción de este gen entre frutos tratados con etileno y frutos testigo; lo que indicaría que en el proceso de la pérdida de firmeza en frutos tratados con etileno estarían influyendo otros factores, como genes codificantes para otras enzimas hidrolíticas cuyo estudio de transcripción no fue incluido en esta investigación.

Adicionalmente, el sistema por medio del cual el etileno regula la transcripción del gen de la poligalacturonasa en los frutos de papaya podría ser diferente al sistema de factores de transcripción ERFs descritos anteriormente, ya que se sabe que dichos factores de transcripción reconocen e interaccionan con secuencias conservadas denominadas cajas GCC (*GCC box*, en inglés) en los promotores de los genes considerados dependientes del etileno (Handa *et al.*, 2012) y dicha secuencia no se encuentra descrita en el promotor del gen de la poligalacturonasa de papaya estudiado (Fabi *et al.*, 2009). Por lo tanto, pueden existir otros factores de transcripción diferentes a los ERFs en papaya u otros elementos diferentes a la caja GCC en el promotor del gen de la poligalacturonasa de papaya que sean reconocidos por los factores de transcripción para controlar la expresión del gen en respuesta al etileno (exógeno y endógeno). Lo anterior requerirá de estudios posteriores, utilizando frutos de papaya como modelos de estudio.

En conclusión, los resultados de esta investigación sugieren que una posible estrategia para prolongar la vida poscosecha y retrasar el proceso de suavizamiento en frutos de *C. papaya* cultivar "Pococi", podría ser el silenciamiento de los genes que codifican para poligalacturonasas por medio de la tecnología del ARNi (ARN interferente), ya que la represión de la transcripción del gen coincide con el mantenimiento de la firmeza del fruto.

En tomate ya se ha utilizado la estrategia de silenciamiento de la expresión del gen de la poligalacturonasa para alargar la vida poscosecha de los frutos, pero esta misma estrategia no ha sido utilizada hasta la fecha en papaya (Kramer y Redenbaugh, 1994). El tomate FLAVR SAVR™ constituye un ejemplo de un organismo genéticamente modificado exitosamente comercializado, cuya vida poscosecha logró alargarse por medio de ARNi para silenciar el gen de la poligalacturonasa (Kramer y Redenbaugh, 1994).

La información generada por esta investigación también sugiere que el estudio de los factores de transcripción (represores o activadores) que regulan la transcripción del gen de la poligalacturonasa en *C. papaya*, y que hasta la fecha no se conocen, podría resultar útil para modificar genéticamente plantas de papaya, controlar el suavizamiento del fruto y alargar su vida poscosecha.

Además del uso de la ingeniería genética como estrategia para retrasar la pérdida de firmeza en los frutos, podría indagarse la presencia de marcadores moleculares dentro de los genes que codifican para enzimas poligalacturonasas en diferentes cultivares de papaya, y detectar polimorfismos o mutaciones que puedan ser utilizadas en programas de mejoramiento genético dirigidos por marcadores moleculares.

Endoxilanasas

La endoxilanasas cataliza la hidrólisis de hemicelulosas que forman parte de la pared celular, específicamente los enlaces β -1,4-xilosil de los xilanos y

arabinoxilanos (Manenoi y Paull, 2007b). En frutos del cultivar "Pococi" el gen de la endoxilanasas se transcribió y el ARNm del gen se acumuló en los tejidos (pulpa y cáscara) de los frutos tratados con etileno y sin tratar, pero dicha acumulación fue menor en los tejidos de frutos tratados con 1-MCP (Figuras 6 y 7). La acumulación de transcritos de este gen también se correlacionó negativamente con la firmeza en la pulpa (Fig. 15A), pero no ocurrió lo mismo en la cáscara (Fig. 15B). Por consiguiente, el suavizamiento de la pulpa en el fruto implica un aumento en la transcripción del gen de la endoxilanasas y viceversa. La baja correlación observada en el caso de la cáscara, en comparación con la de la pulpa, posiblemente se deba al hecho de que el fruto de papaya madura desde el interior hacia el exterior y en la cáscara de los frutos muestreados (ensayo II) la transcripción en la cáscara aún era baja al momento de tomar las muestras, en comparación con la pulpa (Lazan *et al.*, 1995).

Manenoi y Paull (2007b) estudiaron la expresión del gen que codifica para la endoxilanasas en frutos de papaya de diferentes cultivares ("Line 8", "Line 4-16" y "Sunset") y lograron correlacionar negativamente su expresión y acumulación con la firmeza de los frutos. Además, determinaron que durante el proceso de maduración la expresión del gen, la cantidad de la enzima y su actividad aumentaron de forma similar en todos los cultivares; sin embargo, al someter los frutos a tratamientos con 1-MCP ocurría lo contrario y atribuyeron el efecto del 1-MCP sobre la firmeza de los frutos a una represión total del gen de la endoxilanasas.

Thumdee *et al.* (2007 y 2010) también estudiaron la actividad enzimática de la endoxilanasas durante la maduración de frutos de papaya del cultivar "Sunset" y su relación con el proceso de suavizamiento en frutos tratados y no tratados con 1-MCP. Como resultado, lograron correlacionar negativamente la actividad de la endoxilanasas del mesocarpo con la firmeza medida sobre la cáscara de los frutos. Además, confirmaron que la actividad de la enzima endoxilanasas era suprimida

totalmente en los frutos tratados con 1-MCP y atribuyeron el efecto del 1-MCP a una represión de la expresión de dicho gen.

Sin embargo, en el presente estudio no se logró confirmar una represión total de la transcripción del gen de la endoxilanasas en la pulpa o en la cáscara de frutos de papaya "Pococi" tratados con 1-MCP. Únicamente se observó un retraso de la transcripción en comparación con frutos tratados con etileno y no tratados. Pero el gen de la endoxilanasas sí se transcribe y llega a nivelarse e igualar con el transcurso del tiempo la transcripción en los frutos tratados con etileno, tanto en la pulpa como en la cáscara. Por lo tanto, los resultados obtenidos en frutos de papaya "Pococi" no coinciden con lo obtenido en otros cultivares y reportado por diferentes investigadores y sugieren que la endoxilanasas es una enzima cuyo gen no es totalmente dependiente o regulado por el etileno, como en el caso de la poligalacturonasa. Lo anterior requerirá de estudios posteriores, utilizando frutos de papaya como modelos de estudio.

Por otro lado, esta investigación comprueba que una menor acumulación inicial de transcritos del gen de la endoxilanasas contribuye con el mantenimiento de la firmeza en los frutos de papaya de la variedad "Pococi" tratados con 1-MCP y por lo tanto, tanto la poligalacturonasa como la endoxilanasas juegan un papel fundamental para regular el suavizamiento de frutos de papaya de este cultivar.

En conclusión, los resultados de esta investigación sugieren que una posible estrategia para prolongar la vida poscosecha y retrasar el proceso de suavizamiento en frutos de *C. papaya* cultivar "Pococi", podría ser el silenciamiento de los genes que codifican para endoxilanasas por medio de la tecnología del ARNi, ya que la represión inicial de la transcripción del gen coincide con el mantenimiento de la firmeza del fruto.

Además del uso de la ingeniería genética como estrategia para retrasar la pérdida de firmeza en los frutos, al igual que en el caso de la poligalacturonasa, podría indagarse la presencia de marcadores moleculares dentro de los genes que

codifican para enzimas endoxilanasas en diferentes cultivares de papaya, y detectar polimorfismos o mutaciones que puedan ser utilizadas en programas de mejoramiento genético dirigidos por marcadores moleculares.

Sin embargo, la transcripción de este gen y su posterior actividad endoxilanasas no deben considerarse como los únicos factores responsables del proceso de suavizamiento de los frutos de papaya "Pococi", dado que al igual que en el caso del gen descrito anteriormente, existieron diferencias en el patrón de pérdida de firmeza entre frutos tratados con etileno y el testigo, pero no existieron diferencias en cuanto al patrón de transcripción de este gen entre frutos tratados con etileno y el testigo; lo que indicaría que en el proceso de la pérdida de firmeza en frutos tratados con etileno estarían influyendo otros factores.

Pectinesterasa

Las pectin-metilesterasas o pectinesterasas son enzimas que remueven los grupos metilo de las pectinas esterificadas (homogalacturonanos o ramnogalacturonanos) y participan en la expansión de la pared celular. Actualmente, se acepta que el patrón y distribución de estos grupos metilo afecta las propiedades y características de la pared celular como respuesta a diversos estímulos. De hecho la actividad de otras hidrolasas, como la poligalacturonasa y las pectatoliasas, dependen de ciertos patrones de metilación. La poligalacturonasa por ejemplo, cataliza la hidrólisis de los enlaces galacturonanos sólo si previamente han sido demetilados (Brummell y Harpster, 2001; Wolf *et al.*, 2012). Por lo tanto, es de esperarse que la transcripción del gen de la pectinesterasa y actividad enzimática de dicha enzima ocurra de forma temprana en comparación con la transcripción de genes que codifican para otras enzimas hidrolasas y que la transcripción inicial de la pectinesterasa en los tejidos sea indicador de una predisposición al suavizamiento de los mismos, ya que la

actividad de la poligalacturonasa por ejemplo, depende del grado de metilación de las pectinas.

Fabi *et al.* (2010) dilucidaron la expresión de distintos genes involucrados en el proceso de maduración de frutos de papaya del cultivar "Golden" sometidos a un tratamiento con etileno y entre ellos encontraron el transcrito del gen que codifica para la enzima pectinesterasa. Según el estudio, la expresión del gen de la pectinesterasa se reprimió durante la maduración de los frutos de papaya tratados con etileno a diferencia de aquellos que fueron tratados con 1-MCP. En frutos de papaya del cultivar "Pococí", ocurrió algo similar.

Recientemente, Fabi *et al.* (2012) por medio de la técnica de microarreglos validada por PCR en tiempo real, observaron la represión de dos genes que codifican pectimetilesterasas (*PME1* y *PME2*) en frutos de papaya "Golden" sin tratar, y dicha represión ocurría en los frutos a tan sólo dos días después de haber sido cosechados.

En el presente estudio, la transcripción del gen de la pectinesterasa en frutos de papaya "Pococí" se reprimió en el tratamiento con etileno, tanto en la pulpa como en la cáscara y posteriormente en frutos tratados con 1-MCP en la pulpa y en frutos no tratados (Figuras 8 y 9). Lo anterior, sugiere la transcripción temprana del gen de la pectinesterasa durante la maduración de los frutos de papaya, puesto que no se logró detectar un aumento y acumulación del transcrito del gen en el estado de maduración en el que se encontraban los frutos estudiados y que el etileno logró adelantar la observación de la inhibición de la expresión de este gen. También sugiere que la transcripción del gen de la pectinesterasa podría no ser dependiente del etileno o que por el contrario, el etileno regule negativamente su transcripción, al contrario de lo que ocurre con el gen de la poligalacturonasa. De esa forma, la poligalacturonasa actuaría únicamente sobre pectinas que han sido previamente demetiladas (Brummell y Harpster, 2001; Wolf *et al.*, 2012).

Al analizar la correlación entre el suavizamiento de los tejidos y la acumulación del transcrito del gen de la pectinesterasa se confirma que durante la maduración del fruto de papaya "Pococi" la transcripción de dicho gen no se correlacionó con la firmeza en la pulpa (Fig. 16A), pero se correlacionó positivamente con la firmeza en la cáscara (Fig. 16B). Lo anterior se explicaría debido al patrón de maduración existente en el fruto de papaya. La cáscara en frutos de papaya madura posterior a la pulpa, y por lo tanto pierde firmeza en forma tardía; mientras que la pulpa se suaviza más rápido (Lazan *et al.*, 1995). Por lo tanto, lo observado sugiere que los tejidos del fruto de papaya requieren la transcripción del gen de la pectinesterasa antes de comenzar a perder su firmeza (predisposición al suavizamiento) y una vez que se han suavizado por completo la transcripción del gen es menor. Si la cáscara se suaviza posterior a la pulpa es de esperarse que el ARNm del gen se acumule en mayor medida en frutos más firmes o en frutos con un grado de madurez menor que en frutos menos firmes o con grado de madurez avanzado.

En conclusión, los resultados de esta investigación sugieren que una posible estrategia para prolongar la vida poscosecha y retrasar el proceso de suavizamiento en frutos de *C. papaya* cultivar "Pococi" podría ser el silenciamiento de los genes que codifican para pectimetilesterasas por medio de la tecnología del ARNi, ya que la pectimetilesterasa no catalizaría la demetilación de las pectinas y a su vez éstas últimas no serían degradadas por las poligalacturonasas en forma posterior.

Además del uso de la ingeniería genética como estrategia para retrasar la pérdida de firmeza en los frutos, también podría indagarse la presencia de marcadores moleculares dentro de los genes que codifican para enzimas pectimetilesterasas en diferentes cultivares de papaya, y detectar polimorfismos o mutaciones que puedan ser utilizadas en programas de mejoramiento genético dirigidos por marcadores moleculares.

Expansina

La expansina es una proteína no catalítica, que ha sido asociada con el proceso de ablandamiento de la pared celular de frutos de papaya de montaña (*Vasconcellea pubescens*). Esta proteína induce la expansión de las paredes celulares, mediante la interrupción de puentes de hidrógeno entre las microfibrillas de celulosa y otros polisacáridos de la pared (hemicelulosas y pectinas), permitiendo el acceso de diferentes enzimas a sus respectivos sustratos (Cosgrove, 2005; Gaete-Eastman *et al.*, 2009). Lo anterior sugiere una participación temprana durante el proceso de maduración y pérdida de firmeza de los frutos, al igual que ocurre con la pectinesterasa.

En la pulpa de frutos de papaya "Pococi" la acumulación del transcrito del gen de la expansina disminuyó en todos los casos con el transcurso del tiempo; sin embargo, en frutos sin tratar la represión de la transcripción fue mayor al final del período evaluado en comparación con los tratamientos (Figuras 10 y 11). Tampoco se encontró correlación entre la transcripción del gen de la expansina y la firmeza de los frutos en ningún caso (Fig. 17).

Gaete-Eastman *et al.* (2009) secuenciaron un gen de expansina en papaya de montaña, estudiaron su expresión durante la maduración del fruto y su relación con la producción de etileno. El grupo concluyó que este gen se expresaba durante el proceso de maduración como respuesta a la síntesis de etileno y por ende participaba en el ablandamiento del fruto. Sin embargo, los resultados de la presente investigación no concuerdan con los resultados obtenidos por ellos, ya que no se logró concluir que el gen se transcriba como respuesta al etileno y tampoco se encontró correlación entre el suavizamiento del fruto y la transcripción de este gen.

Lo anterior puede ser indicio de que la transcripción del gen que codifica para esta expansina en los frutos de *C. papaya* cultivar "Pococi" no es totalmente dependiente del etileno o esta hormona no regula positiva ni negativamente su

expresión, contrario al caso reportado de la papaya de montaña, y que participa en forma muy temprana en el proceso al igual que la pectimetilesterasa, lo cual explica la observación del incremento en la acumulación del transcrito en la cáscara de los frutos de Pococí en este estudio ya que la cáscara pierde su firmeza en forma posterior a la pulpa, debido al patrón de maduración de la papaya, como se indicó anteriormente (Lazan *et al.*, 1995).

Otros frutos donde se ha estudiado la expresión de genes que codifican para proteínas expansinas revelan que las expansinas corresponden a una familia multigénica compleja y que la expresión de los diferentes genes varía entre especies, variedades e incluso tejidos celulares distintos en una misma variedad. Adicionalmente, no todas las expansinas se relacionan a la maduración de frutos y la expresión no siempre se encuentra regulada por el etileno (Figueroa *et al.*, 2009). Por ejemplo, en fresa (*Fragaria x ananassa*) se han identificado siete genes que codifican para expansinas (*FaEXP1* a *FaEXP7*) y de éstos, *FaEXP2* y *FaEXP5* se sobreexpresan durante la maduración del fruto en forma diferencial entre variedades y se correlacionan con la pérdida de firmeza, pero el caso de los demás genes varía. Algunos se reprimen a medida que el fruto madura y otros sólo se expresan en ciertas etapas del desarrollo del fruto e inclusive hay algunos que no se expresan en el fruto, pero sí en otros tejidos de las plantas (Civello *et al.*, 1999; Harrison *et al.*, 2001; Dotto *et al.*, 2006).

En tomate (*Solanum lycopersicum*), se han identificado siete genes que codifican para expansinas (*Exp1* a *Exp7*) y de éstos, *Exp1* se sobreexpresa durante la maduración del fruto y es regulado por el etileno, pero la expresión de los otros genes varía. Algunos genes se sobreexpresan en frutos verdes y dejan de expresarse en frutos maduros (Rose *et al.*, 1997; Brummell *et al.*, 1999).

Actualmente se sabe que en el genoma de *C. papaya* existen 19 genes que codifican para expansinas, pero no se sabe con certeza cuáles se transcriben específicamente en el fruto y cuáles de los que se expresan en el fruto se

sobreexpresan a medida que el fruto madura o son regulados por el etileno y cuáles se reprimen (Ming *et al.*, 2012). El gen de la expansina estudiado en la variedad "Pococi" se reprimió en la pulpa, pero su transcrito se acumuló en la cáscara de los frutos; sin embargo, no se correlacionó con la firmeza del fruto. Una posible explicación a lo observado en este estudio, es que el gen estudiado no corresponda a una expansina sobreexpresada durante la maduración del fruto y que tampoco sea regulada por el etileno. Lo anterior requerirá de estudios posteriores, utilizando frutos de papaya como modelos de estudio.

Recientemente, Fabi *et al.* (2012) observaron la represión de un gen que podría codificar para una expansina durante la maduración de frutos de papaya por medio de la técnica de microarreglos. Los resultados anteriores coinciden con lo observado en este estudio para el caso de la pulpa. Sin embargo, estos investigadores realizaron una validación posterior de la técnica de microarreglos por medio de PCR en tiempo real y encontraron inconsistencias, ya que por medio de qPCR pudieron detectar la sobreexpresión de este gen durante la maduración de los frutos, lo cual no coincide con lo observado en "Pococi" (Fabi *et al.*, 2012).

En conclusión, los resultados de esta investigación sugieren que la expansina estudiada no es un gen candidato para la modificación genética de frutos de papaya por medio de la tecnología de silenciamiento con ARNi, ni tampoco constituye un gen candidato para la búsqueda de marcadores moleculares; pero sugiere que se necesita una mayor cantidad de estudios para identificar los genes que codifican para expansinas relacionadas al proceso de maduración en frutos de *C. papaya* cultivar "Pococi".

ACC deaminasa

El gen candidato que codifica para una enzima con actividad ACC deaminasa en *C. papaya* presenta homología de secuencia con respecto al gen de la ACC deaminasa encontrado en *Arabidopsis thaliana* (resultados no mostrados), lo cual

sugiere que podría ser un gen con actividad similar. En tomate, Plett *et al.* (2009) encontraron una secuencia homóloga al gen de la ACC deaminasa de *Arabidopsis*. Sin embargo, dicha secuencia no codificaba una enzima con actividad ACC deaminasa. Por lo tanto, la homología observada de la secuencia encontrada en *C. papaya* no es suficiente para corresponder a un gen que codifique una enzima con actividad ACC deaminasa en el fruto de papaya, pero corresponde a una primera aproximación.

De acuerdo con los tratamientos aplicados, el etileno pareció estimular la transcripción del gen en la cáscara de los frutos de papaya el día 7 en comparación con los días 3 y 11 (Fig. 13). Durante ese día el gen se expresó al mismo nivel que el calibrador (día 0), lo cual podría deberse a que el etileno exógeno indujo de alguna forma la transcripción de dicho gen. Estudios previos realizados en microorganismos comprueban la participación del ACC en la regulación de la expresión génica de la ACC deaminasa; por ejemplo, un incremento de la concentración de ACC induce la expresión del gen de la ACC deaminasa en *Penicillium citrinum* (Jia *et al.*, 2000). Además, la enzima ACC deaminasa presenta menor afinidad por el ACC que la enzima ACC oxidasa, por lo tanto, es de esperarse que la ACC deaminasa actúe únicamente sobre un exceso de ACC (Glick, 2005). Al aplicar etileno exógeno a una concentración de 500 $\mu\text{L/L}$ en frutos de papaya de la variedad "Maradol", De la Cruz *et al.* (2010) observaron un incremento significativo del contenido de ACC en los frutos, dado que el etileno es autocatalítico. Por lo tanto, al aplicar etileno exógeno sobre frutos de papaya de la variedad "Pococi" podría ocurrir un incremento de la concentración de ACC endógeno que explique la inducción de la transcripción del gen candidato de la ACC deaminasa en la cáscara de los frutos el día 7 (Fig. 13). Lo anterior sugiere que la regulación de la transcripción del gen de la ACC deaminasa en las plantas podría ser similar a la que ha sido descrita en los microorganismos. Sin embargo, todo esto requerirá de investigaciones posteriores.

Asumiendo que el gen estudiado codifique para la enzima ACC deaminasa en *C. papaya* cultivar "Pococi", era de esperarse que su transcripción no se correlacionara con la firmeza de los frutos (Fig. 18), ya que la enzima ACC deaminasa no participa en la degradación de las paredes celulares.

En conclusión, los resultados de esta investigación revelan que se necesita una mayor cantidad de estudios para aislar, clonar y caracterizar al gen que codifique para una enzima ACC deaminasa en *C. papaya* y cuya transcripción y expresión pueda inducirse por medio de ingeniería genética para reducir los niveles de etileno y retrasar el proceso de maduración.

Conclusiones y perspectivas

Los tratamientos con etileno y 1-MCP afectaron de diferente forma la maduración de los frutos de papaya de la variedad "Pococi". El cambio de color y de firmeza observados, así como los cambios de pH y acidez titulable, fueron los indicadores de que se adelantó la maduración de frutos tratados con etileno y se retrasó la maduración de frutos tratados con 1-MCP.

Por efecto del etileno, los frutos perdieron su firmeza y cambiaron de color rápidamente en comparación con los frutos no tratados. Además, el etileno ocasionó la disminución en el pH y el aumento de la acidez titulable (% ácido cítrico) de la pulpa, probablemente debido a un incremento de la síntesis de ácidos orgánicos, pero no afectó el contenido de azúcares (grados brix).

Por efecto del 1-MCP, los frutos no se suavizaron ni cambiaron de color tan rápidamente como los frutos no tratados. Sin embargo, el 1-MCP no afectó el pH ni la acidez titulable (% ácido cítrico) o el contenido de azúcares (grados brix) de la pulpa.

La transcripción de los genes de las enzimas poligalacturonasa y endoxilanasas parece jugar un papel fundamental durante el proceso de suavizamiento de frutos de papaya del cultivar "Pococi". La acumulación de transcritos de estos genes se correlacionó negativamente con la firmeza de los tejidos y se observó una disminución en la acumulación de transcritos de dichos genes en frutos tratados con 1-MCP. Sin embargo, la transcripción de estos genes no deben considerarse como los únicos factores responsables del proceso de suavizamiento de los frutos de papaya "Pococi", dado que pueden transcribirse genes codificantes para otras enzimas hidrolíticas que no fueron incluidos en esta investigación.

La transcripción del gen de la poligalacturonasa en frutos de papaya "Pococi" es probablemente dependiente del etileno, a diferencia del gen de la endoxilanasas,

ya que se observó una total represión del transcrito del gen de la poligalacturonasa por medio del tratamiento con 1-MCP; mientras que para el gen de la endoxilanasas sólo se observó un retraso en la acumulación del transcrito en este tratamiento.

La pectinesterasa podría participar en forma temprana durante la maduración de frutos de papaya del cultivar "Pococi", debido a que la acumulación de transcritos del gen que codifica para la enzima disminuyó significativamente a lo largo del tiempo. Además, la acumulación de transcritos del gen se correlacionó positivamente con la firmeza de la cáscara pero no de la pulpa, siendo la cáscara el tejido que pierde su firmeza en forma más tardía en los frutos de papaya.

La transcripción del gen de la pectinesterasa en frutos de papaya "Pococi" no parece ser dependiente del etileno. A diferencia del gen de la poligalacturonasa, puede ser que el etileno no regule su transcripción o la regule negativamente.

La transcripción del gen de la expansina no parece verse afectada por los tratamientos y tampoco se correlacionó con la firmeza. Posiblemente el gen estudiado está menos relacionado al proceso de maduración y suavizamiento de frutos de papaya del cultivar "Pococi". Otra posibilidad es que el gen estudiado participa en forma muy temprana, lo cual no permitió observar cambios significativos producidos por los diferentes tratamientos en este estudio o que el gen estudiado no corresponde a la expansina que participa en el proceso de maduración y pérdida de firmeza de los frutos de papaya. Lo anterior requerirá de mayor cantidad de investigaciones.

Existe evidencia que apoya la existencia de un gen que codifica para una enzima con actividad ACC deaminasa en *C. papaya*, ya que existe una secuencia en *C. papaya* que presenta homología al gen de la ACC deaminasa de *A. thaliana*. Sin embargo, el patrón de transcripción observado en este estudio no permitió confirmar que el gen candidato corresponda al gen de la enzima ACC deaminasa. Lo anterior requerirá de estudios posteriores.

Finalmente, la transformación genética de *C. papaya* cultivar "Pococí" con ARNi para silenciar los genes que codifican para las enzimas poligalacturonasa, endoxilanasas y/o pectinesterasa, constituyen posibles estrategias futuras para el mantenimiento de la firmeza de los frutos por más tiempo y la reducción de las pérdidas poscosecha. Así mismo, la búsqueda de marcadores moleculares relacionados con los genes de las enzimas poligalacturonasa, endoxilanasas y/o pectinesterasa puede constituir una alternativa para el mejoramiento genético de la papaya en este aspecto.

Literatura citada

- Almeida-Castro, A.; Reis-Pimentel, J.D.; Santos-Souza, D.; Vieira-de Oliveira, T.; da Costa-Oliveira, M. 2011. Estudio de la conservación de la papaya (*Carica papaya* L.) asociado a la aplicación de películas comestibles. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 2: 49-60.
- AOAC. 2005. Official methods of analysis of AOAC International. Editores: Horwitz, W. y Latimer, G.W. Editorial AOAC International. 18th edición. Gaithersburg, Maryland, Estados Unidos de América.
- Arauz, L.F.; Mora, D. 1983. Evaluación preliminar de los problemas de poscosecha en 6 frutas tropicales de Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 7: 43-56.
- Argueso, C.T.; Hansen, M.; Kieber, J.J. 2007. Regulation of ethylene biosynthesis. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26: 92-105.
- Bapat, V.A.; Trivedi, P.K.; Ghosh, A.; Sane, V.A.; Ganapathi, T.R.; Nath, P. 2010. Ripening of fleshy fruit: molecular insight and the role of ethylene. *Biotechnology Advances*, 28: 94-107.
- Blankenship, S.M.; Dole, J.M. 2003. 1- Methylcyclopropene: a review. *Postharvest Biology and Technology*, 28: 1-25.
- Bron, I.U.; Jacomillo, A.P. 2006. Ripening and quality of "Golden" papaya fruit harvested at different maturity stages. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18: 389-396.
- Bron, I.U.; Jacomillo, A.P. 2009. Ethylene action blockade and cold storage affect ripening of "Golden" papaya fruit. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31: 1165-1173.

- Brummell, D.A.; Harpster, M.H.; Dunsmuir, P. 1999. Differential expression of expansin gene family members during growth and ripening of tomato fruit. *Plant Molecular Biology*, 39: 161-169.
- Brummell, D.A.; Harpster, M.H. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*; 47: 311-340.
- Brunner, A.M.; Yakovlev, I.A; Strauss, S.H. 2004. Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biology*; 4:14.
- Bustin, S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*; 25: 16-193.
- Bustin, S.A.; Benes, V.; Nolan, T.; Pfaffl, M.W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*; 34: 597-601.
- Cano, M.P; Lobo, M.G.; de Ancos, B.; M. Galeazzi, M.A. 1996. Polyphenol oxidase from Spanish hermaphrodite and female papaya fruits (*Carica papaya* Cv. Sunrise, Solo Group). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 3075-3079.
- Chen, Y.T.; Lee, Y.R.; Yang, C.Y.; Wang, Y.T.; Yang, S.F.; Shaw, J.F. 2003. A novel papaya ACC oxidase gene (CP-ACO2) associated with late stage fruit ripening and leaf senescence. *Plant Science*, 164: 531-540.
- Chen, N.J.; Paull, R.E. 2003. Endoxylanase expressed during papaya fruit ripening: purification, cloning and characterization. *Functional Plant Biology*, 30: 433-441.
- Chen, N.J.; Manenoi, A.; Paull, R.E. 2007. Papaya postharvest physiology and handling-problems and solutions. *Acta Horticulturae*, 740: 285-293.
- Civello, P.M.; Powell, A.L.T.; Sabehat, A.; Bennett, A.B. 1999. An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit. *Plant Physiology*, 121: 1273-1279.

- CNP (Consejo Nacional de Producción). 2012. Análisis de mercados de papaya. <http://web.cnp.go.cr/images/SIIM/analisis/frutas/papaya/A_papaya_01_06-12.pdf> (08/06/2013).
- Cosgrove, D.J. 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6: 850-861.
- Dal Cin, V.; Rizzini, F.M.; Botton, A.; Ziliotto, F.; Danesin, M.; Tonutti, P. 2005. Different response of apple and peach fruits to 1-MCP: a case of different sensitivity to ethylene?. *Acta Horticulturae*, 682: 321-328.
- De la Cruz, J.; Vela, G.; Dorantes, L.; García, H.S. 2010. Efecto del etileno sobre el ACC y ACC oxidasa en la maduración de papaya "Maradol". *Revista Fitotecnia Mexicana*, 33: 133-140.
- Deepak, S.A.; Kottapalli, K.R.; Rakwal, R.; Oros, G.; Rangappa, K.S.; Iwahashi, H.; Masuo, Y.; Agrawal, G.K. 2007. Real-Time PCR: revolutionizing detection and expression analysis of genes. *Current Genomics*; 8: 234-251.
- Devitt, L.C.; Sawbridge, T.; Holton, T.A.; Mitchelson, K.; Dietzgen R.G. 2006. Discovery of genes associated with fruit ripening in *Carica papaya* using expressed sequence tags. *Plant Science*, 170: 356-363.
- Dorak, M.T. 2006. Real-time PCR. Editorial Taylor & Francis. New York, Estados Unidos de América. 333 p.
- Dotto, M.C.; Martínez, G.A.; Civello, P.M. 2006. Expression of expansin genes in strawberry varieties with contrasting fruit firmness. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44: 301-307.
- Fabi, J.P.; Cordenunsi, B.R.; de Mattos, G.P.; Mercadante, A.Z.; Lajolo, F.M.; do Nascimento, J.R. 2007. Papaya fruit ripening: response to ethylene and 1-methylcyclopropene (1-MCP). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 6118-6123.

- Fabi, J.P.; Cordenunsi, B.R.; Seymour, G.B.; Lajolo, F.M.; do Nascimento, J.R. 2009. Molecular cloning and characterization of a ripening-induced polygalacturonase related to papaya fruit softening. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47: 1075-1081.
- Fabi, J.P.; Mendes, L.R.B.C.; Lajolo, F.M.; do Nascimento, J.R. 2010. Transcript profiling of papaya fruit reveals differentially expressed genes associated with fruit ripening. *Plant Science*, 179: 225-233.
- Fabi, J.P.; Seymour, G.B.; Graham, N.S.; Broadley, M.R.; May, S.T.; Lajolo, F.M.; Cordenunsi, B.R.; do Nascimento, J.R. 2012. Analysis of ripening-related gene expression in papaya using an *Arabidopsis*-based microarray. *BMC Plant Biology*, 12: 242.
- FAO (Food and Agricultural Organization of the United Nations). 2011. FAOSTAT. <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>> (05/01/2012).
- Figuerola, C.R.; Pimentel, P.; Dotto, M.C.; Civello, P.M.; Martínez, G.A.; Herrera, R.; Moya-León, M.A. 2009. Expression of five expansin genes during softening of *Fragaria chiloensis* fruit: effect of auxin treatment. *Postharvest Biology and Technology*, 53: 51-57.
- Gachon, C.; Mingam, A.; Charrier, B. 2004. Real-time PCR: what relevance to plant studies. *Journal of Experimental Botany*; 55: 1445-1454.
- Gaete-Eastman, C.; Figuerola, C.R.; Balbontín, C.; Moya, M.; Atkinson, R.G.; Herrera, R.; Moya-León, M.A. 2009. Expression of an ethylene-related expansin gene during softening of mountain papaya fruit (*Vasconcellea pubescens*). *Postharvest Biology and Technology*, 53: 58-65.
- Gapper, N.E.; McQuinn, R.P.; Giovannoni, J.J. 2013. Molecular and genetic regulation of fruit ripening. *Plant Molecular Biology*, 82: 575-591.

- Ginzinger, D.G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30: 503-512.
- Glick, B.R. 2005. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters*, 251: 1-7.
- Glick, B.R.; Cheng, Z.; Czarny, J.; Duan, J. 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *European Journal of Plant Pathology*, 119: 329-339.
- Goulao, L.F.; Oliveira, C.M. 2008. Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Trends in Food Science and Technology*, 19: 4-25.
- Gouveia, M.M.C.; Balde, A.; Pais, M.S.; Mooibroek, A.; Recourt, K. sin publicar. Characterization of pectinase cDNAs in fruit of *Carica papaya* L. Sometido (SEP-1996) a las bases de datos EMBL/GenBank/DDBJ. Citado en: *Secuencia de Nucleótidos*.
- Handa, A.K.; Tiznado-Hernández, M.E.; Mattoo, A.K. 2012. Fruit development and ripening: a molecular perspective. En: *Plant Biotechnology and Agriculture: prospects for the 21st century*. Editores: Altman, A. y Hasegawa, P.M. Editorial Elsevier. Londres, Reino Unido. 405-424 pp.
- Harrison, E.P.; McQueen-Mason, S.J.; Manning, K. 2001. Expression of six expansin genes in relation to extension activity in developing strawberry fruit. *Journal of Experimental Botany*, 52: 1437-1446.
- Jayawickrama, F.; Wilson-Wijeratnam, R.S.; Perera, S. 2001. The effect of selected ripening agents on organoleptic and physico-chemical properties of papaya. *Acta Horticulturae*, 553: 175-178.
- Jia, Y.J.; Ito, H.; Matsui, H.; Honma, M. 2000. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase induced by ACC synthesized and accumulated in

- Penicillium citrinum* intracellular spaces. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 64: 299-305.
- Klee, H.J.; Hayford, M.B.; Kretzmer, K.A.; Barry, G.F.; Kishore, G.M. 1991. Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. *The Plant Cell*, 3: 1187-1193.
- Kramer, M.G.; Redenbaugh, K. 1994. Commercialization of a tomato with an antisense polygalacturonase gene: the FLAVR SAVR™ tomato story. *Euphytica*, 79: 293-297.
- Krongyut, W.; Srilaong, V.; Wongs-Aree, C.; Uthairatanakij, A.; Kanlayanarat, S. 2008. Physiological and quality changes in different parts of "Red Maradol" papaya during postharvest period. *Acta Horticulturae*, 804: 363-366.
- Krongyut, W.; Srilaong, V.; Uthairatanakij, A.; Kanlayanarat, S. 2009. Relationship between flesh firmness and pectic polysaccharide content in "Red Maradol" and "Kaek-dum" papaya fruit during ripening. *Acta Horticulturae*, 837: 239-242.
- Kyndt, T.; Van Droogenbroeck, B.; Romeijn-Peeters, E.; Romero-Motochi, J.P.; Scheldeman, X.; Goetghebeur, P.; Van Damme, P.; Gheysen, G. 2005. Molecular phylogeny and evolution of Caricaceae based on rDNA internal transcribed spacers and chloroplast sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37: 442-459.
- Laurena, A.C.; Magdalita, P.M.; Hidalgo, M.S.P.; Villegas, V.N.; Mendoza, E.M.T.; Botella, J.R. 2002. Cloning and molecular characterization of ripening-related ACC synthase from papaya fruit (*Carica papaya* L.). *Acta Horticulturae*, 575: 163-169.
- Lazan, H.; Selamat, M.K.; Ali, Z.M. 1995. β -galactosidase, polygalactoturonase, and pectinesterase in differential softening and cell wall modification during papaya fruit ripening. *Physiologia Plantarum*, 95: 106-112.

- Li, X.; Zhu, X.; Mao, J.; Zou, Y.; Fu, D.; Chen, W.; Lu, W. 2013. Isolation and characterization of ethylene response factor family genes during development, ethylene regulation and stress treatments in papaya fruits. *Plant Physiology and Biochemistry*, 70: 81-92.
- López-Gómez, R.; Morales-Dominguez, F.; Mendoza-Alcázar, O.; Gómez-Lim, M.A. 2004. Identification of a genomic clone to ACC oxidase from papaya (*Carica papaya* L.) and expression studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 794-800.
- López-Gómez, R.; Cabrera-Ponce, J.L.; Saucedo-Arias, L.J.; Carreto-Montoya, L.; Villanueva-Arce, R.; Díaz-Pérez, J.C.; Gómez-Lim, M.A.; Herrera-Estrella, L. 2009. Ripening in papaya fruit is altered by ACC oxidase cosuppression. *Transgenic Research*, 18: 89-97.
- Magdalita, P.M.; Laurena, A.C.; Yabut-Perez, B.M.; Botella, J.R.; Tecson-Mendoza, E.M; Villegas, V.N. 2002. Progress in the development of transgenic papaya: transformation of Solo papaya using ACC synthase antisense construct. *Acta Horticulturae*, 575: 171-176.
- Manenoi, A.; Paull, R.E. 2007a. Effect of 1-methylcyclopropene (MCP) on papaya fruit ripening. *Acta Horticulturae*, 740: 323-326.
- Manenoi, A.; Paull, R.E. 2007b. Papaya fruit softening, endoxylanase gene expression, protein and activity. *Physiologia Plantarum*, 131: 470-480.
- Manshardt, R.M.; Drew, R.A. 1998. Biotechnology of papaya. *Acta Horticulturae*, 461: 65-74.
- Mason, M.C.; Botella, J.R. 1997. Identification and characterisation of two 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase cDNAs expressed during papaya (*Carica papaya*) fruit ripening. *Australian Journal of Plant Physiology*, 24: 239-244.

- McCafferty, H.R.K.; Moore, P.H.; Zhu, Y. J. 2008. Papaya transformed with the *Galanthus nivalis* GNA gene produces a biologically active lectin with spider mite control activity. *Plant Science*, 175: 385-393.
- Ming, R.; Hou, S.; Feng, Y.; Yu, Q.; Dionne-Laporte, A.; Saw, J.H.; Senin, P.; Wang, W.; Ly, B.V.; Lewis, K.L.T.; Salzberg, S.L.; Feng, L.; Jones, M.R.; Skelton, R.L.; Murray, J.E.; Chen, C.; Qian, W.; Shen, J.; Du, P.; Eustice, M.; Tong, E.; Tang, H.; Lyons, E.; Paull, R.E.; Michael, T.P.; Wall, K.; Rice, D.W.; Albert, H.; Wang, M.L.; Zhu, Y.J.; Schatz, M.; Nagarajan, N.; Acob, R.A.; Guan, P.; Blas, A.; Man-Wai, C.; Ackerman, C.M.; Ren, Y.; Liu, C.; Wang, J.; Wang, J.; Na, J.K.; Shakirov, E.V.; Haas, B.; Thimmapuram, J.; Nelson, D.; Wand, X.; Bowers, J.E.; Gschwend, A.R.; Delcher, A.L.; Singh, R.; Suzuki, J.Y.; Tripathi, S.; Neupane, K.; Wei, H.; Irikura, B.; Paidi, M.; Jiang, N.; Zhang, W.; Presting, G.; Windsor, A.; Navajas-Pérez, R.; Torres, M.J.; Feltus, F.A.; Porter, B.; Li, Y.; Burroughs, A.M.; Luo, M.C.; Liu, L.; Christopher, D.A.; Mount, S.M.; Moore, P.H.; Sugimura, T.; Jiang, J.; Schuler, M.A.; Friedman, V.; Mitchell-Olds, T.; Shippen, D.E.; dePamphilis, C.W.; Palmer, J.D.; Freeling, M.; Paterson, A.H.; Gonsalves, D.; Wang, L.; Alam, M. 2008. The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature*, 452: 991-996.
- Ming, R.; Yu, Q.; Moore, P.H.; Paull, R.E.; Chen, N.J.; Wang, M.L.; Zhu, Y.J.; Schuler, M.A.; Jiang, J.; Paterson, A.H. 2012. Genome of papaya, a fast growing tropical fruit tree. *Tree Genetics and Genomes*, 8: 445-462.
- Montalvo-González, E.; González-Espinoza, N.G.; García-Galindo, H.S.; Tovar-Gómez, B.; Mata-Montes de Oca, M. 2009. Efecto del etileno exógeno sobre la desverdización del chile "Poblano" en poscosecha. *Revista Chapingo*, 15: 189-197.
- Mora, E.; Bogantes, A. 2004. Evaluación de híbridos de papaya (*Carica papaya* L.) en "Pococí", Limón, Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 15: 39-44.

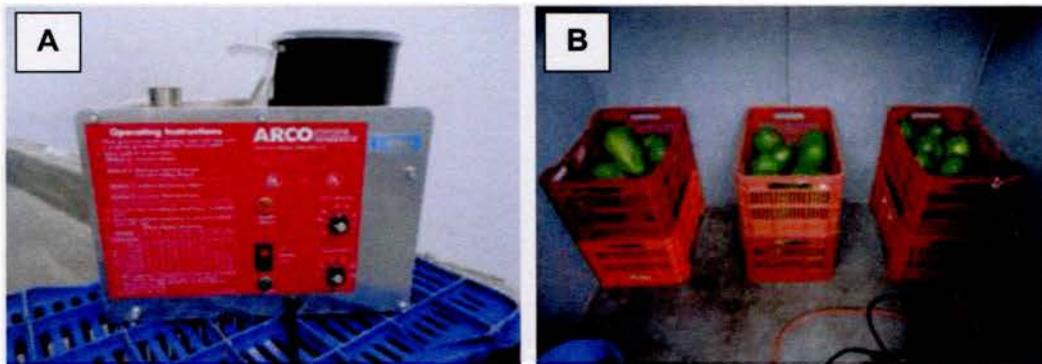
- Mora, E.; Bogantes, A. 2011. Papaya perfecta "híbrido Pococi". Análisis de Mercados: Papaya. Boletín N° 1. <http://web.cnp.go.cr/images/SIIM/analisis/frutas/papaya/2011/A_papaya_01_10-11.pdf> (08/06/2013).
- Moya-León, M.A.; Moya, M.; Herrera, R. 2004. Ripening of mountain papaya (*Vasconcellea pubescens*) and ethylene dependence of some ripening events. *Postharvest Biology and Technology*, 34: 211-218.
- Neupane, K.R.; Mukatira, U.T.; Kato, C.; Stiles, J.I. 1998. Cloning and characterization of fruit-expressed ACC synthase and ACC oxidase from papaya (*Carica papaya* L.). *Acta Horticulturae*, 461: 329-338.
- Nimitkeatkai, H.; Kakaew, P.; Kanlayanarat, S. 2008. Quality of fresh-cut ripe papaya treated with 1-methylcyclopropene. *Acta Horticulturae*, 804: 433-438.
- Niu, Y.; Shen, W.; Zhou, P.; Lu, Y.; Tang, Q. sin publicar. Cloning and sequence analysis of expansin genes in *Carica papaya* L. fruit. Sometido (APR-2006) a las bases de datos EMBL/GenBank/DDBJ. Citado en: Secuencia de Nucleótidos.
- Pfaffl, M.W. 2004. Quantification strategies in real-time PCR. En: A-Z of quantitative PCR. Editor: Bustin, S.A. International University Line (IUL). La Jolla, USA. 87-112 pp.
- Pinto, L.K.; Martins, M.L.L.; de Resende, E.D.; de Almeida, R.F.; Vitorazi, L.; Pereira, S.M. 2006. Influência da atmosfera modificada por filmes plásticos sobre a qualidade do mamão armazenado sob refrigeração. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26: 744-748.
- Plett, J.M.; McDonnell, L.; Regan, S. 2009. Plant encoded 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase activity implicated in different aspects of plant development. *Plant Signaling and Behavior*, 4: 1186-1189.

- Purwoko, B.S.; Susanto, S.; Novita, T. 2002. Studies on the physiology of polyamines and ethylene during ripening of banana and papaya fruits. *Acta Horticulturae*, 575: 651-657.
- Razali, M.; Ali, Z.M.; Lazan, H.; Othman, R.; Rahman, R.A. 2007. Quality related changes and softening enzymes activities during ripening of "Sekaki" papaya. *Acta Horticulturae*, 740: 333-335.
- Rodrigo, M.J.; Alquézar, B.; Alférez, F.; Zacarías, L. 2012. Biochemistry of fruits and fruit products. En: *Handbook of fruits and fruit processing*. Editores: Sinha, N.K.; Sidhu, J.S. Editorial John Wiley and Sons, Ltd. Segunda edición. Oxford, Reino Unido. 13-34 pp.
- Rose, J.K.C.; Lee, H.H.; Bennett, A.B. 1997. Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening regulated. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94: 5955-5960.
- Saborío, D.; Sáenz, V.; Arauz, L.F.; Bertsch, F. 2000. Efecto del calcio en aplicaciones precosecha y poscosecha sobre la severidad de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) y la calidad de frutos de papaya (*Carica papaya*). *Agronomía Costarricense*, 24: 77-88.
- Santamaría-Basulto, F.; Sauri-Duch, E.; Espadas y Gil, F.; Díaz-Plaza, R.; Larqué-Saavedra, A.; Santamaría, J.M. 2009. Postharvest ripening and maturity indices for "Maradol" papaya. *Interciencia*, 34: 583-588.
- Sañudo-Barajas, J.A.; Siller-Cepeda, J.; Osuna-Enciso, T.; Muy-Rangel, D.; López-Álvarez, G.; Labavitch, J. 2008a. Ripening control of papaya (*Carica papaya* L.) fruits with 1-methylcyclopropene and 2-cloroethyl phosphonic acid. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 31: 141-147.
- Sañudo-Barajas, A.; Siller-Cepeda, J.; Osuna-Enciso, T.; Muy Rangel, D.; López-Álvarez, G.; Osuna-Castro, J.A.; Greve, C.; Labavitch, J. 2008b. Pectin

- solubilization and depolymerization during papaya fruit softening. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 31: 149-155.
- Schweiggert, R.M.; Steingass, C.B.; Heller, A.; Esquivel, P.; Carle, R. 2011a. Characterization of chromoplasts and carotenoids of red- and yellow-fleshed papaya (*Carica papaya* L.). *Planta*, 234: 1031-1044.
- Schweiggert, R.M.; Steingass, C.B.; Mora, E.; Esquivel, P.; Carle, R. 2011b. Carotenogenesis and physico-chemical characteristics during maturation of red fleshed papaya fruit (*Carica papaya* L.). *Food Research International*, 44: 1373-1380.
- Shiga, T.M.; Fabi, J.P.; do Nascimento, J.R.; Petkowicz, C.L.; Vriesmann, L.C.; Lajolo, F.M.; Cordenunsi, B.R. 2009. Changes in cell wall composition associated to the softening of ripening papaya: evidence of extensive solubilization of large molecular mass galactouronides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 7064-7071.
- Sitrit, Y.; Bennett, A.B. 1998. Regulation of tomato fruit polygalacturonase mRNA accumulation by ethylene: a re-examination. *Plant Physiology*, 116: 1145-1150.
- Teixeira-da Silva, J.A.; Rashid, Z.; Tan Nhut, D.; Sivakumar, D.; Gera, A.; Teixeira-Sousa, M.; Tennant, P. F. 2007. Papaya (*Carica papaya* L.) biology and biotechnology. *Tree and Forestry Science and Biotechnology*, 1: 47-73.
- Thumdee, S.; Manenoi, A.; Paull, R.E. 2007. Activity of papaya fruit hidrolases during natural and modified softening. *Acta Horticulturae*, 740: 317-322.
- Thumdee, S.; Manenoi, A.; Chen, N.J.; Paull, R.E. 2010. Papaya fruit softening: role of hydrolases. *Tropical Plant Biology*, 3: 98-109.
- Umaña, G.; Loría, C.L.; Gómez, J.C. 2011. Efecto del grado de madurez y las condiciones de almacenamiento sobre las características físicoquímicas de la papaya híbrido "Pococi". *Agronomía Costarricense*, 35: 61-73.

- Volkov, R.A.; Panchuk, I.I.; Schöfl, F. 2003. Heat-stress-dependency and developmental modulation of gene expression: the potential of house-keeping genes as internal standards in mRNA expression profiling using real-time RT-PCR. *Journal of Experimental Botany*; 54: 2343-2349.
- Wang, K.L.C.; Li, H.; Ecker, J.R. 2002. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell*; 14: S131-S151.
- Wolf, S.; Hématy, K.; Höfte, H. 2012. Growth control and cell wall signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 63: 381-404.
- Wong, M.L.; Medrano, J.F. 2005. Real Time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39: 1-11.
- Yeh, S.D.; Bau, H.J.; Kung, Y.J.; Yu, T.A. 2007. Biotechnology in agriculture and forestry: papaya. Editado por: Pua, E.C. y Davey, M.R. *Transgenic Crops V*. Heidelberg, Germany. Springer. v. 60, p. 73-90.
- Yuryev, A. 2007. PCR Primer Desing. Editorial Humana Press. New Jersey, Estados Unidos de América. 431 p.
- Zhang, L.; Paull, R.E. 1990. Variation in the ripening characteristics of papaya. *Acta Horticulturae*, 269: 119-124.

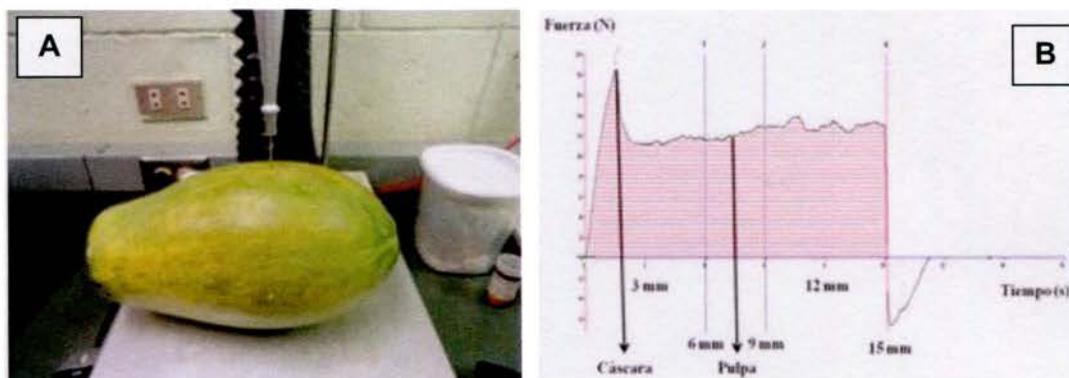
Anexos



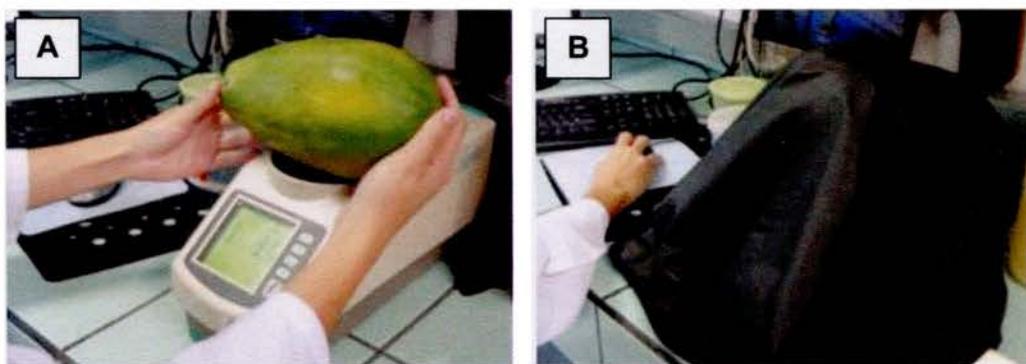
Anexo 1. Tratamiento de los frutos de papaya con 'Etileno'. A. Detalles del generador de etileno. B. Generador de etileno colocado dentro de la segunda cámara de maduración con la fruta a tratar.



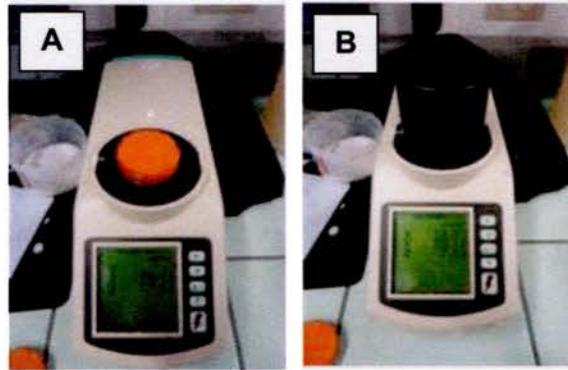
Anexo 2. Tratamiento de los frutos de papaya con '1-MCP'. A. Distribución de las canastas plásticas con la fruta. B. Ventilador de batería con la solución de 1-MCP. C. Estructura de la cámara hermética. D. Cámara hermética armada.



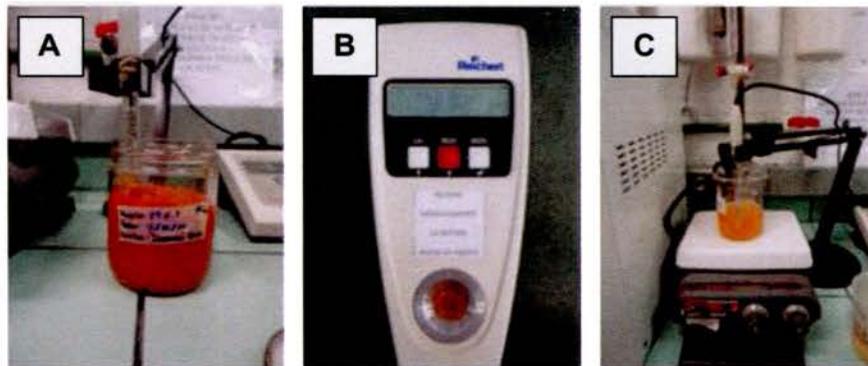
Anexo 3. Determinación de firmeza en frutos de papaya. A. Posición horizontal del fruto en texturómetro. B. Fuerza (N) registrada durante la penetración de un fruto de papaya con el texturómetro digital. Las flechas indican la fuerza máxima para penetrar 15 mm, correspondiente a la firmeza de la cáscara y el promedio de la fuerza de penetración (N) entre los 6 y 9 mm (4 a 6 s) correspondiente a la firmeza de la pulpa, respectivamente.



Anexo 4. Determinación de color de la cáscara en frutos de papaya. A. Posición horizontal del fruto sobre apertura. B. Tela negra colocada sobre el fruto.



Anexo 5. Determinación de color de la pulpa en frutos de papaya. A. Tamaño del trozo de pulpa colocado sobre apertura. B. Campana negra colocada sobre la pulpa.



Anexo 6. Determinación de parámetros químicos. A. pH. B. Sólidos solubles. C. Acidez titulable con NaOH por medio de cambio en el pH.

Anexo 7. Resumen del ANDEVA para las variables estudiadas en la pulpa de frutos de papaya "Pococi"

	Tratamiento		Día		Tratamiento*Día	
	F	p	F	p	F	p
Firmeza	111,38	< 0,0001	61,01	< 0,0001	14,36	< 0,0001
L*	0,96	0,39	3,59	0,02	1,08	0,39
a*	0,33	0,72	18,04	< 0,0001	1,74	0,14
b*	2,41	0,11	17,25	< 0,0001	7,55	< 0,0001
pH	37,29	< 0,0001	73,46	< 0,0001	37,29	< 0,0001
Acidez titulable	1,13	< 0,0001	2,09	< 0,0001	1,13	< 0,0001
Sólidos solubles	1,31	0,28	1,70	0,20	1,31	0,28

Anexo 8. Resumen del ANDEVA para las variables estudiadas en la cáscara de frutos de papaya "Pococi"

	Tratamiento		Día		Tratamiento*Día	
	F	p	F	p	F	p
Firmeza	43,31	< 0,0001	18,38	< 0,0001	7,16	< 0,0001
L*	22,18	< 0,0001	63,08	< 0,0001	10,44	< 0,0001
a*	119,79	< 0,0001	279,31	< 0,0001	61,54	< 0,0001
b*	19,65	< 0,0001	146,93	< 0,0001	6,66	< 0,0001

Anexo 9. Comparación del logaritmo de la expresión relativa de los diferentes genes en la pulpa de frutos de papaya de la variedad “Pococi”

Gen	Tratamiento	Tejido				
		Pulpa				
		0*	3	5	7	11
Poligalacturonasa	1-MCP		-0,89 ± 0,15c	-0,93 ± 0,15c	-1,00 ± 0,15c	-0,86 ± 0,15c
	Testigo	0,00 ± 0,15b**	1,38 ± 0,15a	1,65 ± 0,15a	0,97 ± 0,15a	1,34 ± 0,15a
	Etileno		1,33 ± 0,15a	1,23 ± 0,15a	1,38 ± 0,15a	1,13 ± 0,19a
Endoxilanasas	1-MCP		0,18 ± 0,14f	0,20 ± 0,14f	0,88 ± 0,14e	1,19 ± 0,14de
	Testigo	0,00 ± 0,14f	1,71 ± 0,14cd	2,24 ± 0,14abc	2,73 ± 0,14a	2,47 ± 0,29ab
	Etileno		1,90 ± 0,14bc	2,08 ± 0,19abc	2,21 ± 0,14abc	1,85 ± 0,19bcd
Pectinesterasa	1-MCP		0,08 ± 0,05a	-0,12 ± 0,06abc	-0,51 ± 0,06de	-0,57 ± 0,06de
	Testigo	0,00 ± 0,04ab	-0,16 ± 0,06abc	0,05 ± 0,06ab	-0,18 ± 0,06bc	-0,35 ± 0,07cd
	Etileno		-0,35 ± 0,06cd	-0,33 ± 0,05cd	-0,49 ± 0,06de	-0,70 ± 0,06e
Expansina	1-MCP		-0,51 ± 0,05b	-0,88 ± 0,05cde	-1,12 ± 0,06ef	-1,16 ± 0,04f
	Testigo	0,00 ± 0,04a	-0,81 ± 0,04cde	-0,92 ± 0,05cde	-0,99 ± 0,06def	-1,66 ± 0,04g
	Etileno		-0,64 ± 0,06bc	-0,70 ± 0,05bcd	-1,15 ± 0,05ef	-0,56 ± 0,04b
ACC deaminasa	1-MCP		-0,21 ± 0,03b	-0,24 ± 0,03b	-0,41 ± 0,03c	-0,45 ± 0,03cd
	Testigo	0,00 ± 0,03a	-0,60 ± 0,03de	-0,61 ± 0,03e	-0,57 ± 0,03de	-0,52 ± 0,03cde
	Etileno		-0,42 ± 0,03c	-0,19 ± 0,03b	-0,15 ± 0,03b	-0,46 ± 0,03cd

*Días posteriores al tratamiento.

**Letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre tratamientos y/o días, según los datos de $p < 0.05$ o $p > 0.05$.

Anexo 10. Comparación del logaritmo de la expresión relativa de los diferentes genes en la cáscara de frutos de papaya de la variedad “Pococi”

Gen	Tratamiento	Tejido				
		Cáscara				
		0*	3	5	7	11
Poligalacturonasa	1-MCP		-0,36 ± 0,24cd	-0,91 ± 0,24d	-1,01 ± 0,24d	-1,06 ± 0,27d
	Testigo	0,00 ± 0,24bcd**	0,84 ± 0,24ab	0,79 ± 0,27abc	0,91 ± 0,24ab	1,37 ± 0,24a
	Etileno		0,75 ± 0,24abc	0,64 ± 0,27abc	1,17 ± 0,24a	1,26 ± 0,27a
Endoxilanas	1-MCP		-0,20 ± 0,24c	-0,18 ± 0,24c	0,54 ± 0,24abc	1,30 ± 0,24a
	Testigo	0,00 ± 0,24bc	0,65 ± 0,24abc	0,71 ± 0,24abc	1,25 ± 0,24a	1,05 ± 0,24a
	Etileno		0,58 ± 0,24abc	0,75 ± 0,24abc	1,21 ± 0,24a	1,28 ± 0,24a
Pectinesterasa	1-MCP		0,21 ± 0,08ab	0,36 ± 0,08a	0,15 ± 0,08ab	0,18 ± 0,08ab
	Testigo	0,00 ± 0,07ab	0,11 ± 0,08ab	0,20 ± 0,07ab	0,02 ± 0,07ab	0,01 ± 0,07ab
	Etileno		0,22 ± 0,08ab	0,22 ± 0,08ab	-0,22 ± 0,06b	-0,44 ± 0,06c
Expansina	1-MCP		0,26 ± 0,07abc	0,31 ± 0,05ab	0,26 ± 0,05ab	0,20 ± 0,05abc
	Testigo	0,00 ± 0,04c	0,09 ± 0,05bc	0,26 ± 0,04ab	0,37 ± 0,05a	0,31 ± 0,05ab
	Etileno		0,00 ± 0,05c	0,26 ± 0,04ab	0,19 ± 0,05abc	0,27 ± 0,05ab
ACC deaminasa	1-MCP		-0,07 ± 0,02bcde	-0,07 ± 0,02abcd	-0,05 ± 0,02abc	-0,16 ± 0,02def
	Testigo	0,00 ± 0,02ab	-0,19 ± 0,02def	-0,24 ± 0,02f	-0,10 ± 0,02cde	-0,20 ± 0,02ef
	Etileno		-0,13 ± 0,02cde	-0,03 ± 0,02abc	0,03 ± 0,02a	-0,16 ± 0,02def

*Días posteriores al tratamiento.

**Letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre tratamientos y/o días, según los datos de $p < 0.05$ o $p > 0.05$.