



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
UNIDAD IRAPUATO**

**“RESPUESTA MOLECULAR DEL FRUTO DE LA FRESA (*Fragaria  
x ananassa* Duch. cv. Camino Real) ANTE LA ILUMINACIÓN CON  
LUZ UV-C”**

**Tesis que presenta**

IBT. Sheila Asunción Martínez Zavala

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

en la especialidad de Biotecnología de Plantas

DIRECTOR DE TESIS

**Dr. Edmundo Lozoya Gloria**

El presente trabajo fue realizado bajo la asesoría del Dr. Edmundo Lozoya Gloria en el Laboratorio de Nutraceuticos de Plantas, del Departamento de Ingenieria Genetica del Cinvestav Unidad Irapuato, Guanajuato, México.

## Agradecimientos

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACY), por el apoyo económico otorgado para la realización de este proyecto (Becario 587945).
- Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional por el apoyo otorgado para la terminación de este proyecto.
- A mi director de tesis, Dr. Edmundo Lozoya Gloria quien de él admiro su calidad humana y sabiduría. Por el recibimiento en su laboratorio, la confianza, asesoría, paciencia y conocimiento otorgado. Demostrando su apoyo en todo momento.
- A mis sinodales (Dr. Alfredo Herrera Estrella y Dr. Neftalí Ochoa Alejo) quienes enriquecieron, complementaron y mejoraron con su admirable conocimiento la presente tesis.
- A la auxiliar de laboratorio, M.C. Martha Betancourt, por su ayuda, asesoría, y facilidades prestadas con reactivos y espacios de laboratorio.
- A mis compañeros de laboratorio (Xochitl, Patricia, Claudia, Quia, Takehiro, Sabino) con quienes, al compartir un espacio común, además de brindar apoyo, se crearon lazos de convivencia y amistad.
- A mis amigos, dentro de Cinvestav (Fernando, Felipe, Ruth, Caro, Sofi, Gabi, Ale, Ricardo), por formar parte de esta travesía en común, y a los de toda la vida (Ivy, Eli, Claudia, Leslie, John, Malcolm) por sus muestras de cariño y aprecio.
- A mi familia, quienes con su apoyo incondicional me guían y permiten siempre continuar para alcanzar mis sueños.

## ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS .....	v
ÍNDICE DE TABLAS .....	vii
ÍNDICE DE ANEXOS .....	7
RESUMEN .....	viii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 LA FRESA ( <i>Fragaria x ananassa</i> Duch.).....	3
2.1.1 Origen y fisiología de la fresa .....	3
2.1.2 Maduración del fruto de la fresa .....	4
2.1.3 Importancia económica .....	6
2.1.4 Composición nutricional del fruto de fresa.....	6
2.2 BIOSÍNTESIS Y REGULACIÓN DE LOS FLAVONOIDES .....	8
2.2.1 Importancia de los flavonoides.....	8
2.2.2 Biosíntesis de los flavonoides .....	10
2.3 La luz UV-C y sus efectos en las plantas .....	14
2.3.1 Efecto “hormesis” de la luz UV-C como tratamiento para incrementar la calidad de frutos .....	15
2.3.2 Estudios moleculares relacionados a la biosíntesis de flavonoides en respuesta a la luz UV-C.....	17
2.3.3 Irradiación luz UV-C en fresa .....	18
III. JUSTIFICACIÓN .....	20
IV. HIPÓTESIS.....	20

V. OBJETIVOS.....	20
5.1 Objetivo general .....	20
5.2 Objetivos específicos.....	20
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
6.1 Material biológico .....	21
6.2 Propiedades fisicoquímicas .....	21
6.2.1 Determinación de peso, tamaño, pH, °Brix, turbidez, claridad y proteínas del fruto.....	21
6.3 Tratamiento con luz UV-C .....	23
6.4 Extracción de compuestos fenólicos .....	24
6.5 Hidrólisis ácida de los extractos para la determinación de antocianinas, compuestos fenólicos, flavonoides y capacidad antioxidante. ....	24
6.5.1 Determinación del contenido total de antocianinas .....	25
6.5.2 Determinación del contenido total de compuestos fenólicos .....	25
6.5.3 Determinación de flavonoides .....	26
6.5.4 Determinación de capacidad antioxidante .....	26
6.6 Extracción de ARN total .....	27
6.7 Síntesis de ADN complementario (ADNc) .....	28
6.8 Selección de los genes de interés.....	28
6.9 Diseño de oligonucleótidos.....	29
6.10 PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) .....	29
6.11 3'RACE.....	31
6.12 SECUENCIACIÓN DE ADN .....	32
6.13 ENSAYOS ENZIMÁTICOS.....	32
6.13.1 Actividad enzimática de PAL .....	32
6.13.2 Actividad enzimática de la ascorbato oxidasa .....	32

6.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	33
VII. RESULTADOS.....	34
7.1 Relación en el contenido de flavonoides en aquenios y receptáculo de <i>F. x ananassa</i> Duch cv. Camino Real .....	34
7.2 Tratamiento de irradiación con luz UV-C en frutos maduros de fresa .....	35
7.3 Efecto de la luz UV-C en el contenido de proteínas totales.....	36
7.4 Efecto de la radiación UV-C en la cantidad de antocianinas, compuestos fenólicos, flavonoides totales y la capacidad antioxidante en aquenios y receptáculo del fruto de fresa .....	38
7.5 Análisis de expresión de genes por qPCR .....	39
7.6 Expresión de genes codificantes de enzimas clave en la ruta general de los fenilpropanoides en aquenios, receptáculo y fruto entero de <i>F. x ananassa</i> cv. Camino Real.....	42
7.7 Cambios en la expresión de genes codificantes para enzimas clave en la ruta general de los compuestos fenólicos a causa de la irradiación con luz UV-C en <i>F. x ananassa</i> cv. Camino Real.....	45
7.8 Cambios en la expresión de genes codificantes para enzimas clave en la biosíntesis de los flavonoides a diferentes tiempos post- irradiación en <i>F. x ananassa</i> D. cv. Camino Real. ....	51
7.9 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	54
7.9.1 Actividad enzimática de la fenilalanina amonio liasa (PAL).....	54
7.9.2 Actividad enzimática de la ascorbato oxidasa (AAO) .....	56
VIII. DISCUSIÓN .....	60
8.1 Relación del contenido de flavonoides en diferentes órganos.....	60
8.2 Tratamiento de irradiación con luz UV-C.....	62
8.3 Efecto de la luz UV-C en el contenido de proteínas totales.....	64
8.4 Efecto de la radiación UV-C en la cantidad de antocianinas totales, compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y la capacidad antioxidante.....	65

8.5 Cambios en la expresión de genes codificantes para enzimas clave en la ruta general de los compuestos fenólicos a causa de la irradiación con luz UV-C en <i>F. x ananassa</i> cv. Camino Real.....	66
8.6 Cambios en la expresión de genes codificantes para enzimas clave en la biosíntesis de los flavonoides a diferentes tiempos post-irradiación en <i>F. x ananassa</i> D. cv. Camino Real. ....	69
8.7 Actividades enzimáticas .....	70
IX. CONCLUSIONES .....	72
X. PERSPECTIVAS .....	73
XI. BIBLIOGRAFÍA .....	74
XII. ANEXOS .....	90
ANEXO 1.....	90
ANEXO 2.....	92
ANEXO 3.....	95
ANEXO 4.....	95
ANEXO 5.....	97
ANEXO 6.....	98
ANEXO 7.....	105

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

18S	Siglas en inglés de ARN ribosomal 18S (18S ribosomal RNA)
28S	Siglas en inglés de ARN ribosomal 28S (28S ribosomal RNA)
4CL	4-coumaroil-CoA ligasa
3' RACE	Siglas en inglés de amplificación rápida de terminaciones del ADNc (Rapid Amplification of cDNA Ends).
AAO	Siglas en inglés de ascorbato oxidasa
ADN	Siglas en inglés de ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ANR	Siglas en inglés de antocianidina reductasa
ANS	Siglas en inglés de antocianidina sintasa
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
bHLH	Siglas en inglés del motivo estructural de proteínas hélice-bucle-hélice
BLAST	Siglas en inglés de Herramienta de Búsqueda y Alineamiento de Secuencias de Tipo Local (Basic Local Alignment Search Tool)
BSA	Siglas en inglés de albúmina de suero bovino (Bovine Serum Albumin)
cv.	Cultivar
CHS	Siglas en inglés de chalcona sintasa
CHI	Siglas en inglés de chalcona isomerasa
de	Destilada estéril
DE	Desviación estándar
DFR	Siglas en inglés de dihidroflavonol 4-reductasa
DNase	Desoxirribonucleasa
dNTP	Desoxinucleotido trifosfato
DPPH	Siglas en inglés de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE	Error estándar
ET	Equivalente en Trolox
<i>Fa</i>	<i>Fragaria x ananassa</i>
kb	Kilo pares de bases
Kcal	Kilocalorías
kDa	Kilodalton
kJ/m <sup>2</sup>	Kilo Joule / metro cuadrado
MW	Siglas en inglés de Peso molecular (Molecular weight)
MQ	Agua milli Q, agua ultrapura del Tipo 1 (ISO 3696).
ng	Nanogramos
nm	Nanomolar
nt	Nucleótidos
ORF	Siglas en inglés de marco abierto de lectura (Open Reading Frame)
PA	Proantocianidinas
PAs	Proantocianidinas
pb	Pares de bases
pf	Peso fresco
PCR	Siglas en inglés de reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
ppm	Partes por millón
PR	Proteínas relacionadas a patogénesis
PVP	Polivinilpirrolidona
qPCR	Siglas en inglés de PCR cuantitativo o PCR en tiempo real (quantitative polymerase chain reaction)
RNAse	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Siglas en inglés de Transcripción reversa (Reverse transcription)
RT-PCR	Siglas en inglés de Transcripción reversa del PCR (Reverse
TAE	Tris-acetato-EDTA

TE	Tris EDTA
TF	Siglas en inglés de Factores de transcripción
T <sub>m</sub>	Temperatura de fusión
U	Unidad
UDP/UFGT	Siglas en inglés de UDP glucosa:flavonoide 3-O glucosiltransferasa
UV	Ultravioleta
w/v	peso/volumen
λ	Longitud de onda
μg	Microgramos
μM	Micromol

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flor y fruto de <i>Fragaria x ananassa</i> D.....	4
Figura 2. Imagen representativa del desarrollo del fruto de fresa. ....	5
Figura 3. Estructura general de los flavonoides y subclases de los flavonoides más comunes.....	9
Figura 4. Representación esquemática de la ruta biosintética de fenilpropanoides y flavonoides en fresa.. ....	11
Figura 5. Espectro electromagnético de UV.....	15
Figura 6. Contribución porcentual (%) de los compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, antocianinas totales y capacidad antioxidante (DPPH) en los extractos de achenios y el receptáculo en frutos maduros de <i>F. x ananassa</i> cv. Camino Real.....	34
Figura 7. Efecto del tratamiento con luz UV-C en el contenido total de proteínas en frutos maduros de <i>F. x ananassa</i> cv. Camino Real.....	37
Figura 8. Efecto del tratamiento con luz UV-C en el contenido total de proteínas en diferentes órganos (achenios y receptáculo) con y sin tratamiento de irradiación de luz UV-C: control (CTL) y UV-C en frutos maduros de <i>F. x ananassa</i> cv. Camino Real.....	38
Figura 9. Niveles de expresión de los genes en diferentes órganos de frutos maduros de <i>F. x ananassa</i> cv. Camino Real sin tratamiento de luz UV-C. ....	44
Figura 10. Esquema general del cambio en la expresión de genes implicados en la biosíntesis de compuestos fenólicos en diversas condiciones a causa de la irradiación con luz UV-C en <i>F. x ananassa</i> cv. Camino Real en achenios, receptáculo y fruto entero.....	46
Figura 11. Expresión relativa de genes codificantes para la fenilalanina amonio liasa en diferentes órganos de frutos maduros de <i>F. x ananassa</i> cv. Camino Real tratados con luz UV-C.. ....	47
Figura 12. Expresión relativa de genes codificantes para enzimas clave en la ruta general de los fenilpropanoides en diferentes órganos de frutos maduros de <i>F. x ananassa</i> cv. Camino Real tratados con luz UV-C.....	49
Figura 13. Expresión relativa de genes codificantes para la fenilalanina amonio liasa en el fruto entero de <i>F. x ananassa</i> cv. Camino Real a diferentes tiempos post-	

irradiación del tratamiento con luz UV-C: CTL (control), UV-C (tratamiento con luz UV-C), respectivamente. .... 51

Figura 14. Expresión relativa de genes codificantes para enzimas relacionadas a la biosíntesis de flavonoides en el fruto entero de *F. x ananassa* cv. Camino Real, a diferentes tiempos post-irradiación de luz UV-C: CTL (control), UV-C (tratamiento con luz UV-C), respectivamente..... 53

Figura 15. Actividad enzimática de la fenilalanina amonio liasa (PAL) después del tratamiento con luz UV-C en diferentes partes del fruto maduro de fresa ..... 55

Figura 16. Actividad enzimática de la fenilalanina amonio liasa (PAL) a diferentes tiempos de incubación después del tratamiento con luz UV-C en frutos maduros de *F. x ananassa* cv. Camino Real..... 56

Figura 17. Actividad enzimática de la ascorbato oxidasa (AAO) en diferentes tiempos de incubación después del tratamiento con luz UV-C en frutos maduros de *F. x ananassa* cv. Camino Real..... 57

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Compuestos en el fruto maduro de <i>F. x ananassa</i> Duch.....	7
Tabla II. Efectos de la luz UV-C (254 nm) en frutos post cosecha de <i>F. x ananassa</i> .. .....	19
Tabla III. Condiciones utilizadas para qPCR .....	30
Tabla IV. Comparación de las propiedades fisicoquímicas en los frutos maduros de <i>F. x ananassa</i> cv. Camino Real irradiados con luz UV-C .....	36
Tabla V. Contenido de antocianinas, compuestos fenólicos, flavonoides totales y capacidad antioxidante en achenios y receptáculo de <i>F. x ananassa</i> cv. Camino Real con y sin tratamiento de luz UV-C.....	39
Tabla VI. Secuencias y características de los oligonucleótidos diseñados para la cuantificación de la expresión por qPCR en frutos maduros de <i>F. x ananassa</i> cv. Camino Real.....	40
Tabla VII. Actividad enzimática de la fenilalanina amonio liasa (PAL) en diferentes partes del fruto maduro de fresa.. .....	54
Tabla VIII. Posibles integrantes de la familia de genes relacionados en la biosíntesis de flavonoides en <i>F. x ananassa</i> .....	58

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Curvas de calibración por espectrofotometría UV y UV-VIS. ....	90
Anexo 2. Lista de oligonucleótidos empleados en el presente trabajo .....	92
Anexo 3. Análisis de varianza multifactorial de la expresión de los genes de referencia, $\beta$ -actina y GADPH. ....	95
Anexo 4. Comparación de secuencias de proteínas FaPAL. ....	95
Anexo 5. Contenido de: A) proteínas totales, B) turbidez y C) transmitancia (%) en frutos maduros de <i>F. x ananassa</i> cv. Camino Real sin tratamiento de luz UV-C. .	97
Anexo 6. Secuencias identificadas .....	98
Anexo 7. Oligonucleótidos para 3'RACE .....	105

## RESÚMEN

La fresa (*Fragaria x ananassa* Duch), es un cultivo de gran importancia económica a nivel nacional e internacional, contiene altos niveles de compuestos antioxidantes reconocidos como beneficiosos para la salud humana, tales como los flavonoides. Los flavonoides son una subfamilia de los compuestos fenólicos y se localizan principalmente en frutos como flavonoles y antocianinas. Con la finalidad de incrementar la concentración de dichos compuestos, se han desarrollado diversos tratamientos pre y post cosecha dentro de los que destaca, debido a su bajo costo, la radiación del fruto con luz UV-C (~254 nm). La aplicación de luz UV-C en diferentes frutos ha demostrado que activa la síntesis de los compuestos fenólicos a través de la regulación a nivel transcripcional de los genes que codifican a las enzimas que participan en su biosíntesis, pero esta regulación depende principalmente del genotipo del cultivo. En el fruto de fresa, se han obtenido resultados tanto favorables como desfavorables al irradiar el fruto con luz UV-C, por lo cual es de suma importancia entender los mecanismos que permiten el aumento de estos compuestos.

En este trabajo, se realizó un análisis comparativo del efecto de la luz UV-C en frutos maduros de *F. x ananassa* Duch. cv. Camino Real y las partes que lo conforman (aquenios y receptáculo), así como diferentes tiempos post irradiación del fruto entero, con el fin de identificar respuestas comunes y/o divergentes con respecto al tratamiento de luz UV-C. Para ello, se evaluó en el fruto de fresa y sus partes (aquenios y receptáculo) el contenido de compuestos fenólicos (antocianinas y flavonoides), la capacidad antioxidante y los cambios en la expresión de genes asociados a la biosíntesis de flavonoides. Se encontró que la expresión de los genes codificantes para enzimas clave fue dependiente del órgano y del tiempo post-irradiación. La respuesta incluyó un incremento significativo en la acumulación de compuestos fenólicos en los aquenios, y de antocianinas en el receptáculo, de entre el 30 y 50%. El efecto de la exposición a la luz UV-C en la expresión de los genes de biosíntesis de la ruta general de los fenilpropanoides, se observó un aumento en la expresión de *FaPAL2* y *FaPAL6*, dos genes que codifican a la fenilalanina amonio liasa.

## ABSTRACT

Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch) is a world-wide economically important crop. Strawberries contain high levels of compounds with potent antioxidant activity such as flavonoids, recognized for their beneficial effect on human health. Flavonoids are a group of compounds ubiquitously found in fruits. To increase the content of these compounds, pre- and post-harvest strategies have been developed. Due to the low cost, one attractive strategy is the irradiation with UV-C light. Ultraviolet C irradiation in different fruits has been shown that UV-C light activates the synthesis of phenolic compounds through the transcriptional regulation of biosynthetic genes, but this regulation depends mainly on the irradiation doses and the genotype of the crop plant. In the strawberry fruit, both favorable and unfavorable results have been obtained when irradiating the fruit with UV-C light. Therefore, it is very important to understand the mechanisms that allow increase of these compounds.

In this work, a comparative analysis of the effect of UV-C light (2 kJ/m<sup>2</sup>) on *F. x ananassa* cv. "Camino Real" ripe fruits was performed. This analysis also included achenes and receptacle in order to identify common and/or divergent responses in the treatment. For this, the content of phenolic compounds (anthocyanins and flavonoids), the antioxidant capacity and the expression analysis of flavonoid biosynthetic genes were evaluated. It was found that the gene expression was organ and time dependent, and the UV-C response included a significant increase in the accumulation of phenolic compounds in achenes, and anthocyanins in the receptacle (30-50%). Regarding gene expression, in response to the treatment, the expression of two genes encoding for phenylalanine ammonium lyase (*FaPAL2* and *FaPAL6*) increased as well as the enzymatic activity.

## I. INTRODUCCIÓN

Los flavonoides son compuestos polifenólicos, que se encuentran en todas las plantas, aunque en diferente proporción y, que les dan a los frutos características de coloración. Estos compuestos son importantes para la fertilidad del polen, la atracción animal, en gran parte por los insectos, y la dispersión de la semilla (Gould y Lister 2006). Los flavonoides llevan a cabo diversas funciones biológicas como protección frente al frío, radiación UV-C y ataques por patógenos, en los frutos proveen calidad y una mayor vida de anaquel post cosecha. Por otra parte, estudios epidemiológicos han documentado que el consumo de flavonoides está asociado con una baja incidencia de enfermedades crónicas y metabólicas a través de su acción indirecta en la microflora.

La fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.), cultivo económicamente importante a nivel mundial, nacional y regional, acumula grandes cantidades de polifenoles, principalmente flavonoides, dentro de los que destacan las antocianinas, los flavonoles y flavanoles (Fait *et al.*, 2008). La composición cuantitativa y cualitativa de flavonoides en las fresas la determinan factores genéticos y ambientales. La expresión de los genes estructurales de biosíntesis de estos compuestos está altamente regulada por condiciones de luz, nutrición y temperatura. Debido a su importancia, se han desarrollado diversos métodos, pre y postcosecha, que permiten incrementar la acumulación de compuestos fenólicos como los flavonoides. Ejemplo de ello es la aplicación exógena de hormonas, estimulación por deficiencia de agua y modificación de condiciones como atmósfera, luz y temperatura.

La luz UV-C es reconocida por poseer dos efectos benéficos en los frutos: 1) inactivar directamente patógenos, y 2) promover fitoquímicos, sustancias activas no esenciales con efectos positivos en la salud humana. La aplicación de luz ultravioleta (UV-C) a frutos se ha definido como una estrategia amigable con el

ambiente (Charles *et al.*, 2008); la cual incrementa antocianinas y compuestos fenólicos en frutos pre y postcosecha. Recientemente diversos autores, describiendo este efecto en frutos de fresa precosecha, al igual que postcosecha (Severo *et al.*, (2015), Oliveira *et al.*, (2016) y Xie *et al.*, (2016); Ayala-Gil, 2011). Trabajos como los realizados por Xi *et al.*, (2013) demuestran que el cambio observado es dependiente del cultivar y la dosis de irradiación. Sin embargo, existe una falta de conocimiento en la respuesta molecular del fruto postcosecha con la aplicación de luz UV-C; ejemplo de ello es la posible activación o supresión de genes involucrados directa o indirectamente en la producción de estos compuestos.

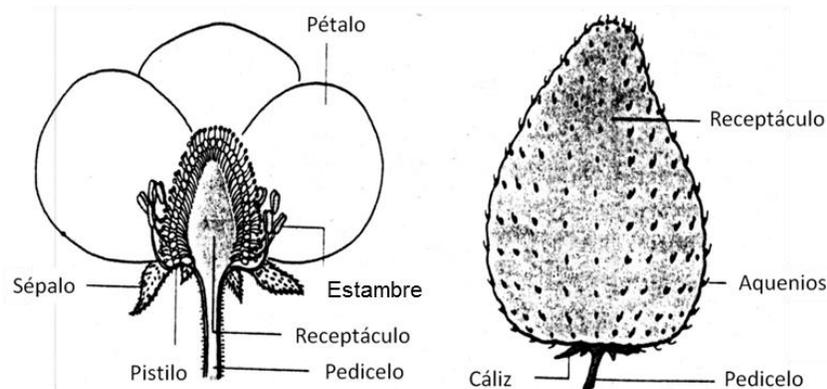
Entender el mecanismo detrás del efecto de luz UV-C en cultivares de relevancia económica regional, como la fresa, es de inmensa importancia para el desarrollo y explorar su potencial agronómico.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 LA FRESA

#### 2.1.1 Origen y fisiología de la fresa

La fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) pertenece a la familia Rosaceae en el género *Fragaria* (Shulaev *et al.*, 2008), y está relacionada a nivel taxonómico con otros cultivos de igual relevancia económica como el durazno (*Prunus persica*), la frambuesa (*Rubus idaeus*) y la manzana (*Malus domestica*), entre otros. En el género *Fragaria*, existen por lo menos 20 especies, las cuales se agrupan en cuatro clases de acuerdo con su nivel de ploidía (Folta y Davis, 2006). *F. x ananassa* Duchesne es una planta octoploide ( $2n=8x=56$ ) resultado de una cruce accidental entre dos especies americanas nativas, *F. chiloensis* y *F. virginiana* Duchesne (Davis *et al.*, 2007), y su genoma es el más complejo. Esta especie octoploide abarca cerca del 60% de la producción mundial, debido a sus propiedades organolépticas y por poseer compuestos beneficios para la salud de los humanos. El fruto de *F. x ananassa* es denominado “falso fruto”, perteneciente al tipo conocarpo, pues en realidad es un multifruto formado por la expansión del receptáculo, en cuya superficie se encuentran los aquenios (Erendorfer, 1983). Los aquenios son una combinación de tejido de semilla y tejido ovárico, los cuales se conectan al interior del receptáculo mediante haces fibrovasculares con los que obtienen los nutrientes necesarios para su desarrollo (Perkin-Veazie, 1995). De acuerdo con Darrow (1996), la cantidad de aquenios en cada receptáculo depende del cultivar y las condiciones de crecimiento, y se encuentra en un rango de 20 a 500 aquenios.



**Figura 1.** Flor y fruto de *Fragaria x ananassa* D. Se muestra el corte longitudinal para mostrar la relación de partes de la flor al receptáculo (Modificado de <http://www.uky.edu/~garose/BIO.PLS.210.FRUIT.S.HTM>)

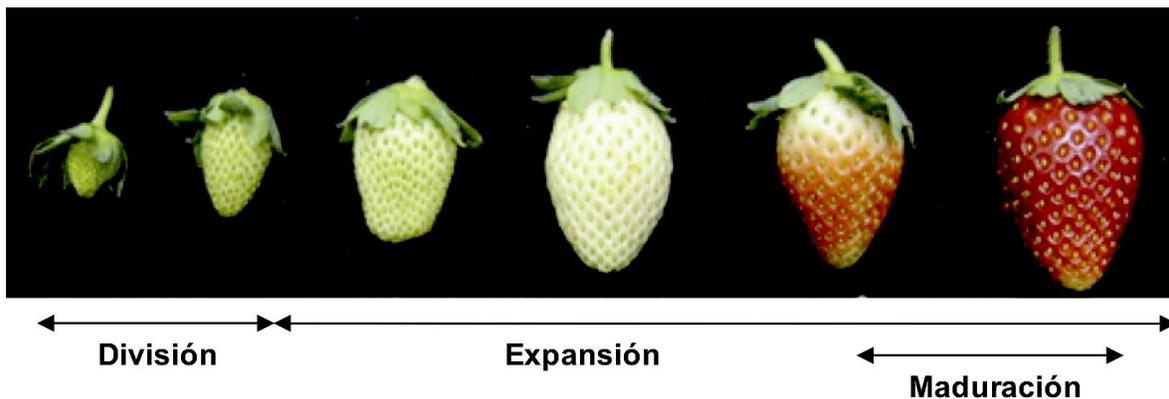
De manera general, el receptáculo está conformado por una región medular, una corteza parenquimatosa y el córtex (una o dos capas exteriores de células epidérmicas) (Figura 1). El tamaño final del fruto depende de diversos factores, entre los que destacan la posición de la inflorescencia, el número de aquenios polinizados y las condiciones termo y fotoperiódicas de cultivo (Howard y Albrechts, 1984).

### 2.1.2 Maduración del fruto de la fresa

La maduración es un proceso fisiológico de corta duración en la que los frutos desarrollan una serie de propiedades organolépticas que los hacen aptos para el consumo humano. Dependiendo de su proceso, los frutos pueden clasificarse en climatéricos, cuando la madurez puede alcanzarse separado de la planta parental, y no climatéricos, en el cual el fruto debe madurar en la planta parental y el etileno regula su proceso de maduración (Giovannoni, 2001). La fresa, al igual que la uva (*Vitis vinífera*), pertenece al grupo de los frutos de tipo no climatérico. Durante la maduración, *F. x ananassa* produce cambios físicos (textura y color), cambios químicos (producción de aromas y sabores) y variaciones de expresión génica, dentro de los que destacan, la variación del color (debido a la degradación de clorofila y la acumulación de antocianinas), la producción de compuestos volátiles relacionados con el sabor, el incremento en el contenido de sacarosa y hexosas, y el reblandecimiento de los tejidos ocasionado por la solubilización y

despolimerización de los componentes de la pared celular (Manning, 1998; Lunkenbein *et al.*, 2006).

En fresa, la maduración se completa en 30-40 días después de la antesis (Archbold y Dennis, 1984) y el desarrollo del fruto se puede dividir en tres fases: 1) división celular, 2) fase inicial de crecimiento y elongación (expansión), y 3) fase de maduración (Figura 2).



**Figura 2.** Imagen representativa del desarrollo del fruto de fresa. Modificada de Fait *et al.*, (2008).

El crecimiento del receptáculo depende del desarrollo de las células del córtex y de la médula; la división celular ocurre en los primeros 10 días, y una combinación de división celular y expansión celular ocurre entre los 10 y 15 días postantesis (Zhang *et al.*, 2011). Particularmente, las auxinas que se sintetizan en los aquenios y se traslocan por el floema basipetalmente desde ellos hasta el pedúnculo, son las responsables primarias del crecimiento del receptáculo; por lo que el número y la distribución de los aquenios en el receptáculo son factores que determinan el desarrollo del fruto (Perkins-Veazie, 1995; Hancock, 1999). El fruto de la fresa alcanza su tamaño total y definitivo aproximadamente 30 días después de la antesis. La acumulación de agua y azúcares, así como la síntesis de la pared celular se observa entre los 21 y 28 días postantesis (Knee *et al.*, 1977). Posteriormente, los receptáculos se tornan de color rojo cuando la clorofila se ha perdido y las antocianinas, como la pelargonidina-3-glucósido y cianidina-3-glucósido comienzan a acumularse en el fruto (Rosli *et al.*, 2004; Aaby *et al.*, 2005). Dependiendo de la

temperatura de cultivo y el genotipo, el fruto está completamente maduro entre los 30 y 40 días posteriores a la antesis (Zhang *et al.*, 2011).

### 2.1.3 Importancia económica

La fresa es uno de los frutos más comercializados a nivel mundial y su consumo, en fresco o como alimento procesado, se ha incrementado en las últimas décadas. En 2014, a nivel mundial se cultivaron 373,534 hectáreas con una producción total de 8,114,373 toneladas. China es el principal productor (38.36%), seguido de Estados Unidos (16.90%), México (5.65%), Turquía (4.63%) y España (3.59%) principalmente (FAOSTAT, 2014). En México la producción se concentra en tres estados, siendo estos Baja California Norte (47%), Michoacán (44%), Jalisco (4%), Baja California Sur (3%) y Guanajuato (2%) (SAGARPA/SIAP, 2014). Particularmente, la principal región productora del Estado de Guanajuato es Irapuato, en donde la fresa fue introducida en 1885 y su cultivo fue intensificado hasta 1950. Debido a la gran demanda en el mercado nacional e internacional, se ha incrementado la búsqueda por el mejoramiento en la calidad del fruto (tamaño, sabor, firmeza y color).

### 2.1.4 Composición nutricional del fruto de fresa

El fruto de *F. x ananassa* representa una opción de alimentación altamente saludable, dado su perfil nutricional, concepto utilizado para valorar el aporte calórico y nutritivo de los alimentos (Tabla I). Aproximadamente el 90% del fruto es agua y el 10% lo constituyen sólidos solubles de suma importancia para la dieta del ser humano (Hemphill y Martin, 1992). Los principales componentes solubles en la fresa son carbohidratos, de los cuales la glucosa y la fructosa, en proporciones similares, representan el 83%; dichos compuestos proveen energía para la mayor parte de las reacciones metabólicas y son un factor importante del sabor (Wrolstad y Shallenberger, 1981). Al igual que los azúcares, los ácidos orgánicos tienen un papel fundamental en el sabor del fruto; los principales ácidos orgánicos de la fresa

son el ácido cítrico y el ácido elálgico, el cual posee propiedades anticancerígenas (Muthukumaran *et al.*, 2017).

**Tabla I.** Compuestos en el fruto maduro de *F. x ananassa* Duch.

<b>Tipo</b>	<b>Nutriente</b>	<b>Por 100 g</b>
<b>General</b>	Agua (g)	90.95
	Energía (kcal)	32
	Proteínas (g)	0.67
	Cenizas (g)	0.40
	Lípidos totales (g)	0.30
	Carbohidratos (g)	7.68
	Fibra dietética	2.0
	Azúcares (g)	4.89
	Sacarosa (g)	0.47
	Glucosa (g)	1.99
	Fructosa (g)	2.44
	<b>Minerales</b>	Calcio (mg)
Hierro (mg)		0.41
Magnesio (mg)		13
Fósforo (mg)		24
Potasio (mg)		153
Sodio (mg)		1
Zinc (mg)		0.14
Magnesio (mg)		0.386
<b>Vitaminas</b>	Vitamina C (mg)	58.8
	Tiamina (mg)	0.024
	Riboflavina (mg)	0.022
	Niacina (mg)	0.386
	Ácido pantoténico (mg)	0.125
	Vitamina B6 (mg)	0.047
	Folato (µg)	24
	Colina (mg)	5.7
<b>Otros compuestos</b>	Betaína (mg)	0.2
	β-carotenos (mg)	7.0

Fuente: Adaptado de (Giampieri *et al.*, 2012).

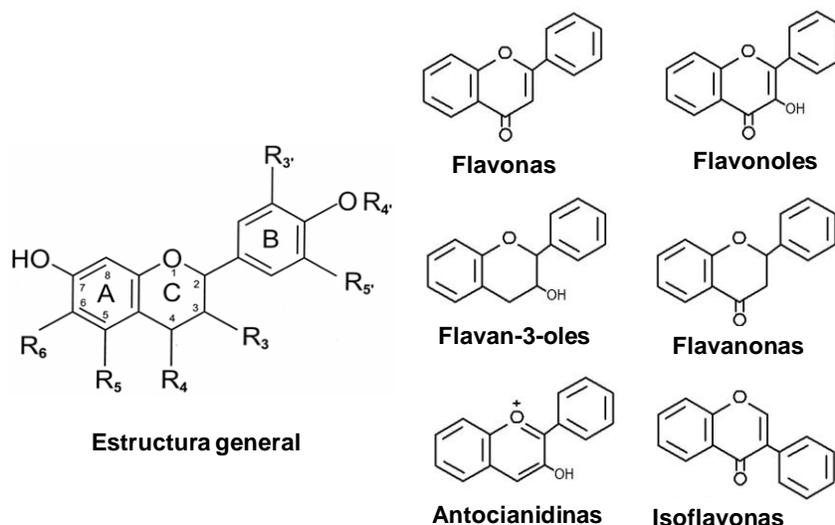
De acuerdo a su contenido nutricional, el consumo de la fresa resulta interesante. Por ejemplo, una ración de 144 g (aproximadamente 8 frutos) pueden proveer más

del 20% de la ingesta diaria de manganeso y folato, y un 5% de potasio (Giampieri *et al.*, 2012). Además de los nutrimentos, la fresa es una buena fuente de compuestos fitoquímicos que mejoran la salud humana y pueden disminuir el riesgo de tumorigénesis y de enfermedades cardiovasculares (Hannum, 2004; Muthukumaran *et al.*, 2017). Entre estos compuestos destacan flavonoides como las antocianinas y los ácidos orgánicos (ascórbico, cítrico, etc.), que muestran una alta capacidad antioxidante contra especies reactivas de oxígeno (Wang y Jiao, 2000).

## 2.2 BIOSÍNTESIS Y REGULACIÓN DE LOS FLAVONOIDES

### 2.2.1 Importancia de los flavonoides

Los flavonoides constituyen el grupo más grande dentro de los compuestos fenólicos, los cuales están ampliamente distribuidos en las plantas y constituyen un amplio grupo de metabolitos con diferentes actividades y estructuras químicas (Mabry y Harborne, 2013). La distribución de estos compuestos en los tejidos y células vegetales varía considerablemente de acuerdo al tipo de compuesto (Butler *et al.*, 1996). Su estructura general es un esqueleto de difenilpiranos: dos anillos benceno unidos a través de un anillo pirona o pirán heterocíclico (Figura 3). Generalmente, son secretados como mecanismo de defensa frente a estímulos bióticos y abióticos, siendo mediadores clave en la resistencia de las plantas a las plagas: promueven la invasión a nuevos hábitats y contribuyen a la estabilidad hacia daños mecánicos o ambientales, como la sequía o las heridas (Bais *et al.*, 2003; Dudareva *et al.*, 2003; La Camera *et al.*, 2004). En particular, los flavonoides tienen la capacidad de absorber luz UV, lo cual se ha considerado como evidencia de su papel en la protección contra la luz UV-C, lo cual corroboran diversos estudios en especies como *Ligustrum vulgare*, *Vitis vinifera*, *Petunia x hybrida* y *Arabidopsis thaliana* (Ryan *et al.*, 2002; Stracke *et al.*, 2010; Kusano *et al.*, 2011).



**Figura 3.** Estructura general de los flavonoides y subclases de los flavonoides más comunes (Modificada de Chang *et al.*, 2013).

Los flavonoides se pueden clasificar con base en su estructura química principalmente en seis subclases: flavonoles, flavonas, flavan-3-oles, flavanonas, antocianinas e isoflavonas; y la mayoría de ellos se encuentran en plantas y alimentos comestibles como  $\beta$ -glucósidos (unidos a una o más moléculas de azúcar) (Chang *et al.*, 2013). La importancia de los flavonoides radica en los posibles efectos benéficos a la salud humana, pues actúan como antioxidantes y tienen la habilidad de modular las vías de señalización celular proveyendo propiedades antiinflamatorias, antidiabéticas, anticancerígenas, y actividades neuroprotectoras (Williams *et al.*, 2004). No se han asociado efectos adversos con altas ingestas de flavonoides a partir de alimentos de origen vegetal, ya que la baja biodisponibilidad y el rápido metabolismo y eliminación de la mayoría de los flavonoides, no permiten su acumulación.

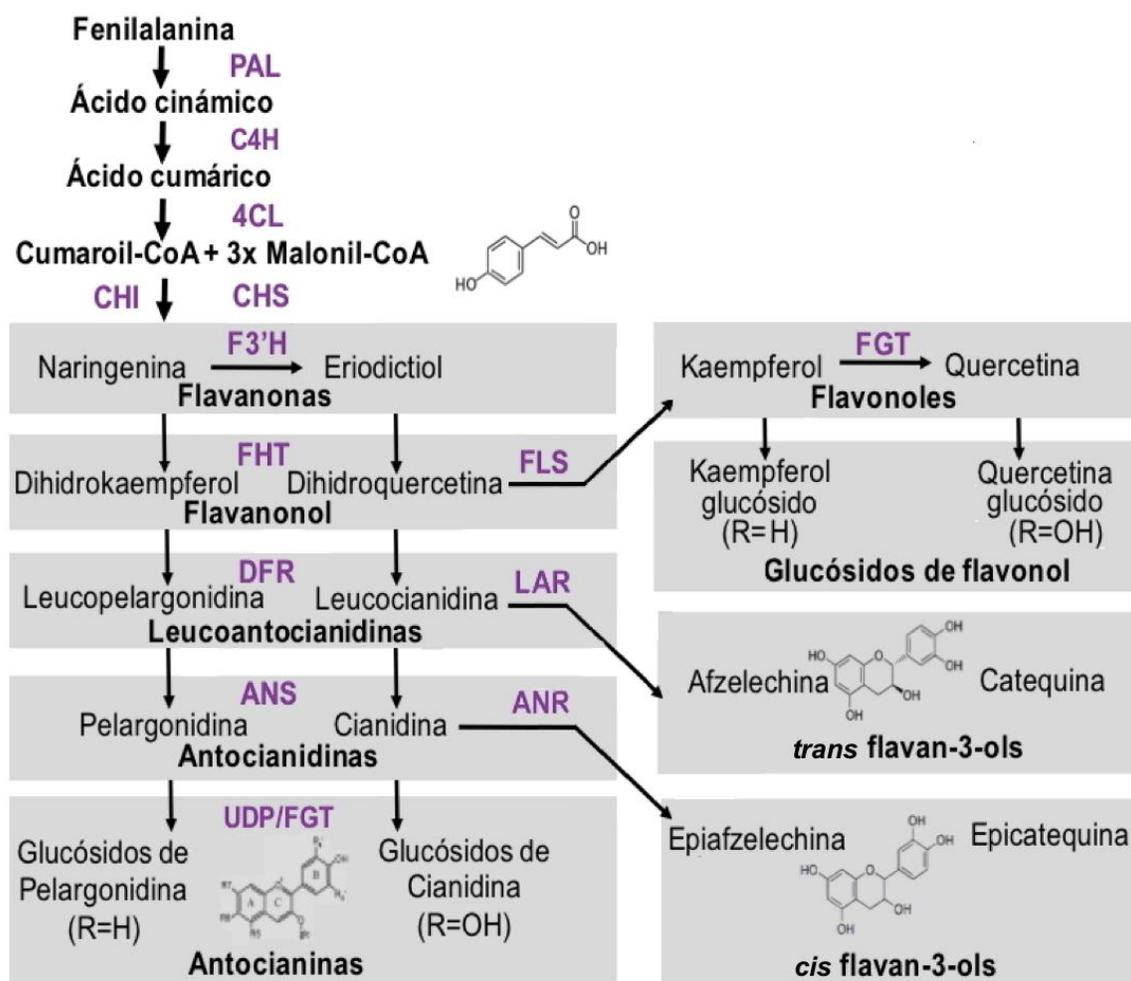
## 2.2.2 Biosíntesis de los flavonoides

Los compuestos flavonoides se sintetizan a partir de la ruta de los fenilpropanoides, una de las rutas metabólicas más importantes en plantas en términos de flujo de carbón (Asano *et al.*, 1995). El paso inicial comienza con la conversión de L-fenilalanina a ácido *trans*-cinámico por la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) que subsecuentemente es transformado a 4-cumaroil-CoA por la cinamato-4-hidroxilasa (C4H) y la 4-cumaroil-CoA ligasa (4CL) (Figura 4). Los productos resultantes se dirigen después a la ruta de flavonoides por acción de la chalcona sintasa (CHS), para producir:

- i) Antocianidinas, en donde continúan una serie de reacciones llevadas a cabo por la chalcona isomerasa (CHI), flavanona 3-hidroxilasa (FHT), dihidroflavonol 4-reductasa (DFR), y la antocianina sintasa (ANS).
- ii) Flavonoles, sintetizados por la flavonol sintasa (FLS) a partir de los dihidroflavonoles.
- iii) Proantocianidinas

Por último, diversas flavonoide glucosiltransferasas (FGT) modifican antocianinas y flavonoles a través de la adición de moléculas de azúcar. Con esto se confiere estabilidad a las moléculas incrementando la polaridad, solubilidad, reactividad e interacción con células blanco.

Un sustrato importante es la *p*-cumaroil-coenzima A, ya que se sitúa en el punto de ramificación de las rutas metabólicas que conducen a las vías de biosíntesis de flavonoides o monolignoles (Besseau *et al.*, 2007). La *p*-cumaroil-coenzima A es el sustrato común de tres enzimas: 1) CHS que cataliza la reacción de una molécula de *p*-cumaroil-coenzima A con tres moléculas de malonil-coenzima A para producir naringenina chalcona precursora de una larga variedad de flavonoides; 2) hidroxicinamoil transferasa (HCT) que conduce la formación de las unidades de ligninaguaiacil (G) y siringil (S); y 3) cinamoil-coenzima A reductasa (CCR) que conduce a la biosíntesis de unidades de lignina, *p*-hidroxifenil G y S (Zhong y Ye, 2012).



**Figura 4.** Representación esquemática de la ruta biosintética de fenilpropanoides y flavonoides en fresa. Las estructuras de los metabolitos importantes para este trabajo se muestran en el diagrama. 4CL (4-cumaroil-CoA ligasa), ANR (antocianidina reductasa), ANS (antocianidina sintasa), C4H (cinamato-4-hidroxilasa), CCR (cinamoil-Coenzima A reductasa), CHI (chalcona isomerasa), CHS (chalcona sintasa), DFR (dihidroflavonol 4-reductasa), FGT (flavonoide 3-O-glucosiltransferasa), F3'H (flavonoide-3-hidroxilasa), FHT (flavanona-3-hidroxilasa), FLS (flavonol sintasa), LAR (leucocianidina reductasa), PAL (fenilalanina amonio liasa), UDP (uridin-5'-difosfato), UDP/FGT (UDP glucosa:flavonoide 3-O-glucosiltransferasa) (Modificada de Carbone *et al.*, 2009).

Enseguida se detalla información acerca de las enzimas más relevantes para este trabajo:

- Fenilalanina amonio liasa (PAL; EC 4.3.1.24), es la primera enzima en la biosíntesis de los fenilpropanoides, cataliza la desaminación no oxidativa de

la fenilalanina para formar ácido *trans*-cinámico. Está presente en todas las plantas y en algunas se encuentra como una sola enzima, mientras que en otras como diferentes isoenzimas que pueden estar sujetas a diferentes regulaciones (Paniego *et al.*, 1999; MacDonald y D’Cunha, 2007).

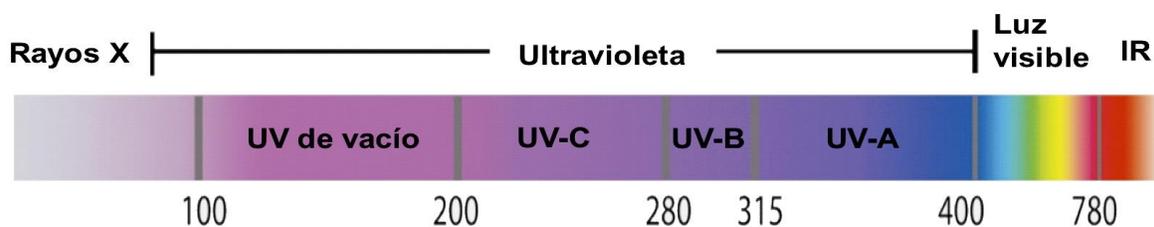
- Cinamato-4-hidroxilasa (C4H; EC 1.14.13.11), pertenece a las monooxigenasas dependientes del citocromo P450 (Boudet, 2007) y probablemente este expresada en todos los tejidos vegetales. Su función es catalizar la hidroxilación en la posición 4 del anillo aromático del ácido cinámico para producir ácido *p*-cumárico y también está involucrada en la síntesis de monolignoles.
- 4-cumaroil-coenzima A ligasa (4CL; EC 6.2.1.12), representa el punto de entrada para la biosíntesis de compuestos fenilpropanoides, así como para las proantocianidinas, taninos, flavonoides, isoflavonoides y fitoalexinas. Cataliza la conversión de ácidos hidroxicinámicos como el ácido *p*-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico y ácido sinápico a sus productos correspondientes *p*-cumaroil-CoA, feruloil-CoA y sinapoil-CoA respectivamente.
- Chalcona sintasa (CHS; EC 2.3.1.74), es el miembro más representativo de la superfamilia de policétidos sintasa, condensa los precursores activos malonil CoA y 4-cumaroil CoA para formar naringenina-chalcona (Rivera-López, 1999). Es activada por un amplio rango de estímulos ambientales y los genes que la codifican son activados a nivel de la transcripción (Boss *et al.*, 1996; Clive y Nicholson, 1998). Es importante destacar que la acumulación de chalconas en tejidos vegetales no es común, ya que son isomerizadas rápidamente por la chalcona isomerasa a naringenina. Esta enzima proporciona el paso más importante que conduce a la formación de flavonoides, puesto que cataliza la adición de tres unidades C<sub>2</sub> provenientes de malonil-CoA a cumaroil-CoA; formando el esqueleto básico de los flavonoides.
- Chalcona isomerasa (CHI; EC 5.5.1.6), cataliza la isomerización estéreo específica de chalcona a una molécula 2S-flavanona, como la naringenina.

- Flavanona-3-hidroxilasa (F3H; EC 1.14.11.9), es una de las enzimas nucleares que actúa en la bifurcación de la ruta biosintética de los flavonoides y cataliza la hidroxilación del carbono 3 en el anillo C de las (2S)-flavanonas, como naringenina, para transformarlo en dihidroflavonoles (Kumar *et al.*, 2016). La enzima, del tipo citocromo P450 hidroxilasa, dirige el flujo de carbono a la síntesis de antocianinas y leucoantocianidinas (Springob *et al.*, 2003). Las diferentes hidroxilasas son importantes para la determinación del color (rojo-púrpura) y la capacidad antioxidante de las diferentes plantas (Zhang *et al.*, 2003).
- Dihidroflavonol-4-reductasa (DFR; EC 1.1.1.219), pertenece a la familia de las oxidorreductasas, utiliza NADPH como cofactor y cataliza la reducción de dihidroflavonoles a sus respectivas leucoantocianidinas, las cuales son precursoras de la biosíntesis de antocianinas y proantocianidinas.
- Antocianidina sintasa (ANS; EC 1.14.11.19), es una oxoglutarato oxigenasa dependiente de hierro que cataliza el penúltimo paso en la biosíntesis de antocianinas, a partir de las incoloras leucoantocianidinas a las coloreadas antocianidinas (Wilmouth *et al.*, 2002). Las leucoantocianidinas son bastante inestables y se convierten rápidamente en antocianidinas gracias a la ANS.
- Flavonol sintasa (FLS; EC 1.14.11.23), cataliza la formación de los flavonoles a partir de la instauración de flavanonas. Esta enzima pertenece a la familia de dioxigenasas dependientes de oxígeno molecular y 2-oxoglutarato para su actividad, igual que la FHT (Wellmann *et al.*, 2002). FLS convierte naturalmente los (2R,3R)-dihidroflavonoles, por ejemplo, dihidrokaempferol, a sus correspondientes flavonoles (kaempferol).
- Leucoantocianidina reductasa (LAR; EC 1.17.1.3), está involucrada en la biosíntesis de proantocianidinas, ya que cataliza la reducción de 2R,3S,4S-flavan-3,4-dioles dependiente de NADPH a 2R,3S-flavan-3-oles. LAR sintetiza catequina, un compuesto con actividad anticancerígena, a partir de 3,4-*cis*-leucocianidina. Además de la síntesis de proantocianidinas (PAs), la catequina es un monómero inicial de los taninos condensados (Tanner *et al.*, 2003).

- Antocianidina reductasa (ANR; EC 1.3.1.77), cataliza el punto clave en la biosíntesis de PAs, metabolitos responsables de la pigmentación café en semillas (Kovinich *et al.*, 2012).
- Flavonol 3-O-glucosiltransferasa (FGT; EC 2.4.1.91), permite la formación de antocianinas a partir de antocianidinas (Cheng *et al.*, 2006). La función primaria en la ruta de los flavonoides, es unir un glucósido en una molécula de flavonol, formando un flavonol 3-O-glucósido. Los flavonoides que actúan como sustrato en esta reacción incluyen quercetina, kaempferol, dihidrokaempferol y fisetina principalmente.

### 2.3 LA LUZ UV-C Y SUS EFECTOS EN LAS PLANTAS

La luz juega un rol esencial en las plantas, ya que provee energía para llevar a cabo la fotosíntesis para la síntesis de azúcares y otros compuestos orgánicos, también proporciona información estacional y temporal para la regulación del crecimiento y desarrollo de la planta. Un componente importante de la luz solar es la radiación UV, la porción del espectro electromagnético correspondiente a UV incluye la longitud de onda larga UV-A (320-400 nm), onda media UV-B (280-320 nm) y onda corta UV-C (200-280 nm) (Bintsis *et al.*, 2000) (Figura 5). La luz UV-A, al igual que una pequeña fracción de la luz UV-B, pueden atravesar la atmósfera, alcanzar la superficie de la tierra y ser percibida por las plantas (Matsumi y Kawasaki, 2003); en cambio, la luz UV-C no alcanza la superficie de la tierra, puesto que la capa de ozono la absorbe eficientemente. Es por esto, que la mayoría de investigaciones realizadas en los efectos biológicos y mecanismos de acción se enfocan en luz UV-A y luz UV-B.



**Figura 5.** Espectro electromagnético de UV.

Diversos estudios han demostrado que las plantas tienen al menos cinco tipos de fotorreceptores sensoriales, para percibir adecuadamente la luz y desencadenar eventos que optimizan el crecimiento y el desarrollo además de prevenir el daño, estos receptores son: los criptocromos sensores de luz azul, las fototropinas y los miembros de la familia Zeitelupe, los fitocromos sensores de la luz roja y el foto receptor UVR8 (UV RESISTANCE LOCUS 8) (Tilbrook *et al.*, 2013). Urban *et al.*, (2016), sugieren que UVR8 también es un receptor de la luz UV-C, ya que su espectro de acción sobrelapa la región UV-C lo cual podría activar elementos clave de la cascada de transducción de señales; entre los que se incluyen varios factores de transcripción (TF) como COP1 y MYBF1 que promueven la biosíntesis de flavonoles a través de la expresión de *FLS*, y factores de transcripción con el dominio *bHLH*, MYB24 y MYBF1, que promueven la biosíntesis de monoterpenoides (Carbonell-Bejerano *et al.*, 2014). Los mecanismos moleculares de las plantas en respuesta a la luz UV-A y UV-B que afectan la biosíntesis de antocianinas han sido establecidos; no obstante, para la irradiación de luz UV-C son poco conocidos.

### **2.3.1 Efecto “hormesis” de la luz UV-C como tratamiento para incrementar la calidad de frutos**

En años recientes, la luz UV ha sido explotada con propósitos agronómicos, por proporcionar efectos positivos a cultivos de interés, como lo es la desinfección de frutos frescos cortados y la estimulación del metabolismo secundario para la producción de compuestos de interés, incluyendo aquellos con beneficios para la salud humana (Ben-Yehoshua y Mercier, 2005; Schenk *et al.*, 2008). Es considerada una técnica “amigable para el medio ambiente”, por ser un tratamiento simple que se realiza a bajas temperaturas y es de bajo costo. La radiación UV tiene mayor energía que la luz visible y es considerada como no ionizante, afectando solo a aquellas moléculas que la absorben directamente, como el ADN, las proteínas y los compuestos fenólicos (Charles *et al.*, 2008). Dentro del espectro UV, la luz UV-C resulta ser más efectiva para estos propósitos agronómicos, pues al ser de onda

corta y poseer mayor energía sus fotones, requiere menor tiempo de exposición comparada con la luz UV-B a una misma intensidad, donde generalmente la exposición abarca horas o días.

Si bien la luz UV a altas dosis es perjudicial para los seres vivos, a bajas dosis genera diversos efectos benéficos. Este fenómeno es conocido como “hormesis”, y se describe como la aplicación de radiación potencialmente dañina en bajas dosis a organismos vivientes con la finalidad de inducir respuestas de estrés con un efecto benéfico (Jagadeesh *et al.*, 2009). El tratamiento que se aplica utiliza un equipo simple que consiste en una lámpara de cuarzo embebida con pequeñas cantidades de mercurio. Los tratamientos se han utilizado en dosis con un rango de 0.2 hasta 20 kJ/m<sup>2</sup>.

El efecto de hormesis en luz UV-C estimula la síntesis de compuestos fenólicos que juegan un rol importante en la resistencia de las plantas a patógenos (Charles *et al.*, 2008); por ejemplo, la síntesis de las ligninas y suberinas que se depositan en la pared celular y sirven como barreras en contra del desarrollo de patógenos, y las fitoalexinas que son sustancias tóxicas para los patógenos (Windram *et al.*, 2012). Igualmente, estimula la transcripción de genes importantes en la defensa de las plantas, incluidos la fenilalanina amonio liasa, enzima clave que controla la síntesis de compuestos fenólicos, así como proteínas relacionadas a patogénesis (PRs) como la quitinasa (PR3) y la  $\beta$ -1,3-glucanasa (PR2) (El Ghaouth *et al.*, 2003). Por otra parte, se ha observado que incrementa el potencial “nutracéutico” o “bioactivo” de algunos frutos (Reyes, 2004), al inducir la biosíntesis de diferentes metabolitos secundarios, como los flavonoides (Jagadeesh *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2017). En la célula, la absorción directa de los rayos UV es llevada a cabo por compuestos orgánicos con estructuras en forma de anillo, como los compuestos fenólicos. El aumento en la cantidad de fenoles y flavonoides se ha obtenido en mangos irradiados con dosis de 2.46 kJ/m<sup>2</sup> (González-Aguilar *et al.*, 2007) y de 4.93 kJ/m<sup>2</sup> en arándanos (Perkins-Veazie *et al.*, 2008). Además, el estudio de este efecto ha permitido el desarrollo de “vinos enriquecidos de estilbenos” y jugos de uva con altas

concentraciones de resveratrol (Cantos *et al.*, 2001; González-Barrio *et al.*, 2009). El tratamiento de “hormesis” ha permitido también el incremento de carotenoides; ejemplo, de ello es el incremento de licopeno en jitomates tratados con una dosis de luz UV-C de 3.7 kJ/m<sup>2</sup> (Liu, 1993).

Las plantas activan enzimas protectoras cuando la producción de radicales libres de oxígeno es estimulada por estrés. Se sabe que la luz UV-C induce la producción de especies reactivas de oxígeno y otros oxidantes, desencadenando la activación de enzimas depuradoras de éstos. La alta concentración natural de ácido ascórbico en la fresa (Tabla I), indica que éste puede ser otro factor de protección. La actividad de la ascorbato oxidasa, que oxida el ácido ascórbico como antioxidante, puede jugar un papel importante en la protección a estas especies reactivas de oxígeno.

### **2.3.2 Estudios moleculares relacionados a la biosíntesis de flavonoides en respuesta a la luz UV-C**

El metabolismo de las antocianinas se encuentra bajo la compleja regulación de diversos genes regulados a nivel transcripcional; ejemplo de ello son los genes de los TF pertenecientes a la familia *MYB* (Springob, 2003; Wu *et al.*, 2017). En *Arabidopsis thaliana*, se sabe que los genes *MYB* (*PAP*) pueden coordinar junto con proteínas bHLH (*TTG1*) y activar la biosíntesis de antocianinas regulando la expresión de *PAL* y la chalcona sintasa (*CHS*), en conjunto con otros genes (Borevitz *et al.*, 2000). Del mismo modo, en manzana se ha observado que éstas regulan coordinadamente la expresión de *F3H*, *DFR*, *ANS* y *GT* (Lin-Wang *et al.*, 2009; Brueggemann, 2010). No obstante, las respuestas a nivel transcripcional de los genes estructurales del metabolismo de las antocianinas al tratamiento con UV-C, permanecen poco estudiadas. Se ha demostrado que los TF de la familia *MYB* son inducidos en respuesta a la luz UV-C en col roja (Wu *et al.*, 2017) y que la acumulación de antocianinas como respuesta al tratamiento, parecen ser transitorias con los efectos beneficiosos disipados con el tiempo, como se ha observado en los arándanos (Costa *et al.*, 2006). A nivel traduccional se ha observado el incremento de la actividad de *PAL* en distintos frutos irradiados como

uva (Liu *et al.*, 1993), fresa (Nigro *et al.*, 2000) y durazno (El Ghaouth *et al.*, 2003). Sin embargo, no se ha establecido si la actividad de PAL es atribuida a una síntesis de *novo* o a la inducción de una enzima preexistente. Se han descrito al menos 6 miembros de la familia de genes de PAL en fresa (Amil-Ruiz *et al.*, 2011), como parte del equipo de genes de defensa de la planta (*FaPAL1*, *FaPAL2*, *FaPAL3*, *FaPAL4*, *FaPAL5* y *FaPAL6*).

### 2.3.3 Irradiación luz UV-C en fresa

El efecto de la irradiación de luz UV-C depende del cultivar y las condiciones de cultivo de los frutos. En *F. x ananassa* D. se ha evaluado el efecto en diversos cultivares y de manera general, se ha observado el retraso en la maduración de los frutos una vez expuestos a diferentes dosis de irradiación. Por ejemplo, en dosis de 4.1 y 6.9 kJ/m<sup>2</sup> para el cv. Seascape (Pan *et al.*, 2004), los frutos mostraron menos enrojecimiento superficial.

El tratamiento con luz UV-C también aumenta el contenido de compuestos nutraceuticos, como las antocianinas y compuestos fenolicos en algunos cultivares (Tabla II). Para las antocianinas, el incremento se ha reportado en el cultivar Camino Real (Ayala-Gil, 2011; Pombo *et al.*, 2011). No obstante, existen cultivares, como Seascape (Pombo *et al.*, 2004) y Camarosa (Pombo *et al.*, 2004; Allende *et al.*, 2007), en donde la cantidad de antocianinas de los frutos tratados con UV-C es similar a los controles; e inclusive hay cultivares en donde el tratamiento causa una disminucion de dichos compuestos (Erkan *et al.*, 2008). El comportamiento de los compuestos fenolicos, es similar a las antocianinas; la variedad Seascape no presenta diferencia en la cantidad total de compuestos fenolicos y para 'Camarosa' el uso de luz UV-C la redujo significativamente.

**Tabla II.** Efectos de la luz UV-C (254 nm) en frutos post cosecha de *F. x ananassa*.

Cultivar	Dosis UV-C (kJ m <sup>-2</sup> )	Incremento	Referencia
Camino Real	2.4	30-50% Compuestos fenólicos y antocianinas	Ayala-Gil (2011)
Aroma	4	15-20% Compuestos fenólicos y antocianinas	Pombo <i>et al.</i> , (2011)
Camarosa	2.82	1-2% Compuestos fenólicos y antocianinas	Allende <i>et al.</i> , (2007)
Allstar	0.43-4.30	0-1% Antocianinas y disminución en compuestos fenólicos	Erkan <i>et al.</i> , (2008)
Seascape	4.1	0 %	Pan <i>et al.</i> , (2004)

### III. JUSTIFICACIÓN

La exposición de frutos de fresa a la luz UV-C incrementa metabolitos que tienen un impacto favorable en la salud de los humanos. Sin embargo, el mecanismo de regulación genética que controla la síntesis, tipos y cantidades de metabolitos en *Fragaria x ananassa* cv. Camino Real está poco estudiado.

### IV. HIPÓTESIS

La iluminación de luz UV-C provoca cambios en el nivel de expresión de genes implicados en la síntesis de flavonoides en *Fragaria x ananassa* cv. Camino Real.

### V. OBJETIVOS

#### 5.1 Objetivo general

Determinar los cambios en los niveles de expresión de genes implicados en la síntesis de flavonoides en el fruto de fresa *F. x ananassa* cv. Camino Real sometida a iluminación UV-C postcosecha.

#### 5.2 Objetivos específicos

1. Determinar si existe efecto de la luz UV-C sobre las concentraciones de flavonoides, antocianinas y la capacidad antioxidante en el fruto de la fresa *F. x ananassa* cv. Camino Real, estimuladas con luz UV-C.
2. Identificar el número de integrantes de las familias de genes relacionados en la biosíntesis de flavonoides en *F. x ananassa* cv. Camino Real.
3. Determinar los perfiles de expresión de los genes de biosíntesis de flavonoides en *F. x ananassa* cv Camino Real en respuesta a la irradiación con luz UV-C.
4. Evaluar la actividad enzimática de la fenilalanina amonio liasa (PAL) y de la ascorbato oxidasa (AAO) en respuesta al estímulo con luz UV-C.

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 MATERIAL BIOLÓGICO**

El material biológico estuvo constituido de frutos de fresa cv. Camino Real obtenidos de una plantación de campo de fresa ubicada en la región de Irapuato, Guanajuato, en el que se utilizó la técnica de invernaderos. Los frutos fueron seleccionados en ausencia de daño, uniformidad de tamaño y mostraban un color rosado-rojo en por lo menos  $\frac{3}{4}$  partes de su superficie. Se colectaron cerca de 50 frutos en junio del 2016.

### **6.2 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS**

#### **6.2.1 Determinación de peso, tamaño, pH, °Brix, turbidez, claridad y proteínas del fruto.**

- Determinación de peso y tamaño

Los frutos de fresa que fueron seleccionados se desinfectaron con 3 ppm de cloro comercial (CLORALEX) y el exceso de agua se retiró con toallas de papel. Después, fueron pesados en una balanza (Scout Proo, OHAUS) y su tamaño se determinó con el uso de un vernier. Posteriormente, se realizó el corte del pedúnculo con un cuchillo y se volvieron a pesar los frutos en la balanza.

- Determinación del pH

Para la determinación del pH y solutos totales, los frutos de fresa fueron licuados en un homogeneizador de tejidos durante 2 minutos a 22°C. El pH de las muestras se midió a partir del licuado obtenido mediante el uso de un potenciómetro (Thermo Scientific) a 23°C, previamente calibrado con soluciones amortiguadoras a pH de 4.0, 7.0 y 11.0.

- Determinación de sólidos solubles totales

Los sólidos solubles se midieron a partir del homogeneizado obtenido y se determinaron los índices de refracción en un refractómetro MASTER-H 2354-E04 (escala de 0.0-50.0%) a 22°C. Todos los valores fueron reportados como °Brix.

- Determinación de turbidez y claridad

La turbidez de los frutos de fresa se determinó a 610 nm utilizando el espectrofotómetro de UV-VIS (Multiskan go, Japón). La absorbancia se obtuvo en relación al agua destilada, y su respectiva turbidez se calculó utilizando la siguiente fórmula

$$\text{Transmitancia (T)} = 100 \times (10^{-\text{Abs}})$$

donde Abs es la absorción a una longitud de onda de 610 nm, y

$$\text{Turbidez} = 100 - T$$

donde T es la transmitancia a 610 nm.

Para determinar la claridad, se licuaron 10 g de fresa en un homogeneizador industrial, posteriormente se centrifugaron 2 mL del homogenado a 2,500 x g por 10 minutos. Se recolectó el sobrenadante y se cuantificó la transmitancia entre 400 y 800 nm utilizando un espectrofotómetro UV-VIS. En cada caso se utilizó agua destilada como estándar de referencia. Un alto porcentaje de la transmitancia se correlacionó con una alta claridad del jugo en las muestras.

- Determinación de proteínas

La concentración de proteínas totales del fruto entero se estimó a partir del extracto obtenido de 500 mg de fruto de fresa previamente molido en N<sub>2</sub> líquido en tubos de 2 mL. Posteriormente, se resuspendió en 850 µL de buffer de extracción (100 mM de solución de fosfato de potasio, pH 8.0; polivinilpolipirrolidona 1% (w/v) y 1.4 mM β-mercaptoetanol). Después se centrifugó a 15,000 rpm por 15 min a 4°C, y el sobrenadante total se utilizó (Trotel-Aziz *et al.*, 2006). Las proteínas se determinaron utilizando el método de Bradford (Bradford 1976) con Azul de Coomassie (Sigma-

Aldrich) y albumina sérica bovina (BSA) como estándar. La curva estándar y cuantificación de la muestra se realizó en placas de 96 pozos de acuerdo a lo descrito por el proveedor. Se prepararon muestras de BSA en un rango de 0.1-0.30 mg/mL en agua destilada estéril (de), se agregaron 5  $\mu$ L de los estándares preparados o de la muestra en las placas de 96 (Nunc, Sigma, EUA) y para los blancos se utilizaron 5  $\mu$ L de buffer de fosfatos. Posteriormente, se añadieron 250  $\mu$ L del reactivo de Bradford, la mezcla se agitó durante 30 segundos, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se cuantificó la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro de UV-VIS (Multiskan go, Japón) utilizando blanco como referencia. La curva estándar se obtuvo mediante un gráfico de absorbancia vs.  $\mu$ g de BSA (Anexo 1). El contenido de proteínas totales en cada muestra desconocida se determinó mediante este gráfico.

La valoración de las propiedades fisicoquímicas, fue realizada a partir de 5 lotes de 3 muestras por lote para un total de 15 lecturas.

### **6.3 TRATAMIENTO CON LUZ UV-C**

Una vez que los frutos de fresa se pesaron y desinfectaron, se seleccionaron 15 frutos que presentaron peso homogéneo, se dividieron en cinco grupos representados por 3 fresas cada uno. Posteriormente, los frutos se cortaron en rebanadas de 1 cm con ayuda de un cortador de fresa comercial (Metaltext, Holanda). Cada grupo, se dividió en dos partes, donde el primer grupo representó las muestras control y el segundo se sometió al proceso de irradiación. Los dos grupos, se colocaron en charolas de plástico (17 x 25 cm), las cuales se introdujeron en dos cajas que contenían cuatro lámparas fluorescentes de luz UV (TecnoLite 615T8) colocadas de forma horizontal en la parte superior e inferior de la caja. Para las muestras control, no se encendieron las lámparas, pero se mantuvieron en la caja cerrada. Al grupo representado por las fresas tratadas se le sometió a irradiación con una dosis de 2.0 kJ/m<sup>2</sup>s, la cual se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$D = I * t$$

La intensidad de las lámparas se determinó con fluxómetro y el tiempo requerido para alcanzar la dosis fue de 14 minutos. Esta dosis ya se había establecido previamente como la óptima para alcanzar los máximos niveles de flavonoides en esta variedad de fresa (Ayala-Gil, 2011). Inmediatamente después del tratamiento, los frutos control y tratados, se maceraron en nitrógeno líquido (N<sub>2</sub> líquido) y se almacenaron a -70°C.

#### **6.4 EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS**

Los compuestos fenólicos fueron extraídos según Ayala-Gil (2011), a partir de 100 mg de cada muestra, previamente molida con N<sub>2</sub> líquido. El tejido se colocó en un recipiente de vidrio, de aproximadamente 5 mL de capacidad, y se le adicionaron 2 mL del buffer de extracción [metanol acidificado al 0.05% con ácido trifluoroacético; agua: acetona (40:60 v/v)]. Se mantuvo en oscuridad y agitación constante durante dos horas. Posteriormente, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se concentró en un rotavapor (BÜCHI 461, Alemania) a 37°C. Todo el procedimiento fue llevado a cabo en condiciones de oscuridad, para evitar la fotooxidación de los compuestos.

#### **6.5 HIDRÓLISIS ÁCIDA DE LOS EXTRACTOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS, COMPUESTOS FENÓLICOS, FLAVONOIDES Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

Para la cuantificación de antocianinas, compuestos fenólicos, flavonoides y capacidad antioxidante, se realizó previamente un proceso de hidrólisis ácida a los extractos de compuestos fenólicos obtenidos anteriormente. La hidrólisis fue llevada a cabo de acuerdo con lo establecido por Ayala-Gil (2011) en condiciones de luz reducida. Por cada mL de extracto se le adicionó el doble del volumen (2 mL) de HCl 2 N, y se dejó en ebullición durante 1 hora. Después, las muestras se incubaron en hielo por 15 minutos, se centrifugaron a 12,000 rpm a 4°C y se recuperó el

sobrenadante. Se extrajeron los compuestos con 1 mL de acetato de etilo en cuatro ocasiones. Posteriormente se concentró en el rotavapor y se recuperó con 2 mL de metanol. A partir de este extracto, se realizó la cuantificación por espectrofotometría de los diferentes compuestos utilizando el espectrómetro Multiskan Go (Thermo Scientific, EUA) y placas Nunc de poliestireno de 96 pozos (Sigma, EUA). La cuantificación de las muestras se realizó por triplicado y se utilizaron curvas de calibración para la determinación del contenido de cada compuesto (Anexo 1).

### **6.5.1 Determinación del contenido total de antocianinas**

La cuantificación de antocianinas se realizó por medio del método de pH diferencial (Cheng y Breen, 1991) y como estándar se emplearon diferentes concentraciones de pelargonidina, a partir de una solución de 1 mg/mL. Se utilizaron 300  $\mu$ L del extracto hidrolizado, al cual se le adicionaron 700  $\mu$ L del buffer A (cloruro de potasio 2.5 mM, pH 1.0) o buffer B (acetato de potasio 400 mM, pH 4.5), y se agitó en vórtex por 10 s. Finalmente, se midió la absorbancia a 510 y 700 nm con respecto al blanco (metanol en sustitución del extracto). La absorbancia se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Absorbancia} = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 1} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 4.5}$$

El total de antocianinas se expresó como mg de pelargonidina/100 g de peso fresco.

### **6.5.2 Determinación del contenido total de compuestos fenólicos**

El contenido de compuestos fenólicos se determinó de acuerdo al procedimiento establecido por Sinkard y Singleton (1997) utilizando el reactivo Folin Ciocalteau; para lo cual se utilizaron 100  $\mu$ L del extracto hidrolizado y se les adicionaron 500  $\mu$ L del reactivo Folin Ciocalteau 1 N (Sigma, EUA). La mezcla se mantuvo en agitación durante 5 minutos; después se adicionaron 400  $\mu$ L de carbonato de sodio 7.5% (p/v), se agitó en vórtex por 10 segundos y se incubó durante 90 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Como estándar se utilizaron diferentes concentraciones de ácido gálico (Sigma) de una solución de 1 mg/mL en metanol

puro. Posteriormente, se midió la absorbancia a 765 nm con respecto al blanco (agua destilada estéril por el reactivo de Folin y metanol en sustitución del estándar). Los compuestos fenólicos totales se expresaron como mg de ácido gálico/100 g de peso fresco.

### 6.5.3 Determinación de flavonoides

Para la cuantificación de compuestos fenólicos se utilizó el método colorimétrico de cloruro de aluminio descrito por Woisky y Salatino (1998). Se utilizaron 500  $\mu$ L de las muestras por triplicado, se adicionaron 460  $\mu$ L de metanol puro, 20  $\mu$ L de cloruro de aluminio al 2% y 20  $\mu$ L de acetato de potasio 7.5%. La mezcla se agitó en vórtex durante 15 segundos y se incubó en la oscuridad durante 45 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se transfirieron 200  $\mu$ L a una placa de 96 pozos y se midió la absorbancia a 450 nm con respecto al blanco (agua destilada estéril y cloruro de aluminio al 2%); como referencia se utilizó una solución "stock" de 1 mg/mL de quercetina en metanol puro.

### 6.5.4 Determinación de capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se determinó por el método del DPPH (2,2-difenol-1-picrilhidrazilo) según (Brand-Williams *et al.*, 1995) utilizando como compuesto antioxidante Trolox (ácido  $(\pm)$ -6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) (SIGMA, EUA). Primero, se preparó una solución de 3.9 mg de DPPH en 100 mL de metanol al 80% en agua destilada. Se agregaron 900  $\mu$ L de esta mezcla a 100  $\mu$ L del extracto y como blanco de referencia se utilizaron 100  $\mu$ L de metanol al 80%. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 120 minutos en oscuridad y se midió la absorbancia a 517 nm. La absorbancia se determinó con la siguiente fórmula:

$$\text{Absorbancia} = (A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}})$$

El total de capacidad antioxidante se expresó como mM de Equivalente Trolox o ET/100 g de peso fresco.

## 6.6 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

El ARN total fue extraído siguiendo el protocolo descrito por Tzanetakis y Martin, (2008), a partir de 100-200 mg de tejido previamente molido con N<sub>2</sub> líquido. El tejido se colocó en un mortero frío y se le adicionaron 500 µL de buffer de extracción (200 mM Tris HCl, pH 8.5; 300 mM cloruro de litio; 1.5% dodecilsulfato de litio; 10 mM EDTA; 1% desoxicolato de sodio; 2% polivinilpirrolidona; 1% Tergitol NP-40) con 1% de β-mercaptoetanol, y se obtuvo una pasta homogénea con ayuda de un pistilo. Posteriormente, la pasta se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 2 mL y se adicionaron 500 µL más de buffer de extracción con β-mercaptoetanol. La mezcla se centrifugó a 13,000 rpm durante 20 minutos, y 600 µL del sobrenadante se transfirieron a un tubo de 2 mL que contenía 600 µL de acetato de potasio 6 M. Se centrifugó nuevamente a las condiciones antes mencionadas, y se recuperaron 750 µL del sobrenadante, los cuales se transfirieron a un tubo de 1.5 mL que contenía el mismo volumen de isopropanol. Se mezcló por inversión y se centrifugó, se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 500 µL de buffer de lavado (10 mM Tris HCl, pH 7.5; 0.5 mM EDTA; 50 mM NaCl y 50% de etanol), posteriormente se adicionaron 25 µL de la preparación de sílica/milk glass (Rott *et al.*, 2001) y se centrifugó a 5,000 rpm por 10 s. La pastilla formada se lavó dos veces con el buffer de lavado centrifugando a 13,000 rpm por 30 s. Al finalizar, la pastilla se secó a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 min y se resuspendió en 150 µL de buffer TE, después se incubó a 70°C por 5 minutos y se centrifugó a 13,000 rpm por 1 minuto. Finalmente, 100 µL del sobrenadante se transfirieron a un tubo de 1.5 mL y se almacenaron a -80°C hasta su uso. La sílica/milk glass se preparó de la siguiente forma: se añadieron 60 g de partículas de sílice (Sigma S5631) a 500 mL de H<sub>2</sub>O destilada estéril, se mezcló bien y se dejó reposar por 24 h. Se descartaron 470 mL del sobrenadante y se agregaron otros 500 mL de H<sub>2</sub>O destilada estéril, se mezcló bien y se dejó reposar otras 5 h. Se descartaron 440 mL

del sobrenadante y la suspensión restante de 60 mL se ajustó a pH 2.0 con HCl. Se esterilizó en autoclave y se almacenó en una botella oscura a temperatura ambiente. Se pueden preparar alicuotas en tubos eppendorf de 1.5 mL para su almacenamiento a 4°C durante varios meses.

Una vez finalizada la extracción, se verificó la integridad del ARN por medio de electroforesis en gel de agarosa y visualizado con luz ultravioleta mediante Gelred (Biotium, EUA). La integridad se determinó a través de las bandas de ARN ribosomal (18S y 28S), la concentración y pureza fueron determinadas por espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, EUA).

### **6.7 SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO (ADNc)**

La síntesis de la primera cadena de ADNc fue realizada a partir de 100-200 ng de ARN total previamente tratado con DNasa I (Thermo Scientific, EUA) utilizando el kit de retro-transcripción SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen™) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. La mezcla de reacción fue la siguiente: 3 µL ARN tratado con DNase I, 1 µL Oligo dT, 1 µL dNTPs (10 mM) y aforar a 12 µL con agua destilada estéril; posteriormente se incubó a 65°C por 5 min e inmediatamente después en frío por 2 min. Después se añadió a la mezcla 4 µL de buffer de reacción, 2 µL 0.1M DTT, 1 µL de RNase OUT y 1 µL SuperScript III. Esta reacción se incubó a 55°C por 50 min, y se inactivó a 70°C por 15 min.

La amplificación del gen endógeno de *β-actina* (LC017712.1), se utilizó para corroborar la síntesis de ADNc. Para cada muestra de ARN, la síntesis de ADNc se realizó dos veces, y los productos se mezclaron antes de los estudios de expresión génica.

### **6.8 SELECCIÓN DE LOS GENES DE INTERÉS PARA ANÁLISIS qPCR**

Las secuencias de los genes de biosíntesis de flavonoides fueron obtenidas mediante la búsqueda por nombre del genoma de referencia de *Fragaria x ananassa*

en la base de datos Rosaceae Database (<https://www.rosaceae.org>) y NCBI. Todas las secuencias se analizaron manualmente para confirmar la presencia de los dominios utilizando los programas MOTIF Search e InterPRoScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>).

## 6.9 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Para la cuantificación de la expresión mediante qPCR, se diseñaron oligonucleótidos siguiendo la metodología descrita por Thornton y Basu (2011). De manera general, los oligonucleótidos se diseñaron utilizando las herramientas bioinformáticas Primer3 ([http://biotools.umassmededu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmededu/bioapps/primer3_www.cgi)), Beacon Designer (<http://www.premierbiosoft.com>), UNAFold (<http://www.idtdna.com/UNAFold>) y Oligo Evaluator (<http://www.oligoevaluator.com>). Los oligonucleótidos se eligieron y validaron *in silico* utilizando el programa Primer BLAST-analysis específico (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Los genes de referencia candidatos para la normalización de la expresión relativa *18S-ARNr*, *actina* y *GADPH* fueron validados utilizando el método de geNorm (versión 3.5).

## 6.10 PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qPCR)

Para el análisis de RT-qPCR, se extrajo ARN total del material vegetal como se describe en la sección 6.8, y se sintetizó ADNc como se describió en la sección 6.9. La cuantificación de la expresión génica mediante qPCR se realizó a partir de 100 ng de ADNc sintetizado diluido con agua de. La amplificación se llevó a cabo en placas de 96 pozos en el equipo PikoReal™ Real-Time PCR System (Thermo Scientific, EUA) utilizando EXPRESS SYBR GreenER qPCR Supermix (Bio-Rad) como indicador de la amplificación bajo las condiciones mostradas en la Tabla III.

**Tabla III.** Condiciones utilizadas para qPCR

Desnaturalización	95°C por 5 min	1X
<b>Desnaturalización</b>	95°C por 30 s	40X
<b>Anillamiento</b>	60°C por 30 s	

Las reacciones de PCR se realizaron en cuatro réplicas técnicas de cada muestra. Para cada reacción de PCR se empleó un volumen total de 10  $\mu\text{L}$  que contenía 4  $\mu\text{L}$  de SYBR Green, 1  $\mu\text{L}$  de ADNc diluido (100 ng), 1  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleótido y 3  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril. La especificidad del producto fue verificada con una curva de disociación después de los 40 ciclos en un rango de 55-98°C incrementando gradualmente 0.5°C cada 3 s. Todos los ensayos incluyeron dos controles: a) sin templado y b) sin enzima.

Los niveles de expresión relativa se calcularon utilizando el  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  (Livak y Schmittgen, 2011) donde  $\Delta\Delta\text{CT}$  representa:

$$\Delta\Delta\text{C}_T = \Delta\text{C}_{T,t} - \Delta\text{C}_{T,c}$$

$$\Delta\text{C}_{T,t} = \text{C}_{T,\text{GT}} - \text{C}_{T,\text{RT}}$$

$$\Delta\text{C}_{T,c} = \text{C}_{T,\text{GC}} - \text{C}_{T,\text{RC}}$$

$\text{C}_{T,\text{GT}}$ : Ciclo umbral del gen de interés con tratamiento

$\text{C}_{T,\text{RT}}$ : Ciclo umbral de los genes de referencia con tratamiento

$\text{C}_{T,\text{GC}}$ : Ciclo umbral del gen de interés en condiciones control

$\text{C}_{T,\text{RC}}$ : Ciclo umbral de los genes de referencia sin tratamiento

Los valores obtenidos fueron normalizados utilizando la media aritmética de dos genes endógenos: *FaActina* ( $\beta$ -actina, LC017712.1) y *FaGADPH* (GADPH, AB363963.1). Todos los ensayos de amplificación se realizaron por cuadruplicado para cada uno de los genes empleados.

La expresión relativa de cada gen se normalizó por la resta del valor ciclo umbral (CT) correspondiente y usando el método comparativo  $\Delta\Delta\text{CT}$ .

### 6.11 3'RACE

Para identificar los extremos 3' de los genes *FaPAL*, *FaC4H*, *Fa4CL*, *FaFLS*, *FaDFR*, *FaLAR* y *FaCHS*, se utilizó el kit 5'-3' RACE (Invitrogen, EUA). Las secuencias de los oligonucleótidos izquierdos específicos utilizados de los diferentes genes se muestran en el Anexo 7 y el Oligo d(T) Anchor Primer como oligonucleótido reverso. La síntesis se realizó con las recomendaciones por el fabricante, a partir de 1 µL de ADNc de frutos maduros de fresa tratados con luz UV-C (sección 6.5). Posteriormente, los productos de PCR fueron purificados con el kit illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit" (GE Healthcare, Reino Unido), bajo las instrucciones del fabricante. Los fragmentos purificados se introdujeron en el vector pCR4/TOPO (Invitrogen, EUA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una vez obtenida la ligación del vector con el inserto, se procedió a transformar las células de *E. coli* TOP10 quimiocompetentes con la mezcla. El cultivo se inoculó en medio agar LB con 100 µg/mL de ampicilina y se incubó a 37°C durante 12 horas. Las colonias obtenidas, se verificaron por PCR y aquellas positivas se inocularon en medio LB líquido con 100 µg/mL de ampicilina y se incubaron a 37°C durante 12 horas. A partir de este cultivo, se extrajo el plásmido utilizando el kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen, EUA). Los plásmidos se mandaron secuenciar de tal manera que flanqueara al fragmento de PCR obtenido; y a las secuencias obtenidas se les realizó una comparación de nucleótidos con contra la base de datos Gene-Bank (NCBI) para encontrar similitud con las secuencias de cada gen.

## 6.12 SECUENCIACIÓN DE ADN

Todos los fragmentos de ADNc obtenidos en este trabajo, se mandaron secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la UNAM, en Cuernavaca, Morelos.

## 6.13 ENSAYOS ENZIMÁTICOS

### 6.13.1 Actividad enzimática de PAL

La preparación del extracto crudo enzimático para la determinación de la actividad de PAL, fue realizada según Trotel-Aziz *et al.*, (2006) y de acuerdo al protocolo descrito en la sección 6.4.3. Para determinar la actividad de PAL, se cuantificó la formación de ácidos cinámicos como fuera descrito por Aziz *et al.*, (2006). Se tomaron 150  $\mu$ L del extracto por triplicado y se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL, al cual se le adicionaron 850  $\mu$ L de fenilalanina 10 mM en buffer de boratos pH 8.0. Posteriormente, se adicionaron 300  $\mu$ L de la mezcla de reacción (extracto crudo + fenilalanina) y se introdujo en un lector de placas (Multiskan go, Thermo Scientific, EUA) a una temperatura de 30°C. Se tomaron lecturas a una absorbancia de 280 nm por 90 minutos en intervalos de 5 minutos. La absorbancia se midió con respecto al blanco (extracto crudo en la mezcla de incubación). Para determinar la concentración, se realizó una curva de calibración del ácido *trans*-cinámico (Anexo 1).

### 6.13.2 Actividad de ascorbato oxidasa

Para obtener el extracto enzimático crudo de ascorbato oxidasa, se pesaron 200  $\mu$ g de fruto de fresa previamente molido en N<sub>2</sub> líquido y se resuspendió en 1 mL de buffer de fosfatos (pH 6.5). Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 3,000 x g por 15 min a 4 °C, y los sobrenadantes totales se utilizaron como extracto crudo

enzimático. La determinación de la actividad enzimática, se realizó a partir de la cuantificación del consumo de oxígeno durante la oxidación del ácido ascórbico, de acuerdo a Nakano y Asada (1981). Se tomaron 50  $\mu\text{L}$  del extracto y se colocaron en una placa de 96 pozos, se adicionaron 150  $\mu\text{L}$  del buffer. Posteriormente, la placa se colocó en el lector (Multiskan go, Thermo Scientific, EUA) a temperatura ambiente. Se tomaron lecturas a una absorbancia de 265 nm por 5 min en intervalos de 30 s. La absorbancia se midió con respecto al blanco (extracto crudo en la mezcla de incubación), y el coeficiente de extinción molar utilizado fue de  $760 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Las actividades específicas de las enzimas se expresaron como unidades (U)  $\text{mg}^{-1}$  de proteína. El contenido de proteína de los extractos enzimáticos se determinó por el método de Bradford (Sigma-Aldrich), utilizando BSA como estándar (Anexo 1).

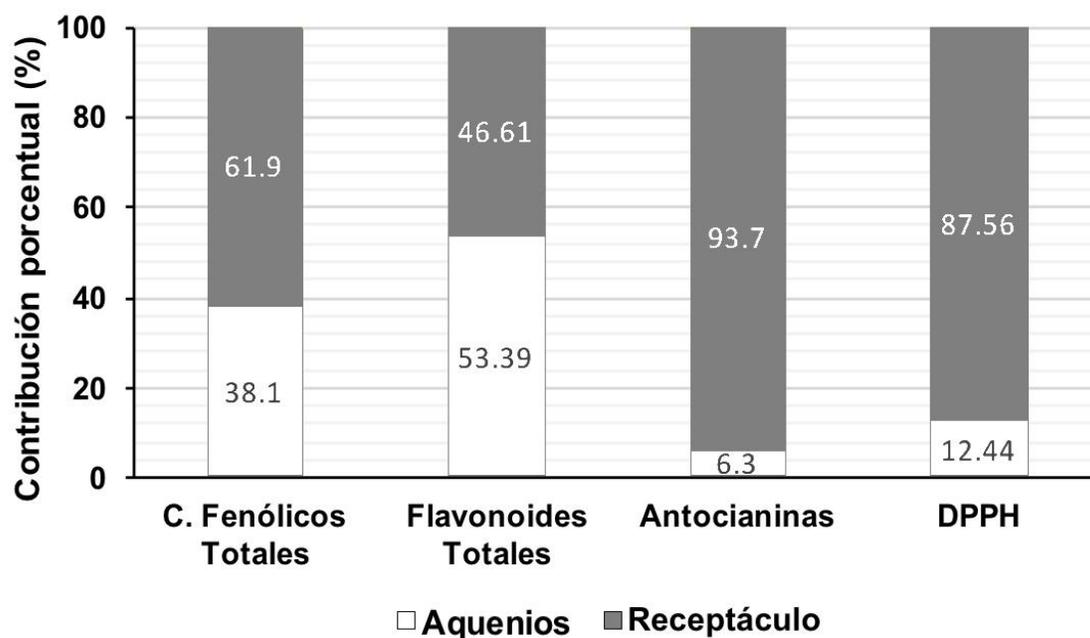
#### **6.14 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

El análisis estadístico de los datos se realizó empleando el software R con sus respectivos paquetes estadísticos (R Development Core Team, <https://www.r-project.org/>)

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Relación en el contenido de flavonoides en achenios y receptáculo de *F. x ananassa* Duch cv. Camino Real

De las seis variedades de *F. x ananassa* D. que se cultivan y comercializan en México, principalmente en la región de Guanajuato, se evaluó la respuesta a la luz UV-C en la variedad Camino Real. La selección se realizó con base a estudios previos en el laboratorio, los cuales demuestran que a una dosis de irradiación de 2.0 kJ/m<sup>2</sup>, el fruto maduro de esta variedad aumenta la cantidad de compuestos nutraceuticos específicamente flavonoides (Ayala-Gil, 2011). Para determinar si este aumento era constante en las diferentes partes del fruto (achenios y receptáculo), primero se determinó la contribución porcentual de las antocianinas, los compuestos fenólicos, los flavonoides y la capacidad antioxidante en los achenios y receptáculo (Figura 6).



**Figura 6.** Contribución porcentual (%) de los compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, antocianinas totales y capacidad antioxidante (DPPH) en los extractos de achenios y el receptáculo en frutos maduros de *F. x ananassa* cv.

Camino Real. La contribución se calculó tomando en cuenta el 100% del fruto entero utilizando el promedio de tres réplicas biológicas con cinco réplicas técnicas.

El peso promedio de los frutos maduros de *F. x ananassa* cv. Camino Real utilizados fue de  $5.483 \pm 0.272$  g y los aquenios representaron el 1.11% del peso fresco total ( $0.818 \pm 0.128$  g). En peso seco, los aquenios contribuyeron al 11.1%, considerando que el contenido de agua en el fruto fresco era del 90%. El receptáculo contribuyó con la mayor parte de las antocianinas (93.7%), los compuestos fenólicos totales (61.9%) y la capacidad antioxidante (87.56%); sin embargo, para el caso de los flavonoides totales, la distribución fue muy similar tanto en los aquenios (53.39%) como en el receptáculo (46.61%).

## 7.2 Tratamiento de irradiación con luz UV-C en frutos maduros de fresa

El tratamiento de irradiación con luz UV-C se realizó conforme al experimento descrito en la sección 6.3. Brevemente, los frutos enteros se cortaron en rebanadas de 1 cm y se dividieron en dos grupos; donde el primer grupo representó las muestras control y el segundo se sometió al proceso de irradiación con una dosis de  $2.0 \text{ kJ/m}^2\text{s}$  alcanzada a los 14 minutos de exposición con luz UV-C. Para las muestras control, no se encendieron las lámparas, pero se mantuvieron en la caja cerrada el mismo tiempo que los frutos tratados. Una vez alcanzado el tiempo, las muestras se sumergieron inmediatamente en  $\text{N}_2$  líquido, se trituraron y se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$ , en un periodo no mayor a 6 meses hasta realizar la determinación de las propiedades fisicoquímicas.

Los procesos fisiológicos y bioquímicos son afectados significativamente por la irradiación con luz UV; es por ello que se analizaron algunas propiedades fisicoquímicas, pH, solutos totales ( $^\circ\text{Brix}$ ), turbidez y claridad. Además, se confirmó el aumento significativo ( $p \leq 0.05$ ) en el contenido de antocianinas, compuestos fenólicos y flavonoides totales, así como la capacidad antioxidante en los extractos de frutos maduros (Tabla IV). El tratamiento no provocó cambios estadísticamente significativos ( $p > 0.05$ ) en el valor de pH y solutos totales, pero sí en la turbidez y la claridad, dos propiedades relacionadas con el color.

**Tabla IV.** Comparación de las propiedades fisicoquímicas en los frutos maduros de *F. x ananassa* cv. Camino Real irradiados con luz UV-C.

Parámetro	Tratamiento	
	Control	UV-C
pH	3.37± 0.06 a	3.38± 0.08 a
Solutos totales, °Brix	7.87± 0.22 a	8.10± 0.25 a
Turbidez, T	51.10± 1.11 b	58.45± 0.82 a
Claridad, %T	6.34± 0.12 a	2.90± 0.91 b
Antocianinas Totales <sup>a</sup>	22.46± 2.48 b	34.36± 2.41 a
Compuestos Fenólicos Totales <sup>b</sup>	240.74± 4.97 b	278.45± 7.63 a
Flavonoides Totales <sup>c</sup>	105.51± 3.39 b	140.52± 3.39 a
Capacidad antioxidante <sup>d</sup>	121.12± 10.99 b	159.69± 8.63 a

<sup>a</sup>El contenido de Antocianinas Totales se representa como mg de pelargonidina/100 g de pf del fruto.

<sup>b</sup>Compuestos Fenólicos Totales (mg de ácido gálico/100 g de pf del fruto). <sup>c</sup>Flavonoides Totales (mg de quercetina/100 g de pf del fruto). <sup>d</sup>Capacidad Antioxidante (mM ET/100 g de peso fresco). Los valores son el promedio de 5 réplicas ± DE. Letras diferentes en cada uno de los parámetros determinados, denotan diferencias significativas de las medias entre tratamiento de acuerdo a la prueba estadística de Tukey  $p < 0.05$ .

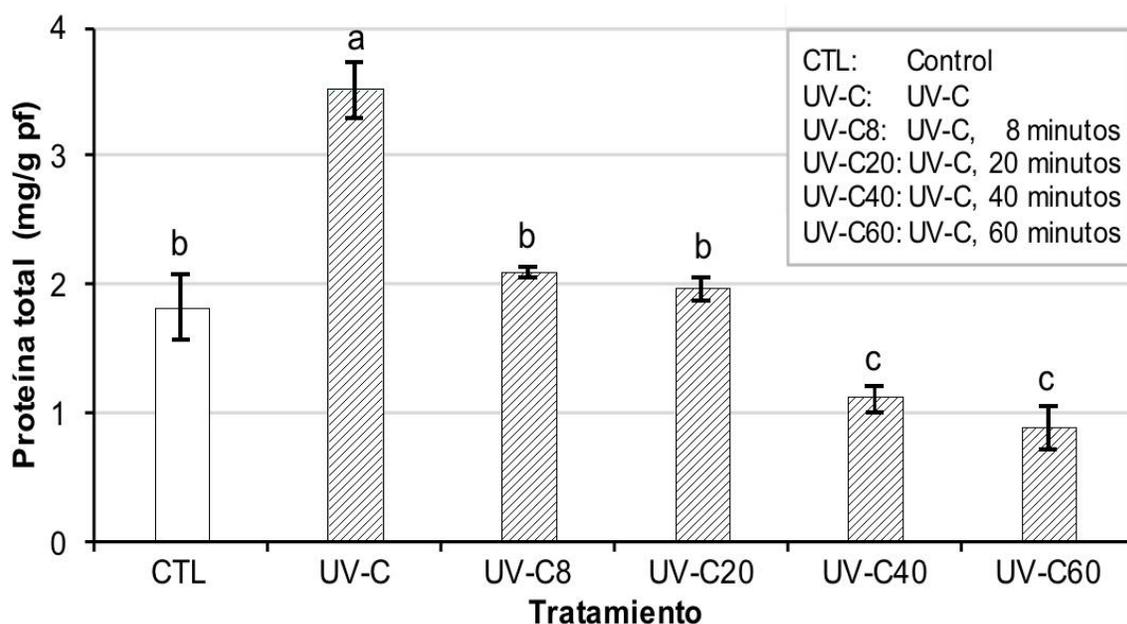
En promedio, el incremento en antocianinas, compuestos fenólicos y flavonoides, debido al tratamiento con luz UV-C fue de 52.9, 15.6 y 33.2%, respectivamente. La capacidad antioxidante también aumentó 31.8% en los frutos tratados.

### 7.3 Efecto de la luz UV-C en el contenido de proteínas totales

Algunas propiedades bioquímicas, incluida el contenido de proteínas totales, son afectadas significativamente por la irradiación con luz UV. El aumento en el contenido de proteínas totales como producto de la síntesis de enzimas y proteínas de defensa ha sido observada en frutos tratados con luz UV-C, aunque también se ha reportado una disminución de esta cantidad, debido a la degradación de proteínas. Es por ello, que se evaluó el contenido de proteínas totales en las diferentes partes del fruto, y a diferentes tiempos de incubación después de la irradiación con luz UV-C.

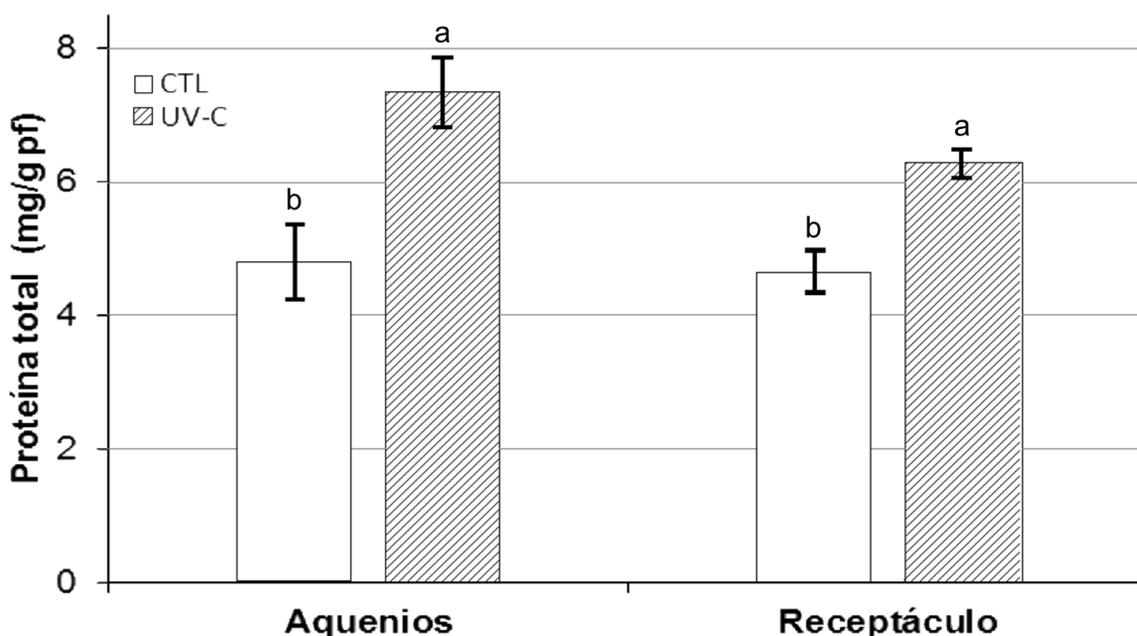
La Figura 7 representa el cambio del contenido de las proteínas totales en el fruto de fresa seguido del tratamiento con luz UV-C. El tratamiento con luz UV-C incrementó significativamente ( $p < 0.05$ ) el contenido de proteínas totales en frutos

maduros de *F. x ananassa* Duch. cv. Camino Real. El contenido aumentó de 1.829 a 3.511 mg/g pf. Además, se observó que durante el tiempo de incubación posterior al tratamiento con luz UV-C, el contenido total de proteínas disminuyó gradualmente de manera significativa.



**Figura 7.** Efecto del tratamiento con luz UV-C en el contenido total de proteínas en frutos maduros de *F. x ananassa* cv. Camino Real. Los valores representan el promedio de tres réplicas, las barras indican la desviación estándar y las letras diferentes denotan diferencias significativas entre tratamiento (ANOVA-Tukey)  $p \leq 0.05$ .

En los achenios y el receptáculo de los frutos evaluados se observó un incremento en el contenido de proteínas totales de 4.79 a 7.35 mg/g de pf en achenios y de 4.66 a 6.28 mg/g en el receptáculo.



**Figura 8.** Efecto del tratamiento con luz UV-C en el contenido total de proteínas en diferentes órganos (achenios y receptáculo) con y sin tratamiento de irradiación de luz UV-C: control (CTL) y UV-C en frutos maduros de *F. x ananassa* cv. Camino Real. Los valores representan el promedio de tres réplicas, las barras indican la desviación estándar y las letras diferentes denotan diferencias significativas entre tratamiento (ANOVA-Tukey)  $p \leq 0.05$ .

#### 7.4 Efecto de la radiación UV-C en la cantidad de antocianinas, compuestos fenólicos, flavonoides totales y la capacidad antioxidante en achenios y receptáculo del fruto de fresa

El efecto de la radiación UV-C en el fruto de *F. x ananassa* Duch. cv. Camino Real en la concentración de las antocianinas, los compuestos fenólicos totales, los flavonoides, y la capacidad antioxidante del fruto se estudiaron en los achenios, el receptáculo y el fruto entero con el fin de determinar si el tratamiento de irradiación tenía el mismo efecto en las diferentes partes del fruto (achenios y receptáculo). Los achenios y el receptáculo, mostraron un incremento significativo en las antocianinas y flavonoides totales después del tratamiento de irradiación con luz UV-C ( $p \leq 0.05$ ) como se muestra en la Tabla V.

El incremento en el contenido de compuestos fenólicos totales se observó tanto en los achenios como en el receptáculo. Sin embargo, el aumento fue mayor en los achenios comparados con el receptáculo y el fruto entero. La capacidad antioxidante en los achenios y el receptáculo, también mostró un aumento, pero en este último el cambio no fue estadísticamente significativo ( $p > 0.05$ ).

**Tabla V.** Contenido de antocianinas, compuestos fenólicos, flavonoides totales y capacidad antioxidante en achenios y receptáculo de *F. x ananassa* cv. Camino Real con y sin tratamiento de luz UV-C.

Compuesto	Control		UV-C	
	Achenios	Receptáculo	Achenios	Receptáculo
<b>Antocianinas Totales<sup>a</sup></b>	18.4±2.5 b	34.2±4.4 a	31.2±2.4 a	48.7±4.5 a
<b>Compuestos Fenólicos Totales<sup>b</sup></b>	721±138 b	146.6±22 a	1459±139 a	241.7±20 a
<b>Flavonoides Totales<sup>c</sup></b>	28.2±1.7 b	100.1±9.2 a	43.7±3.4 a	156.4±21 a
<b>Capacidad antioxidante<sup>d</sup></b>	135.6±4.4 b	119.2±11.3 a	149.3±5.1 a	135±3.6 a

<sup>a</sup>Antocianinas Totales (mg pelargonidina/100 g pf). <sup>b</sup>Compuestos Fenólicos Totales (mg ácido gálico/100g de pf). <sup>c</sup>Flavonoides Totales (mg quercetina/100 g pf). <sup>d</sup>Capacidad antioxidante (Mm ET/100g de pf). Los valores son el promedio de 5 réplicas ± DE. Letras diferentes en cada uno de los parámetros determinados, denotan diferencias significativas de las medias entre tratamiento de acuerdo a la prueba estadística de Tukey  $p \leq 0.05$ .

### 7.5 Análisis de expresión de genes por qPCR

Para el análisis de expresión génica se utilizaron secuencias provenientes de distintas bases de datos para *Fragaria x ananassa* D (Rosaceae Database <https://www.rosaceae.org>, NCBI) y fueron obtenidas mediante la búsqueda por nombre del genoma de referencia de *Fragaria x ananassa*. Además se analizaron manualmente para confirmar la presencia de los dominios utilizando los programas MOTIF Search e InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>).

Las secuencias utilizadas se muestran en la Tabla VI y otras características en el Anexo 2.

**Tabla VI.** Secuencias y características de los oligonucleótidos diseñados para la cuantificación de la expresión por qPCR en frutos maduros de *F. x ananassa* cv. Camino Real.

Gen	Secuencia	Tamaño	Tm °C
<b><i>FaPAL1</i></b>	5'- CTCTTTGGGGCTGATTTTCG-3'	20	57.3
	3'-CACAGAACCTCGAAGGGTGA-5'	20	56.3
<b><i>FaPAL2</i></b>	5'-CCTTGGGACTGATCTCCTC-3'	19	53
	3'-GTGAAGCTCACCGTTAGGG-5'	19	55
<b><i>FaPAL3</i></b>	5'- CTCTTTGGGGTTGATTTTCGTC-3'	20	57.3
	3'- CACAGAACCTCGAAGGGTGA-5'	20	56.3
<b><i>FaPAL4</i></b>	5'-CTGAGCAGCACAACCAGGAT-3'	20	57.3
	3'-GCAGAACCTCGAAGGGTGAA-5'	20	56.9
<b><i>FaPAL5</i></b>	5'- GGCCATTTTGCCTAAAGAGG-3'	20	57.3
	3'-GCAGAACCTCGAAGGGTGAA-5'	20	56.9
<b><i>FaPAL6</i></b>	5'-CCTTGGGACTGATCTCCTC-3'	19	57.1
	3'-AGAGTCCTCCTGGCCACTTT-5'	20	60.3
<b><i>FaC4H</i></b>	5'-ATGGAGAGAGGAGCCGAC-3'	18	54.1
	3'-TCTTCTCCTTCACCTCCTTACA-5'	22	55.3
<b><i>Fa4CL</i></b>	5'-TGGTTTCGGTGTTGGCTC-3'	18	54.3
	3'-GTTTGAGAATGGAAGCGATGTT-5'	22	55.1
<b><i>FaCHS</i></b>	5'-CTTTGTTTCGGTGATGGTGCT-3'	20	56.8
	3'-TGAGGAGGTGAAATGTGAGCC-5'	21	57.2
<b><i>FaFHT</i></b>	5'-GCAATGGGAGGTTCAAGAATG-3'	21	54.7
	3'-GACCTTCAGTGGGTACACTATC-5'	22	55.1
<b><i>FaFLS</i></b>	5'-TCACCATTCTCGTCCCAAAC-3'	20	54.8
	5'-CAATGTGGATGACTAGGGCATT-3'	23	55.9
<b><i>FaDFR</i></b>	5'-GACCCTGAGAACGAAGTGATAAA-3'	23	55.9
	3'-TCCGGCCGAAGATGTAAAC-5'	19	54.3
<b><i>FaANS</i></b>	5'-CTCTCACTTGGCTTGGGATTAG-3'	22	55.9
	3'-TGATCTTCATTTGCAGGAGGAG-5'	22	55.6
<b><i>FaFGT</i></b>	5'-GGAACTTGGAGTCGCTCTT-3'	19	54.3
	3'-GTGATCACTGGGTCTAGTTCTTC-5'	23	55.9

<b>FaANR</b>	5'-CAGGAGTCCAAGGAGTACTAAAC-3'	23	55.6
	3'-GATCAAGCCTGTTCCACTAAGA-5'	22	55.2
<b>FaLAR</b>	5'-CAAGCATCCTTCGGAGGTTAT-3'	21	55
	3'-CGTCCACCGTCTTCATTGT-5'	19	54.5
<b>FaActina</b>	5'-GGGCCAGAAAGATGCTTATGTCCGG-3'	25	59.9
	3'-CTTCTACAATGAGCTTCGTGTTGCC-5'	24	60.7
<b>FaGADPH</b>	5'-CAAGGACTGGAGAGGCGG-3'	18	55.8
	3'-ATTGAGAGCAGGCAGAACC-5'	19	54
<b>FaUDP</b>	5'-CCTTTCCCTTCTCCACTCAC-3'	20	54.5
	3'-CTGTTGGATTGCTTGGTGT-5'	20	53.8

Los oligonucleótidos diseñados cumplieron con las características necesarias para la utilización en la cuantificación de la expresión génica: longitud de 19 y 23 pb, temperatura de alineamiento de alrededor de 60°C, longitud de la región amplificada menor de 250 pb, y formación y estabilidad de las estructuras secundarias mínimas o inexistentes. Se comprobó la eficiencia de amplificación de todos los oligonucleótidos, siendo ésta de un 80-110% y mostrando solamente un producto de amplificación en RT-PCR.

Los genes de referencia elegidos,  *$\beta$ -actina* y *GADPH*, fueron sometidos a un análisis de varianza multifactorial, en donde la expresión no se vio afectada por el tratamiento con luz UV-C, así como tampoco por el tipo de órgano; por lo tanto, pudieron ser utilizados en el cálculo de la expresión relativa de las secuencias a evaluar (Anexo 3).

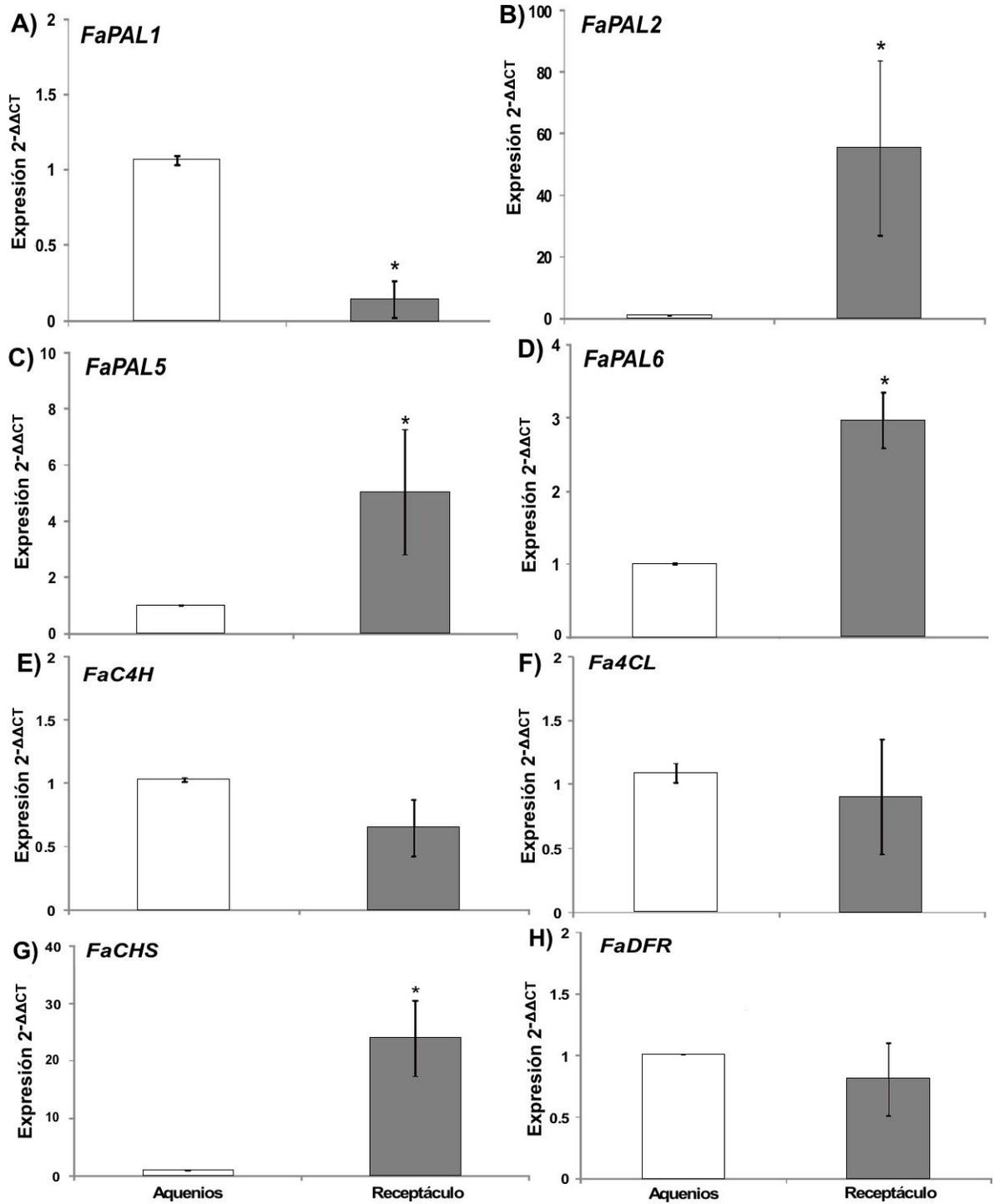
El efecto de la irradiación con luz UV-C sobre la expresión de los genes analizados fue determinado en aquenios, receptáculo y fruto entero de fresa cv. Camino Real. Dichos cambios en la expresión se estimaron utilizando el parámetro  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , indicando la abundancia relativa de los transcritos de plantas sometidas a irradiación con luz UV-C respecto a muestras control o no irradiadas. Los valores de expresión en condiciones de control fueron normalizados a 1.0, por lo que valores menores a 0.5 indican represión en la expresión génica y valores mayores a 2 indican que hubo una inducción en la expresión de los genes estudiados.

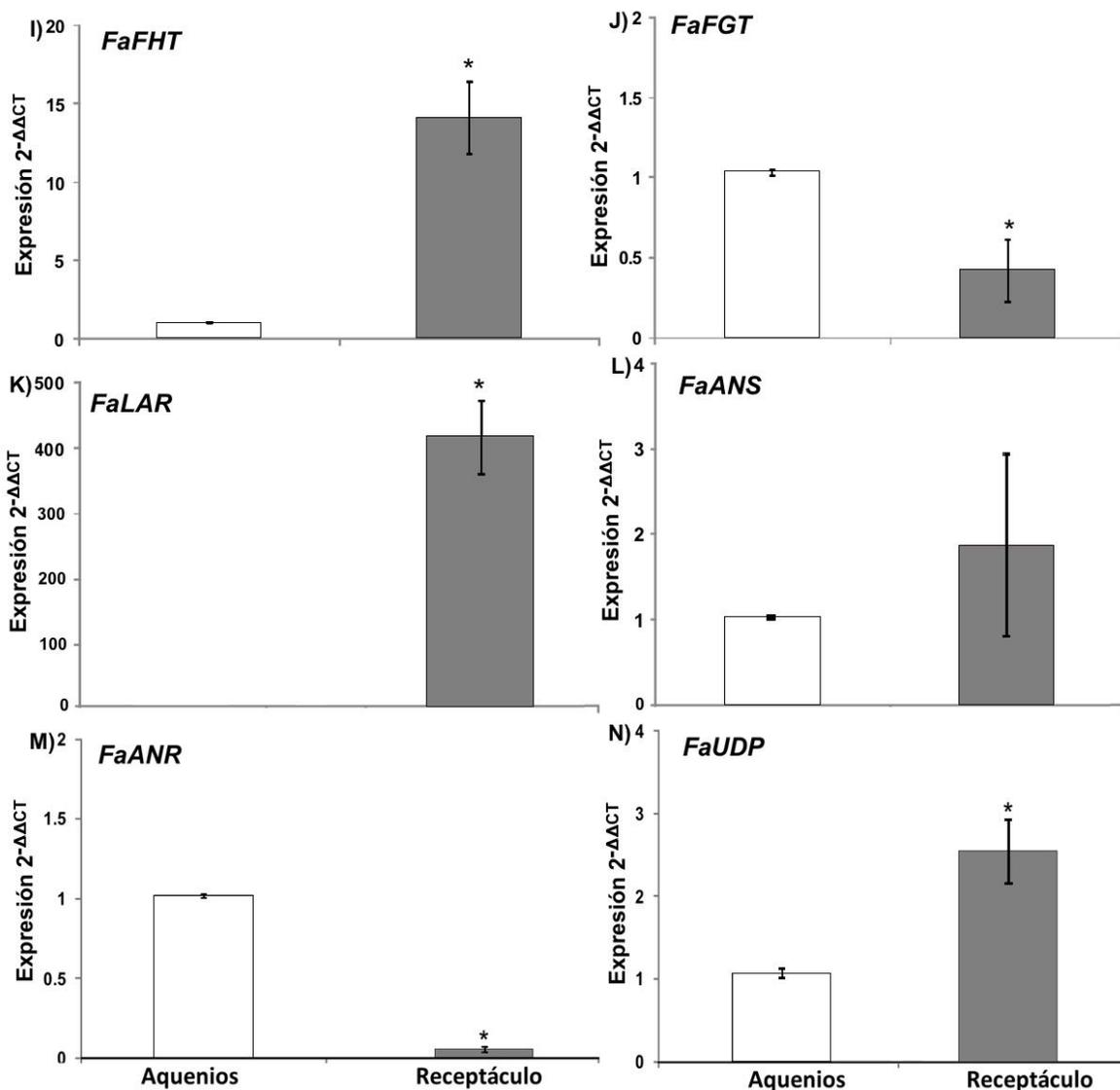
Mediante un análisis de varianza multifactorial de los valores de expresión relativa obtenidos, se pudo constatar que los tres factores del diseño experimental (tratamiento con luz UV-C, tiempo posttratamiento y órgano) provocaron variabilidad en la expresión de las secuencias de interés. Para determinar si los valores de expresión relativa eran significativamente diferentes, se realizó la comparación de medias de la expresión relativa de las secuencias de los frutos tratados con luz UV-C y no tratados, con la prueba t Student. De manera más detallada, los resultados se muestran en las secciones 7.8 y 7.9 mediante gráficos de barras, donde se representa el valor  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . En éstos se graficaron los valores obtenidos en el análisis de tres réplicas biológicas, con cuatro réplicas técnicas cada una.

### **7.6 Expresión de genes codificantes de enzimas clave en la ruta general de los fenilpropanoides en achenios, receptáculo y fruto entero de *F. x ananassa* cv. Camino Real**

El fruto de fresa en su estado basal, presenta cambios en la expresión relativa de transcritos en los genes pertenecientes a la ruta general de los fenilpropanoides. La expresión génica de los transcritos fue evaluada en achenios y receptáculo de fresa cv. Camino Real mediante el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  y en la Figura 9 se muestra la distribución en gráficos de barras.

Los resultados mostraron una mayor expresión significativamente diferente ( $p \leq 0.05$ ) en *FaPAL2*, *FaPAL6*, *FaCHS*, *FaFHT*, *FaLAR* y *FaUDP* en el receptáculo en comparación con los achenios; en contraste con *FaPAL1*, *FaPAL5*, *FaFGT* y *FaANR* donde se observó una mayor expresión en los achenios. En ambos órganos (achenios y receptáculo), los genes *FaC4H*, *Fa4CL* y *FaDFR* no presentaron un cambio estadísticamente significativo ( $p > 0.05$ ).



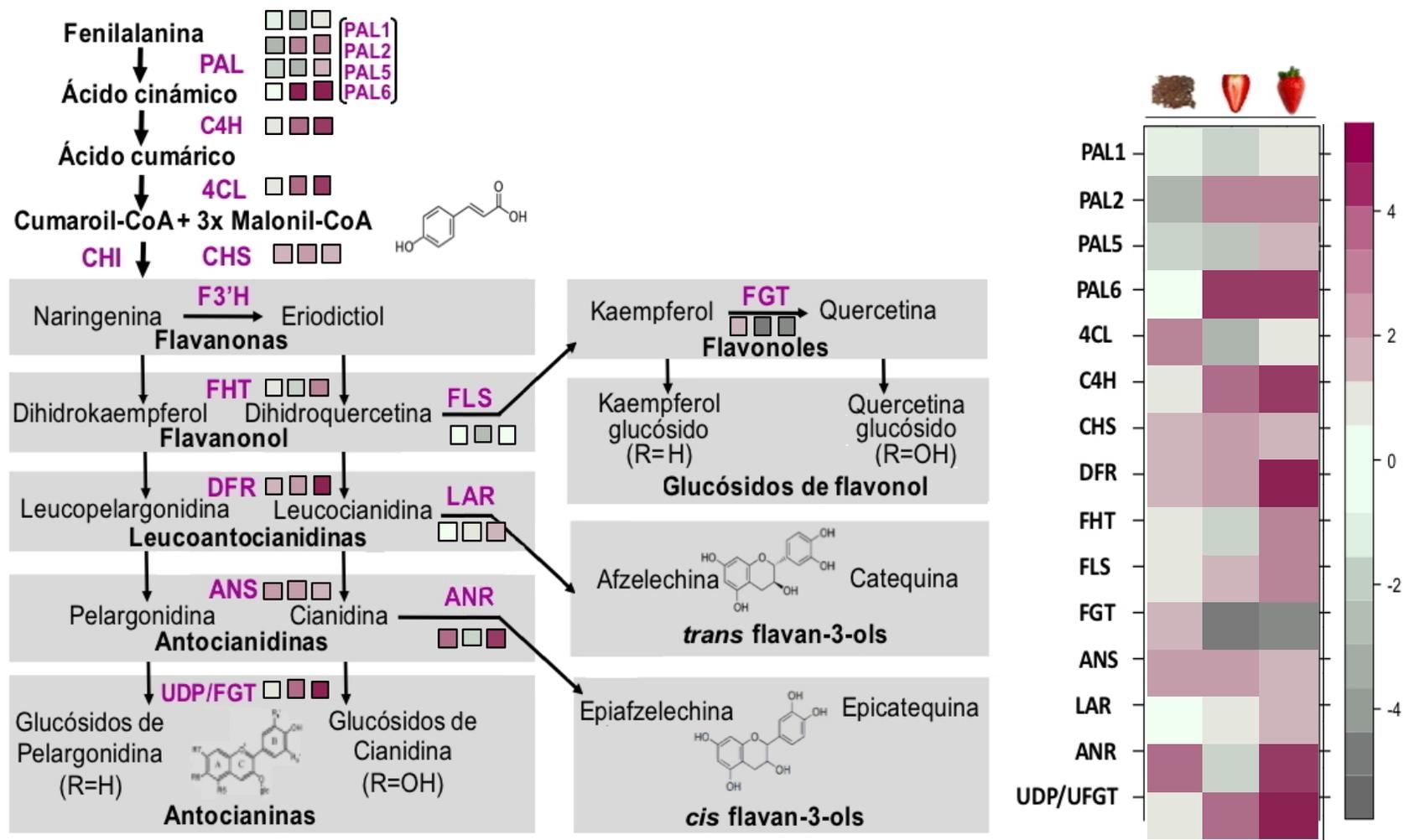


**Figura 9.** Niveles de expresión de los genes en diferentes órganos de frutos maduros de *F. x ananassa* cv. Camino Real sin tratamiento de luz UV-C. La cuantificación relativa por qRT-PCR se realizó empleando el método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  utilizando como referencia la media geométrica de *FaActina* y *FaGADPH* para propósitos de normalización. Los aquenios fueron utilizados como referencia con el valor de uno en cada gráfica. Los intervalos sobre las barras representan los valores de  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey y los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas por tratamiento ( $p<0.05$ ,  $n=3$ ).

### **7.7 Cambios en la expresión de genes codificantes para enzimas clave en la ruta general de los compuestos fenólicos a causa de la irradiación con luz UV-C en *F. x ananassa* cv. Camino Real**

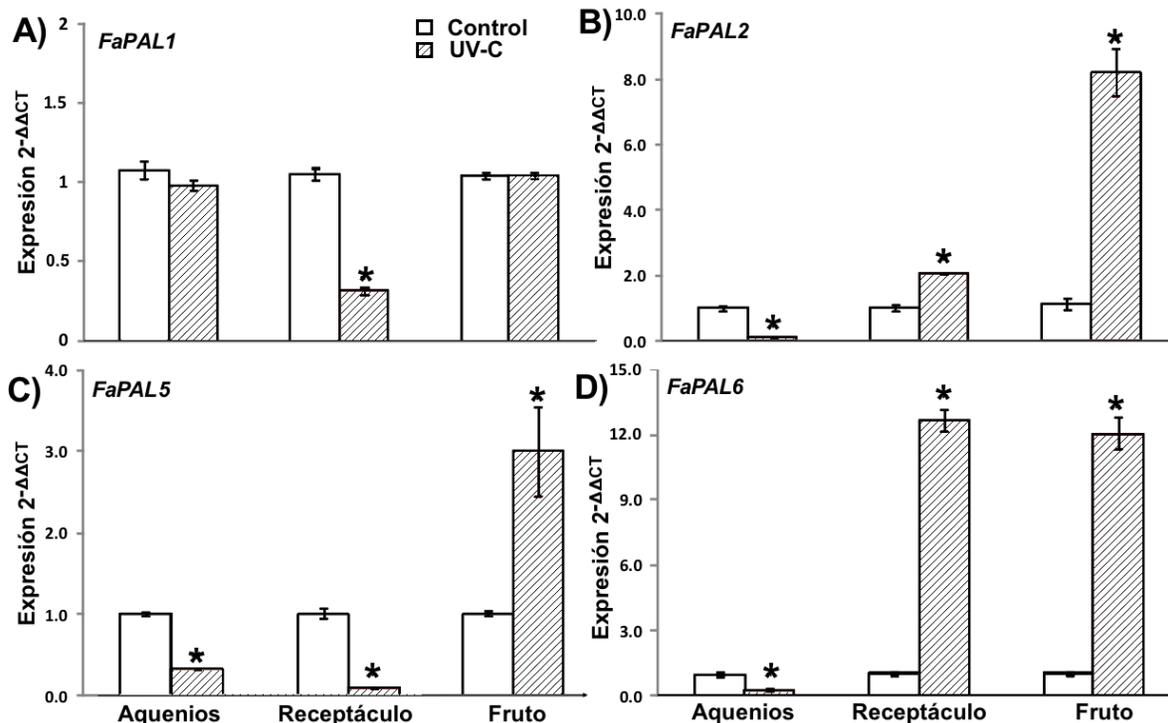
En *F. x ananassa* cv. Camino Real, el tratamiento con irradiación de luz UV-C modificó la expresión de genes codificantes para enzimas de la ruta general fenilpropanoide, y esta modificación fue dependiente del órgano. En la Figura 10, se muestra de manera general la respuesta del tratamiento en la expresión de genes en los diferentes órganos estudiados (aquenios, receptáculo y fruto entero).

Para el caso de la fenilalanina amonio liasa, la expresión de cuatro de sus isoformas (*FaPAL1*, *FaPAL2*, *FaPAL5* y *FaPAL6*) fue heterogéneo. En el receptáculo y fruto entero, la expresión de las isoformas *FaPAL2* y *FaPAL6* aumentó significativamente, mientras que este patrón no se observó en los aquenios del fruto, en donde el valor de la expresión de *FaPAL2* se encontró reprimido o muy cerca del umbral de represión (Figura 11). En los aquenios, no se observó un cambio en la expresión de la isoforma *FaPAL1* por la irradiación con luz UV-C, ya que el valor se mantuvo cercano a la unidad; en cambio, el valor de la expresión relativa de *FaPAL5* se encontró alrededor del umbral de represión. En el receptáculo, las isoformas de la fenilalanina amonio liasa *FaPAL1* y *FaPAL5* parecieron tener una tendencia a la represión, pues los valores de su expresión se colocaron por debajo de este umbral. En el fruto entero, la expresión de las isoformas *FaPAL2*, *FaPAL5* y *FaPAL6* se observó por encima del umbral de inducción de forma significativa, con valores de 8, 3 y 12 veces, respectivamente, mientras que en *FaPAL1* el valor se mantuvo cercano a la unidad.



**Figura 10.** Esquema general del cambio en la expresión de genes implicados en la biosíntesis de compuestos fenólicos en diversas condiciones a casusa de la irradiación con luz UV-C en *F. x ananassa* cv. Camino Real en achenes, receptáculo y fruto entero. Los resultados se muestran en escala de  $\text{Log}_2(2^{-\Delta\Delta Ct})$ , los valores menores amuestra los genes reprimidos y los mayores aquellos sobreexpresados (Modificada de Carbone *et al.*, 2009).

### Fenilalanina amonio liasa



**Figura 11.** Expresión relativa de genes codificantes para la fenilalanina amonio liasa en diferentes órganos de frutos maduros de *F. x ananassa* cv. Camino Real tratados con luz UV-C. Los resultados se muestran como  $2^{-\Delta\Delta CT}$  normalizados con las muestras sin tratamiento de luz UV-C (control) y la media geométrica de los genes de referencia *FaActina* y *FaGADPH*. Los intervalos sobre las barras representan los valores de  $\pm$  error estándar ( $n=3$ ). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas por tratamiento ( $p < 0.05$ ,  $n=3$ ).

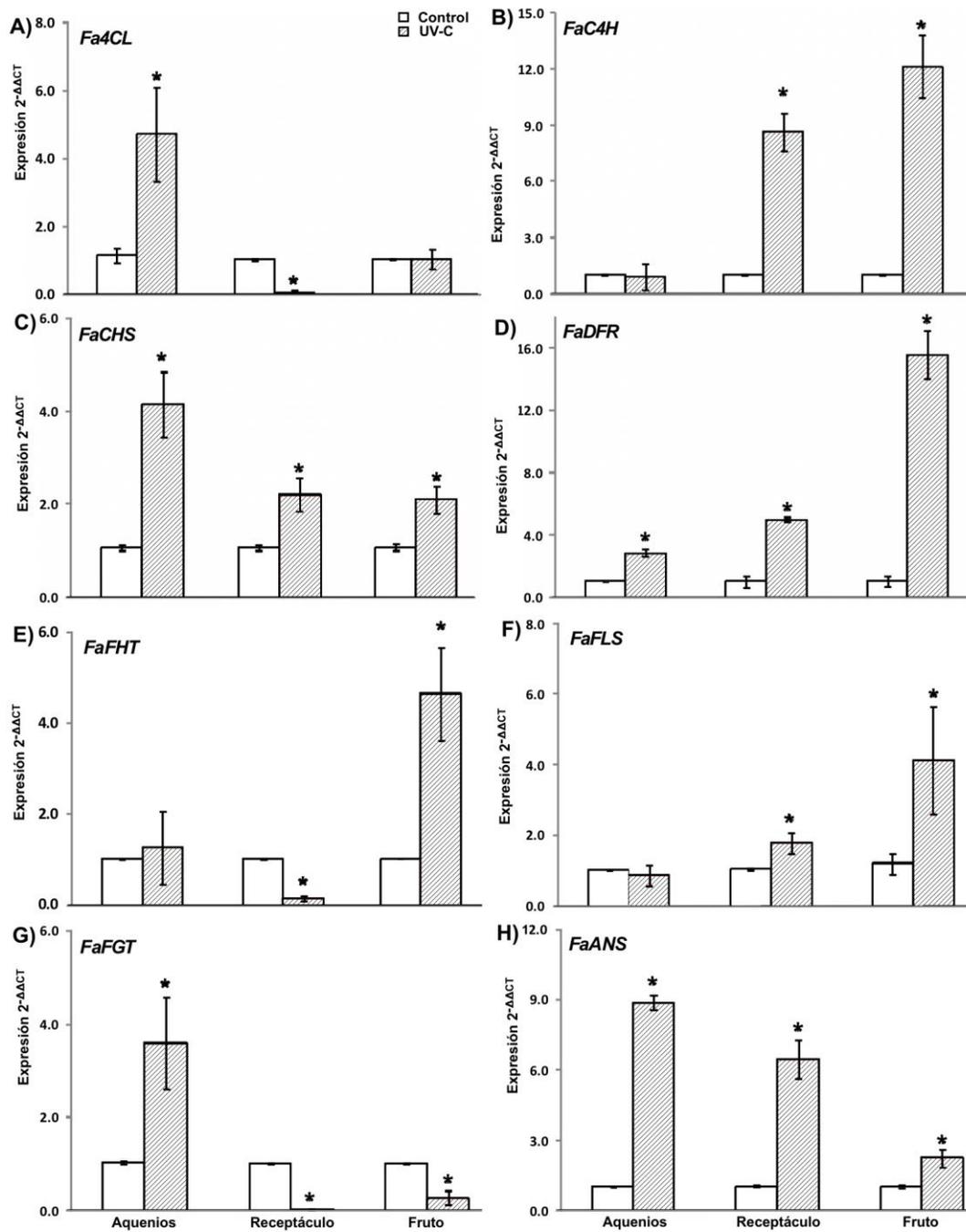
En el caso de los genes de la ruta general de fenilpropanoides (Figura 12A-C), los valores de la expresión de los genes codificantes estuvieron por encima del umbral de inducción, o cercanos a la unidad, por lo que la luz UV-C permitió el incremento de la expresión de los genes de esta ruta, o la mantuvo constante y solo provocó la represión de *Fa4CL* en el receptáculo (Figura 12A-C) y probablemente de *FaC4H* en los aguénios, ya que el valor de la expresión no mostró una diferencia significativa con respecto al control ( $p > 0.05$ ). Las expresiones de los genes que codifican para la 4-cinamato CoA ligasa (*Fa4CL*) y la chalcona sintasa (*FaCHS*) en los aguénios, fueron inducidas de manera significativa inmediatamente después del

tratamiento (14 minutos), con valores de 5 y 4 veces, respectivamente. En el receptáculo, la expresión de los genes que codifican a la cinamato 4-hidroxilasa (*FaC4H*) y a la chalcona sintasa (*FaCHS*) fue inducida de manera significativa; en contraste, el valor de la expresión de *Fa4CL* estuvo por debajo del umbral de represión. La expresión de los genes de la ruta general de fenilpropanoides en el fruto entero, mostró un comportamiento similar al receptáculo, con la inducción de *FaC4H* y *FaCHS*, y el valor de la expresión de *Fa4CL* no mostró cambio significativo ( $p>0.05$ ) con respecto a frutos no irradiados.

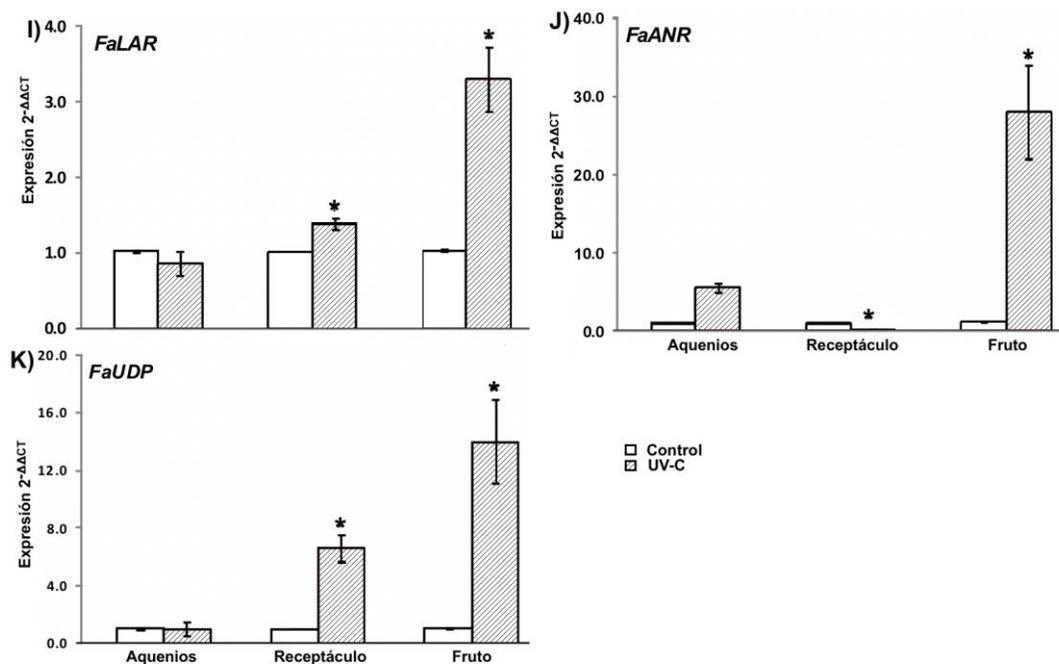
La irradiación con luz UV-C modificó la expresión de los genes de enzimas en la ruta de flavonoides, y esta modificación fue dependiente del órgano (Figura 12 D-K). En el caso de los transcritos de las enzimas que codifican para la síntesis de antocianinas, *FaANS*, y epicatequinas, *FaANR*, se observó que, tanto en el receptáculo como en los achenios y fruto entero, su expresión se indujo de forma significativa, como consecuencia de la irradiación con luz UV-C. De manera interesante, la expresión del gen que codifica a la enzima involucrada en la producción de flavonoles (*FaFGT*) se encontró reprimida de forma significativa, como consecuencia de la irradiación con luz UV-C en el receptáculo y fruto entero; no obstante, en los achenios, la expresión fue inducida hasta 3 veces.

En los achenios, se observó que la expresión de los genes involucrados en la síntesis de leucoantocianidinas (*FaDFR*), flavonoles glucósidos (*FaFGT*), antocianinas (*FaANS* y *FaUDP*) y epicatequinas (*FaANR*), se incrementó en un rango de 2 a 6 veces. Para el caso de los transcritos involucrados en la síntesis de flavanonas (*FaFHT*), flavonoles (*FaFLS*), y leucoantocianidinas (*FaLAR*), la irradiación con luz UV-C no pareció afectar su nivel, pues sus valores se mantuvieron cercanos a la unidad y no presentaron un cambio estadísticamente significativo ( $p>0.05$ ).

## Enzimas clave de la ruta de biosíntesis de flavonoides



## Enzimas clave de la ruta general de los fenilpropanoides (cont.)



**Figura 10.** Expresión relativa de genes codificantes para enzimas clave en la ruta general de los fenilpropanoides en diferentes órganos de frutos maduros de *F. x ananassa* cv. Camino Real tratados con luz UV-C. Los resultados se muestran como  $2^{-\Delta\Delta CT}$  normalizados con las muestras sin tratamiento de luz UV-C (control) y la media geométrica de los genes de referencia *FaActina* y *FaGADPH*. Los intervalos sobre las barras representan los valores de  $\pm$  error estándar (n=3). La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas por tratamiento (p<0.05, n=3).

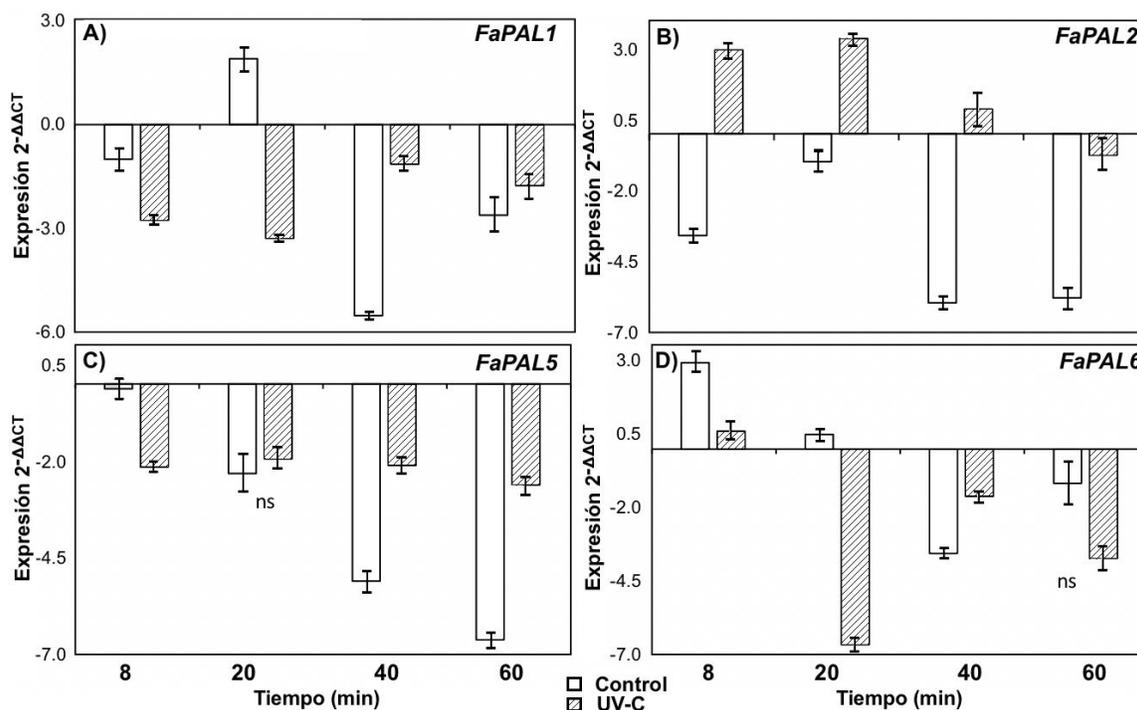
En el receptáculo, el tratamiento con luz UV-C indujo la expresión de *FaDFR*, *FaANS* y *FaUDP*, con valores de 6, 3 y 5, respectivamente, mientras que los demás aparecieron como reprimidos. En el fruto entero, los transcritos *FaDFR*, *FaFHT*, *FaFLS*, *FaANS*, *FaANR*, *FaLAR* y *FaUDP* mostraron un incremento inmediatamente después del tratamiento con luz UV-C. Para el caso del transcrito involucrado en la síntesis de epicatequinas (*FaANR*), se obtuvo un aumento de hasta 33 veces. De manera interesante, la expresión del gen involucrado en la síntesis de flavonoles glucosilados, *FaFGT*, estuvo por debajo del umbral de represión.

### 7.8 Cambios en la expresión de genes codificantes para enzimas clave en la biosíntesis de los flavonoides a diferentes tiempos post- irradiación en *F. x ananassa* D. cv. Camino Real

El tiempo de incubación, posterior al tratamiento con luz UV-C, tiene un impacto significativo ( $p < 0.05$ ) en el nivel de los transcritos relacionados a la biosíntesis de flavonoides en frutos maduros de *F. x ananassa* D. cv. Camino Real.

La abundancia relativa de los transcritos de la fenilalanina amonio liasa fue notablemente afectada por el tiempo tanto en frutos control como en frutos irradiados (Figura 13). Uno de los cuatro genes evaluados que codifican a la PAL, *FaPAL5*, se mantuvo reprimido en todas las muestras y todos los tiempos analizados (Figura 13 C); este patrón fue similar para *FaPAL1* y *FaPAL2* en los frutos no tratados. De manera interesante, la luz UV-C provocó un efecto positivo en la expresión de *FaPAL2* en casi todos los tiempos evaluados (Figura 13B), excepto a los 60 minutos, y de *FaPAL6* a los 8 minutos posteriores al tratamiento. En los frutos controles, se observó la sobreexpresión de *FaPAL1* a los 20 minutos y de *FaPAL6* hasta los 20 minutos con respecto al tiempo 0.

#### Fenilalanina amonio liasa



**Figura 11.** Expresión relativa de genes codificantes para la fenilalanina amonio liasa en el fruto entero de *F. x ananassa* cv. Camino Real a diferentes tiempos post-irradiación del tratamiento con luz UV-C: **CTL** (control), **UV-C** (tratamiento con luz UV-C), respectivamente. Los resultados se muestran como  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística t Student. La denotación ns no representa diferencias estadísticamente significativas por tratamiento ( $p > 0.05$ ,  $n=3$ ).

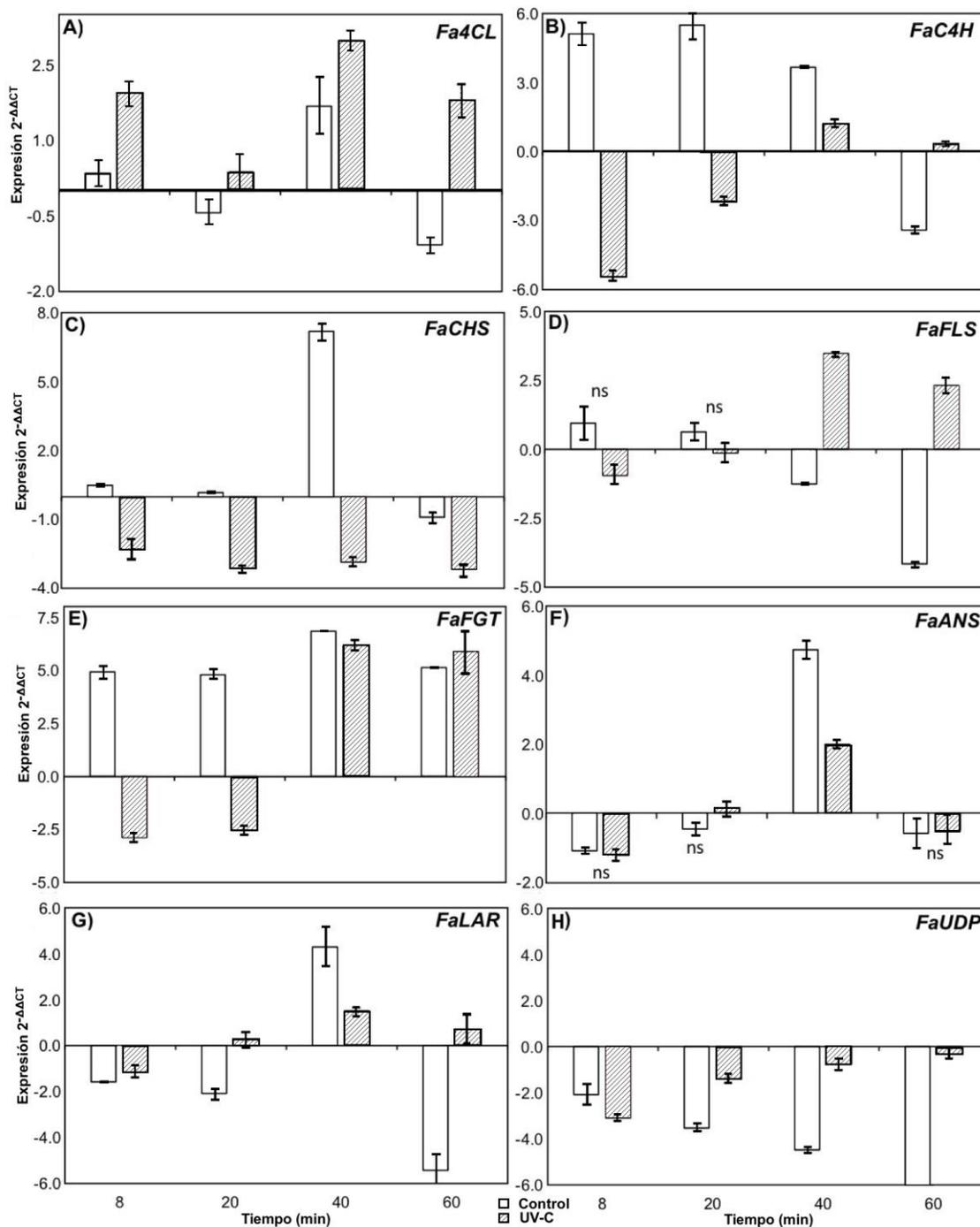
En los demás genes correspondientes a las enzimas de la ruta general de los fenilpropanoides, el cambio en la expresión fue fluctuante (Figura 14). De manera general, la inducción de *Fa4CL* fue mayor en los frutos tratados con luz UV-C y se mantuvo hasta los 60 minutos evaluados; sin embargo, en los frutos controles, se observó un incremento y finalmente una represión del mismo a los 60 minutos. Interesantemente, la expresión de *FaC4H* permaneció por debajo del umbral de represión hasta los 40 minutos, cuando posteriormente incrementó su expresión y permaneció constante hasta los 60 minutos evaluados; en los frutos no tratados, el comportamiento fue contrario, pues el tiempo de exposición en el aire permitió una sobreexpresión del gen hasta los 40 minutos para después reprimirse. El gen de la chalcona sintasa, mostró que el tratamiento con luz UV-C indujo la represión del mismo; no obstante, en los frutos control, se mostró una sobreexpresión en tiempos previos y la represión se produjo hasta el último tiempo evaluado.

En general, se observó una represión de la mayoría de los genes tiempo después del tratamiento con luz UV-C. No obstante, *FaFGT* y *FaFLS* mostraron la inducción en la expresión a los 40 minutos posteriores al tratamiento. En los frutos no tratados, la sobreexpresión de los genes se observó solamente en *FaFGT* para todos los tiempos (Figura 14E).

El patrón de expresión del gen de la enzima flavonol sintasa, *FaFLS*, fue opuesto en frutos tratados con luz UV-C y frutos control: cuando estuvo sobreexpresado en frutos irradiados, se encontró reprimido en frutos control. La sobreexpresión en los frutos controles se conservó hasta los 20 minutos, posteriormente se observó la represión del gen. La expresión del gen de la flavonoide 3-O-glucosiltransferasa (*FaFGT*) mostró una represión hasta 20 minutos posteriores al tratamiento; sin embargo, en frutos no irradiados, el gen se sobreexpresó en todos los tiempos

evaluados con respecto al tiempo cero. El de la antocianina sintasa, (*FaANS*), presentó una sobreexpresión solamente en el minuto 40 tanto en frutos tratados como en los no tratados; de igual manera se comportó el de la leucoantocianina reductasa (*FaLAR*).

### Enzimas clave de la ruta de flavonoides



**Figura 12.** Expresión relativa de genes codificantes para enzimas relacionadas a la biosíntesis de flavonoides en el fruto entero de *F. x ananassa* cv. Camino Real, a diferentes tiempos post-irradiación de luz UV-C: **CTL** (control), **UV-C** (tratamiento con luz UV-C), respectivamente. Las letras de A-H en la parte superior izquierda de cada panel se asignó de manera aleatorio a cada gen analizado (superior derecha). Los resultados se muestran como  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística t Student. La denotación ns no representa diferencias estadísticamente significativas por tratamiento ( $p > 0.05$ ,  $n=3$ ).

## 7.9 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

### 7.11.1 Actividad enzimática de la fenilalanina amonio liasa (PAL)

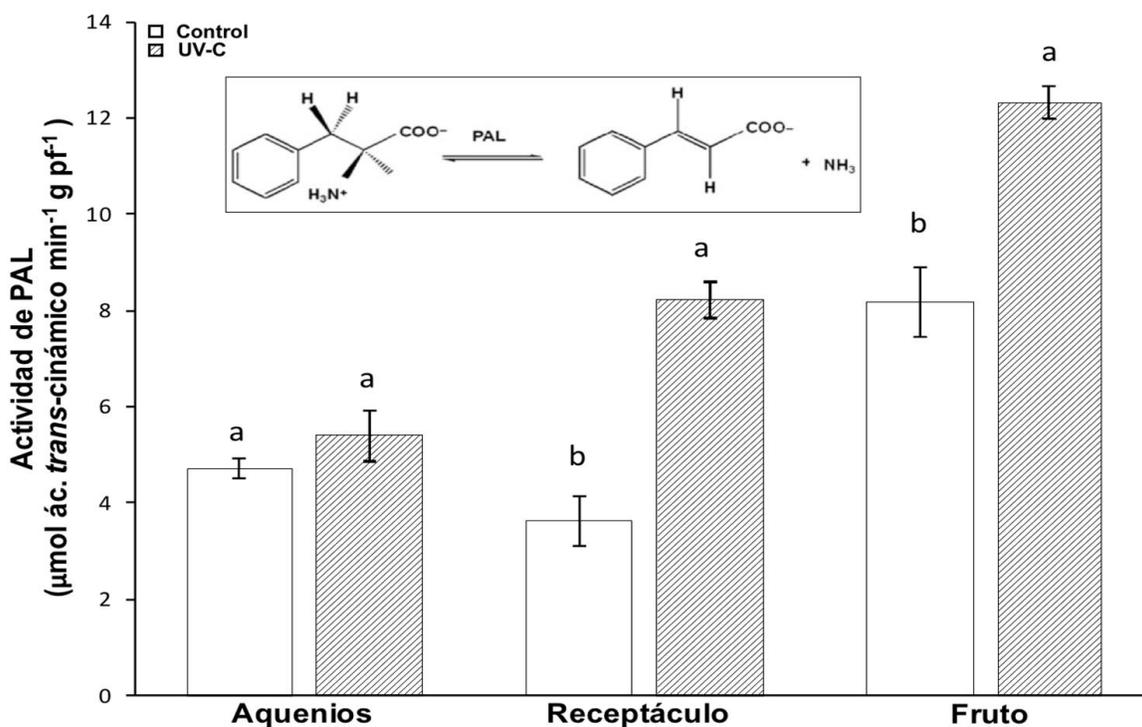
Con el fin de obtener alguna correlación de los cambios en los transcritos con la actividad enzimática de los mismos, se evaluó la actividad de la enzima principal de la ruta fenilpropanoides PAL en los achenios, el receptáculo y el fruto entero de fresa, tratada y no tratada. La actividad se determinó de manera relativa al fruto entero, y se observó una mayor actividad de la enzima en los achenios de *F. x ananassa* D. cv. Camino Real (Tabla VII).

**Tabla VII.** Actividad enzimática de la fenilalanina amonio liasa (PAL) en diferentes partes del fruto maduro de fresa.

	Actividad enzimática
<b>Achenios</b>	$4.715 \pm 0.218$
<b>Receptáculo</b>	$3.615 \pm 0.514$
<b>Fruto entero</b>	$8.161 \pm 0.7210$

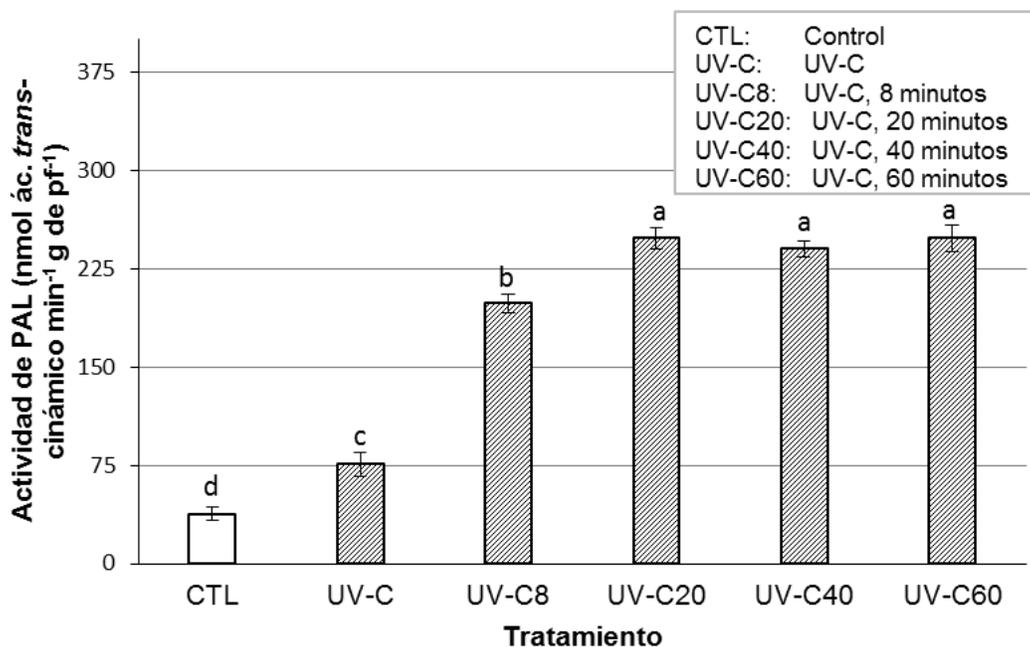
$\pm$  Desviación estándar de tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas cada una.  
La actividad se determinó como nmol de ácido *trans*-cinámico  $S^{-1} g^{-1}$  fruto fresco.

Además, se evaluó la actividad de manera comparativa (antes y después del tratamiento con luz UV-C) en los achenios, el receptáculo y fruto entero (Figura 15). Se observó un cambio estadísticamente significativo en el receptáculo y fruto entero después del tratamiento con luz UV-C.



**Figura 13.** Actividad enzimática de la fenilalanina amonio liasa (PAL) después del tratamiento con luz UV-C en diferentes partes del fruto maduro de fresa. La actividad se determinó como  $\mu\text{mol}$  de ácido *trans*-cinámico  $\text{s}^{-1} \text{g}^{-1}$  fruto fresco. La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey. Las distintas letras representan diferencias estadísticamente significativas por tratamiento ( $p \leq 0.05$ ,  $n=3$ ).

El tratamiento con luz UV-C provocó cambios significativos ( $p \leq 0.05$ ) en la actividad de PAL durante los tiempos de incubación evaluados después del tratamiento con luz UV-C, a excepción del minuto 20 (Figura 16). La actividad enzimática de frutos tratados mostró un incremento en los tres primeros tiempos evaluados (0, 8 y 20 minutos), y posteriormente permaneció constante hasta los 60 minutos de incubación.



**Figura 14.** Actividad enzimática de la fenilalanina amonio liasa (PAL) a diferentes tiempos de incubación después del tratamiento con luz UV-C en frutos maduros de *F. x ananassa* cv. Camino Real. La actividad se determinó como nmol de ácido *trans*-cinámico s<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> fruto fresco. La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey. Las distintas letras representan diferencias estadísticamente significativas por en cada tratamiento ( $p \leq 0.05$ ,  $n=3$ ).

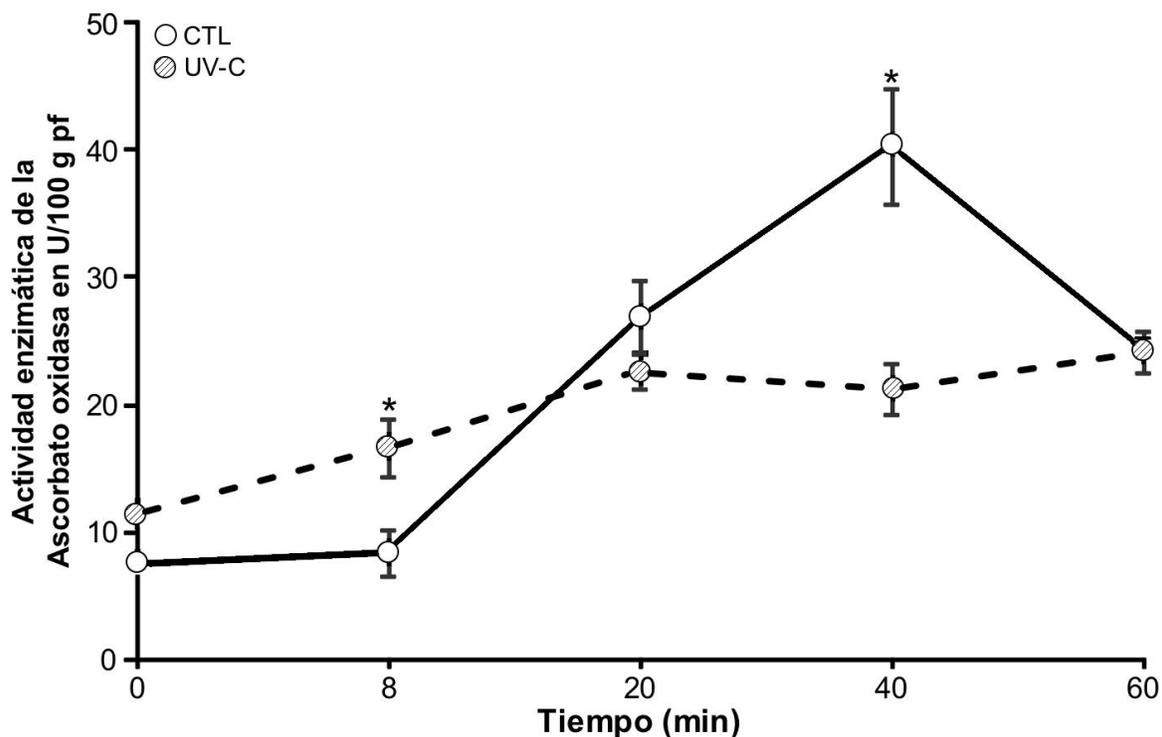
### 7.11.2 Actividad de ascorbato oxidasa (AAO)

Se ha reportado que la luz UV-C provoca una disminución en la acumulación del ácido ascórbico (Allende *et al.*, 2007); esto se podría correlacionar con un aumento en la actividad de ascorbato oxidasa. Por lo que, con el fin de comprobar esta hipótesis, se midió la actividad de esta enzima a diferentes tiempos después de irradiar los frutos (Figura 17).

En los frutos tratados con luz UV-C, se observó un incremento significativo ( $p \leq 0.05$ ) en la actividad de AAO inmediatamente y a los 8 minutos posteriores al tratamiento. No obstante, el mayor valor (38.45 u/100g pf) se obtuvo en los frutos controles incubados 40 minutos a temperatura ambiente.

El tiempo de incubación posterior al tratamiento, en los frutos tratados y no tratados provocó un aumento significativo ( $p \leq 0.05$ ) en la actividad de AAO; aunque

permaneció constante después de los 20 minutos en frutos irradiados y disminuyó a los 40 minutos en los frutos no tratados.



**Figura 15.** Actividad de ascorbato oxidasa (AAO) en diferentes tiempos de incubación después del tratamiento con luz UV-C en frutos maduros de *F. x ananassa* cv. Camino Real. La actividad se determinó como unidades/100 g fruto fresco. La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba estadística Tukey. Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas entre cada tratamiento ( $p \leq 0.05$ ,  $n=3$ ).

### 7.12 Identificación de familia de genes

Mediante análisis bioinformáticos, descritos en Materiales y Métodos, se identificaron secuencias de los posibles miembros de la familia de genes codificantes para enzimas relacionadas con la biosíntesis de flavonoides, utilizando el genoma de referencia FAN\_r1.1 (Hirakawa *et al.*, 2013) como se muestra en la Tabla VIII. Las secuencias y características de cada una de las secuencias se muestran en el Anexo 6.

**Tabla VIII.** Posibles integrantes de la familia de genes relacionados con la biosíntesis de flavonoides en *F. x ananassa*.

Familia	Gen	No.
Fenilalanina amonio liasa	<i>FaPAL</i>	6
4-cumaroil CoA	<i>Fa4CL</i>	2
Cinamato 4-hidroxilasa	<i>FaC4H</i>	3
Chalcona sintasa	<i>FaCHS</i>	3
Dihidroflavonol 4-reductasa	<i>FaDFR</i>	3
Flavanona 3-hidroxilasa	<i>FaFHT</i>	2
Chalcona isomerasa	<i>FaCHI</i>	2
Flavonol sintasa	<i>FaFLS</i>	2
Leucoantocianidina reductasa	<i>FaLAR</i>	2*
Antocianidina sintasa	<i>FaANS</i>	1
Antocianidina reductasa	<i>FaANR</i>	2

\*Secuencias parciales. No. Número de genes identificados.

En un intento por dilucidar los posibles miembros de las familias, se realizaron ensayos 3' RACE para algunos de estos genes. El objetivo es observar si existen diferencias en la parte 3' de cada gen para identificarlos posteriormente. Para ello, se utilizó la metodología descrita en la sección 6.13. Para la fenilalanina amonio liasa, se obtuvieron cuatro secuencias, para la leucoantocianidina reductasa dos secuencias y para las demás solo una secuencia. No se lograron obtener secuencias completas en todos los casos, pero estas secuencias podrán ser utilizadas posteriormente para su caracterización.

**>FaPALR.1**

CCTTAGTGCTGAGCAACACAACCCATTTTCCTCACCCTCCCCAACTCAAATGCCTC  
CCATAAAATAGACCGAACAAAGACACCAACTTGTTCTTGATTCTCTCAACAACAAAAAAG  
ACTCAAGAACCAAAGGACCAAGCTTTGGTGTCTCTGATTCTTAAAAGTCCTCATCTTTT  
CACCCAA

**>FaPALR.2**

AGTGCTGAGCAACACAACCCATTTTCCTCACCCTCCCCAACTCAAATGCCTCCCAT  
AAAATAGACCGAACAAAGACACCAACTTGTTCTTGATTCTCTCAACAACAAAAAAGACTC

AAGAACCAAAGGACCAAGCTTTGGTGTCTCTGATTCTTAAAAGTCCTCATCTTTTCACC  
CAAA

**>FaPALR.3**

AGTGCTGAGCTACACAACCTATTGATAAGTCCCTAACTTTAGGTCTTTTTTAAATTGAT  
TTGATTGTCAAAA

**>FaPALR.4**

AGTGCTGAGCAACACAACCTATTGATAAGTCCCTAACTTTAGGTCTTTTTTAAATTGAT  
TTGATTGTTAAAA

**>Fa4CL**

ATGAAAGATGAGGCTGCAGGAGAGGATCAAGGAGAAGATCTCCGGCGACAAAGAAG  
AAGAAGAGAAGAAGAAACACGGCTACGAGCAGGACACTGAGGTCCCGGTGGAGAAG  
TTCCACGAGGAACACGAACGTCCCTATGATCACGGCCCAGTCGTGCACCACCATGAG  
GAGCCAAAAGTTGAGCCAACAGTAGCCTACACAA

**>FaDFR**

GAGGGCCGCTACATCTGTTTCATCACTATAACTAGGCCGGTTTATACTA

**>FaC4H**

TGTCACAGAACCCGAACCTTCACAAGCACTACACCGAAGATCCGTAACCCGGTTCTTTT  
AATGAGAAACAGACGACAATTACGAA

**>FaCHS1**

GGGCTCACATTTACCTCCTCAAGTCTGAGCCTTAGCAAATTGTGGTGTAGTCTTGTT  
GCAGTTTGAGCTATGCACAACCTGAAATTCTGAAGGCAAGCTGGAAAAGTTCTGTTGTA  
CAAGTACTACTTAATTTCCGGCAGATAAGATTTCTCAAGTTATGGTTATATAGCGGTACT  
GATTGATTCTGTACCCAAGTACTACTTAATTGTGGCACATAAGCTTTGTCACCTTATGG  
TTGTACAGCGGTACTGATTCATTCTGCATCAGCTGGTTTTAGCTAAGAAATAGTTGCA  
ATTTCTCTGCTCCTTTTATCTTTTGAACAAATAAATGGAATTTGATGGGTTCTCAACA  
CTATGTATAAT

**>FaLAR.1**

CAAGAGGTTTCTGCCGTCGGAGTTCAGATATTAGGCTAGTCTCTTATCACTCCGTCC  
TTAGAATACCAAGCAATGAAATCGTCTAAAAAATAGTGTTAAA

**>FaLAR.2**

CAAGAGGTTTCTGCCGTCGGAGTTCATGTCAGTGTGTTGTGGAAAATTTCTCTT  
TTGATGTTTGATTACATTTATGTTCTCAACTTCTCATACTATCTAGCTCTTTGATTTTAG  
TTTTTGCTTATACAGACAATACAAAATAAAGGCTTCATGTTGACAAA

**>FaFLS**

CCTGATCTTGCTCTTGGTGTGGTTGGTGAATAAGTTTCACTCAGTATTGTTATTTACTA  
TACTATGTAATCATATCTGGGATGAAATGTA AAA

## VIII. DISCUSIÓN

### 8.1 Relación del contenido de flavonoides en diferentes órganos

El incremento en la popularidad del consumo de frutos rojos se debe a que son una fuente rica de compuestos bioactivos, dentro de los que destacan los antioxidantes. Dichos compuestos se encuentran en mayor cantidad como compuestos fenólicos y colorantes de frutos (antocianinas y carotenoides) en la familia Rosaceae, que incluye a la fresa, la mora y la frambuesa. En la fresa, los compuestos fenólicos representan un grupo diverso de sustancias que incluyen ácidos fenólicos, como el ácido hidroxibenzóico y conjugados del ácido hidroxicinámico; flavonoides, como flavonoles y flavanoles, y antocianinas (Skrovankova *et al.*, 2015). Ellos pueden estar presentes de manera libre o en forma conjugada con azúcares, ácidos, y otras biomoléculas solubles en agua (ácidos fenólicos, flavonoides y quinonas) o compuestos insolubles en agua (taninos condensados). Los compuestos fenólicos se acumulan en casi todas las partes de la planta; sin embargo, su síntesis está regulada por factores ambientales como la luz, temperatura y condiciones de estrés, así como por las etapas de desarrollo.

En *F. x ananassa*, se sabe que las propiedades antioxidantes del fruto están ligadas al receptáculo y los achenios, y dependen del tipo de cultivar (Allende *et al.*, 2007; Ariza *et al.*, 2016). Para la variedad Camino Real, en este trabajo se encontró que los compuestos fenólicos totales y las antocianinas totales están presentes principalmente en el receptáculo; sin embargo, la acumulación de flavonoides fue muy similar en ambos órganos. Conforme a este patrón, pareciera que la mayoría de los compuestos fenólicos en los achenios, se deben principalmente a los flavonoides más que a las antocianinas. Ariza *et al.*, (2016) reportan valores en el porcentaje de contribución relativa similares a los obtenidos en este trabajo; sin embargo, el valor de los flavonoides en los achenios fue menor.

En *F. x ananassa*, la coloración roja se debe principalmente a antocianinas glicosiladas, como glucósidos de pelargonidina y cianidina, por lo que una mayor

acumulación de estos compuestos en el receptáculo es evidente, aunque también estos dos glucósidos conforman cerca del 80% de las antocianinas totales en los aquenios de otros cultivares (Aaby *et al.*, 2005). Aunque los resultados muestran concentraciones altas de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales en los aquenios y receptáculo, se sabe que existen diferencias en la composición de los compuestos individuales entre ellos. La mayor acumulación de compuestos fenólicos totales fue en el receptáculo, en donde anteriormente se han identificado altas concentraciones de derivados del ácido cinámico, como el ácido caféico, clorogénico y eláxico. En los aquenios, la mayoría de los compuestos fenólicos pertenecen al ácido eláxico y varía notablemente dependiendo de la variedad y la pigmentación de los aquenios. En este trabajo se observó una mayor acumulación de flavonoides totales en los aquenios, lo cual concuerda con lo reportado por Cheel *et al.*, (2007) en donde aquenios de *F. x ananassa* cv. Chandler mostraron una mayor concentración en comparación con el fruto entero y el receptáculo.

La contribución porcentual de la capacidad antioxidante obtenida en los aquenios fue de casi el 13%, y puede estar correlacionada con la cantidad de flavonoides y compuestos fenólicos totales, pero no de las antocianinas totales como lo reportan Cheel *et al.*, (2007). La contribución porcentual del receptáculo (87.56%) coincide con lo reportado por Aaby *et al.*, (2005) y Ariza *et al.*, (2016), los cuales también han señalado que, en los aquenios y el receptáculo, la cantidad de antioxidantes estuvo relacionada con la capacidad antioxidante.

Estos resultados sustentan que los aquenios pueden convertirse en un producto valorable que represente un nuevo concepto en el cultivo de fresas y manejo de desecho agroindustrial de algunas industrias alimenticias, debido a su composición y capacidad antioxidante.

## 8.2 Tratamiento de irradiación con luz UV-C

En su entorno natural, las plantas son expuestas a la radiación ultravioleta que está presente en la luz solar. Dentro del espectro UV, la luz ultravioleta-C incluye longitudes de ondas de alta energía (debajo de 280 nm), las cuales son absorbidas por el ozono y no están presentes en la luz solar que llega a la superficie de la tierra; por lo que en condiciones de crecimiento normales los efectos de la luz UV-C no son observados. El efecto de la aplicación de irradiación UV-C en plantas y frutos depende de la dosis y el cultivo al que se aplica el tratamiento. A dosis muy altas, las plantas se queman y a dosis bajas no se observa un efecto. En este trabajo, se describe el efecto postcosecha de la luz UV-C, a una dosis de irradiación de 2 kJ/m<sup>2</sup> en frutos maduro de *F. x ananassa* cv. Camino Real.

El pH y los solutos solubles totales es un parámetro importante en la evaluación sensorial de la calidad del fruto. En este trabajo, estos valores en los frutos maduros tratados y no tratados, no mostraron cambios significativos ( $p > 0.05$ ), por lo que el pH y los solutos solubles totales no se alteraron significativamente. El valor del pH mostró un comportamiento similar a lo reportado en mangos (Santhirasegaram *et al.*, 2013), naranja (Tran y Farid, 2004; Pala y Toklucu, 2013), manzana (Caminiti *et al.*, 2012) y fresa (Ayala-Gil, 2011). El principal componente de los solutos solubles son los azúcares, enseguida los ácidos orgánicos, aminoácidos, pectinas solubles y vitaminas. Algunos de ellos contienen puentes estructurales que son susceptibles al ataque de la luz UV, permitiendo la degradación o alteración de los componentes de los solutos solubles totales, por lo que se esperaría una disminución en el valor de °Brix. No obstante, esta conducta solo se ha observado de manera notable en la aplicación de altas dosis de luz UV (Mohd-Hanif *et al.*, 2016). El cambio no significativo en el contenido de sólidos solubles concuerda con lo reportado por Dong *et al.*, (1995) y Pan *et al.*, (2004).

La turbidez se ha correlacionado con el color de jugos de frutos, en donde un valor mayor corresponde a aquellos con coloración más oscura (Donahue *et al.*, 2004). Un indicador del nivel de la turbidez en jugos es la claridad. Los valores obtenidos

de ambos parámetros en los jugos de frutos de fresa tratados con luz UV-C, revelaron cambios significativos ( $p < 0.05$ ). El valor de la turbidez aumentó de 51.101 a 58.447, y la claridad disminuyó de 6.336 a 2.986. Esto se puede relacionar con que una disminución en la claridad, puede ser producto de la presencia de materia suspendida dispersa en el jugo favoreciendo a un aumento en la turbidez. En tratamientos térmicos de frutos como naranja, zanahoria y melón, este último valor incrementa después de la exposición debido a la precipitación de pectinas degradadas (Rivas-González, 2006). También se observó que los valores de la turbidez en los jugos de fresa irradiadas disminuyeron significativamente ( $p < 0.05$ ) tiempo después de la irradiación con luz UV-C, al igual que aquellos frutos que no fueron sometidos al tratamiento (Anexo 5); sin embargo, la disminución fue mayor una hora después de la exposición en los frutos tratados. Esta disminución, podría deberse a la despolimerización fotoquímica de polisacáridos, como efecto de fotorreacciones provocadas por la acumulación de oxígenos singlete y radicales hidroxilo. En frutos como la piña, limón y tamarindo, la luz UV-C permite una disminución del valor de la turbidez incluso inmediatamente después de la irradiación; aunque, las dosis de irradiación fueron más elevadas comparadas con las de este estudio. En la mayoría de los casos, esta disminución está acompañada de una pérdida en la coloración de los jugos, la cual se debe principalmente a la inactivación de levaduras y moho en el jugo, y la disminución en el contenido de partículas suspendidas (Canitez, 2002; Kirubakaran *et al.*, 2008).

El efecto de la radiación con luz UV en los compuestos nutraceuticos (antocianinas y compuestos fenolicos) de frutos maduros de *F. x ananassa* dependen, entre otras, del estadio de desarrollo del fruto, el cultivar y la dosis de irradiación. En variedades como Seascape (Pombo *et al.*, 2009), Camarosa (Pombo *et al.*, 2004; Allende *et al.*, 2007) y Allstar (Erkan *et al.*, 2008) la concentración de los compuestos fue similar a los frutos controles; sin embargo, para la variedad que se utilizó en el presente trabajo, Camino Real, el incremento en frutos maduros se ha reportado previamente en diversas dosis (Ayala-Gil, 2011; Pombo *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos muestran que hubo un aumento significativo en el contenido de antocianinas,

compuestos fenólicos y flavonoides totales, al igual que la capacidad antioxidante inmediatamente después del tratamiento con luz UV-C, a una dosis de 2 kJ/m<sup>2</sup>. La acumulación de estos compuestos podría localizarse en la piel del fruto, ya que se ha reportado que la inducción en la acumulación de flavonoides y otros fenólicos, se localiza principalmente en tejidos epidérmicos de la planta, en donde generalmente están confinados. A nivel fisiológico estos compuestos actúan como filtros de luz. Por otra parte, el aumento en la capacidad antioxidante se puede correlacionar con el incremento en el contenido de compuestos fenólicos después de la exposición con luz UV-C, pues se ha demostrado en fresa que son los principales contribuyentes a la actividad antioxidante.

### **8.3 Efecto de la luz UV-C en el contenido de proteínas totales**

Un fenómeno común provocado por la inducción de estrés con luz UV, es la disminución del contenido total de proteínas como consecuencia de la degradación de proteínas. La razón de ello es la absorción de la radiación UV en los aminoácidos aromáticos y los grupos disulfuro (Hollósy, 2002). Pero en este trabajo se observó un incremento en el contenido de proteínas totales en frutos maduros de *F. x ananassa* cv. Camino Real inmediatamente después del tratamiento con luz UV-C. Probablemente, el incremento es producto de la síntesis de enzimas y proteínas de defensa durante la irradiación, ya que el contenido en los frutos control no mostró un incremento significativo en los diferentes tiempos de incubación (Anexo 5). El aumento en el contenido de proteínas totales también se ha observado en plantas de *Brassica napus* irradiadas con luz UV-B y luz UV-C, en comparación con plantas no tratadas (Nasibi y M-Kalantari, 2005). De manera general, la luz UV provoca estrés oxidativo que permite la inducción de enzimas antioxidantes como glutatión reductasa, superóxido dismutasa, dehidroascorbato reductasa, entre otras (Mackerness, 2000).

#### **8.4 Efecto de la radiación UV-C en la cantidad de antocianinas totales, compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y la capacidad antioxidante.**

La radiación UV-C tiene efectos en el metabolismo de los fenilpropanoides, el cual está distribuido en todas las partes de la planta. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento produjo un incremento significativamente diferente ( $p < 0.05$ ) en los compuestos fenólicos y flavonoides de los dos órganos evaluados (aquenios y receptáculo), que puede ser atribuido principalmente al aumento en la actividad de PAL.

En los aquenios, se observó una mayor acumulación de compuestos fenólicos, sin embargo, para las antocianinas y flavonoides se observó un efecto mayor en el receptáculo. Este patrón se relaciona con la acumulación de antocianinas en el receptáculo, como se describió anteriormente, pero no de flavonoides donde resultó similar en ambos órganos. Esto podría evidenciar la existencia de rutas de señalamiento diferentes para UV, como lo señala Iwashina (2003), en los dos órganos evaluados.

El aumento en la capacidad antioxidante como respuesta al tratamiento, se observó en los aquenios, receptáculo y fruto entero. Esto sugiere que, en los aquenios el efecto positivo fue producto de los compuestos fenólicos, y en el receptáculo, fue mediado además por los flavonoides. Sin embargo, la capacidad antioxidante solo mostró un aumento ligero, una explicación podría ser el método utilizado para evaluarla, el cual depende de la capacidad de los antioxidantes de eliminar radicales hidrógeno; por lo que el posible daño oxidativo del tratamiento en las células permitió la oxidación de otras sustancias antioxidantes, como el ácido ascórbico. En piña, por ejemplo, se ha observado la disminución del contenido de vitamina C, que contribuye en gran medida a la capacidad antioxidante en frutos tratados con luz UV-C. De acuerdo a Ayala-Gil (2011), en fresa cv. Camino Real se ha reportado una disminución, aunque no significativa, en el contenido de ácido ascórbico.

### **8.5 Cambios en la expresión de genes codificantes de enzimas clave en la ruta general de los compuestos fenólicos a casusa de la irradiación con luz UV-C en *F. x ananassa* cv. Camino Real**

Los genes estructurales en la ruta biosintética de flavonoides son regulados generalmente a nivel transcripcional, por la activación de sus genes, y en ocasiones se ha reportado la regulación a nivel post-transcripcional. En plantas, algunos de estos genes, por ejemplo PAL, DFR y FLS, forman parte de familias, en donde sus miembros son expresados en diferentes tejidos o en respuesta a diferentes estímulos ambientales, entre ellos la luz, afectando de manera directa la producción de las enzimas correspondientes. Debido al incremento en la acumulación de los compuestos antes mencionados, se decidió evaluar el cambio en la expresión de los genes estructurales a causa de la irradiación con luz UV-C.

La principal enzima en la regulación de la síntesis de flavonoides es PAL, pues media el flujo de carbonos para la síntesis de flavonoides en el primer paso de la ruta general, y también sintetiza otros compuestos como monómeros de lignina. Por ello se decidió evaluar la expresión de los genes con identidad de PAL, anotadas en la base de datos del genoma de referencia de *F. x ananassa*. Es importante señalar que el número de genes PAL seleccionados para el estudio de la expresión en este trabajo, estuvo restringido por la similitud de las secuencias de los genes, por lo que otros fragmentos que tuvieron identidad de PAL, pero que fueron demasiado cortos para el diseño de oligonucleótidos, quedaron excluidos del análisis. De forma semejante a como ocurre en *O. sativa*, *P. trichocarpa*, *E. sagittatum* y *D. fragans*, el análisis filogenético arrojó que estas secuencias en *F. x ananassa* se agruparon en dos clados que podrían marcar su funcionalidad. El transcrito de *FaPAL1* presentó mayor abundancia en los aquenios comparado con el receptáculo, por lo que podría estar involucrado de manera directa en la síntesis de monómeros de lignina y taninos, que también media esta enzima, más que en flavonoides, pues en semillas se ha reportado un alto contenido de estos compuestos (Huang *et al.*, 2010). La diferencia en la expresión de genes PAL en diferentes tejidos y su correlación con la síntesis de compuestos diferentes

(flavonoides y ligninas) ha sido reportada en plantas como *E. sagittatum* (Aadil *et al.*, 2013), aunque también se ha reportado que pueden funcionar coordinadamente en la producción de productos específicos (Kao *et al.*, 2002).

Por otra parte, el incremento de la expresión de *FaPAL2* y *FaPAL6* por efecto del tratamiento en los órganos evaluados, se relaciona con el alto porcentaje de identidad de las secuencias de ambos genes (Anexo 4); por lo que se esperaría que los promotores respectivos, tuvieran elementos *cis* (*G-box*, *GT-box*, *W-box*, etc.) de respuesta a la luz UV-C como se ha observado en *Arabidopsis thaliana* (Ohl *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 2010). El cambio observado en la expresión de los transcritos de *PAL*, concuerda con lo reportado por Tiecher *et al.*, (2013) en jitomates postcosecha tratados con luz UV-C en dosis de hasta 6.0 kJ/m<sup>2</sup>, y por Wu *et al.*, (2017) en la col morada (*Brassica oleracea*). En el presente trabajo, la luz UV-C en frutos maduros de fresa produjo un aumento en la concentración de compuestos fenólicos (antocianinas y flavonoides) que concordó con la inducción de la expresión de *FaPAL2* y *FaPAL6* principalmente.

Chappel y Hahlbrock (1984) mostraron que la inducción de los genes *PAL*, *C4H*, *4CL* y *CHS* es coordinada, lo que concuerda con el aumento en el nivel de expresión observado para *FaC4H*, *Fa4CL* y *FaCHS* en este trabajo, en frutos de fresa irradiados con luz UV-C. El incremento coordinado por este tratamiento, también se ha reportado en uva (Wang *et al.*, 2003) y en *G. parvifolium* (Deng *et al.*, 2017).

De manera general, se sabe que en plantas, el gen que codifica para C4H está expresado en todos los tejidos, lo que explica la similitud en la abundancia relativa de los transcritos de *FaC4H* observada en los achenios y el receptáculo de *F. x ananassa* cv. Camino Real. No obstante, el tratamiento con luz UV-C aplicado a los frutos, provocó un cambio diferente en la expresión en achenios y receptáculo, permaneciendo reprimidos en los achenios. En contraste, después del tratamiento, la expresión del gen que codifica a la 4-cinamato-CoA ligasa, se mostró reprimida en el receptáculo. La aparente represión puede deberse a una rápida acumulación del transcrito en el receptáculo, debido a la herida que se genera cuando se cortan los frutos para sintetizar inmediatamente compuestos esenciales para el sellado de la herida (monómeros de lignina); esto se ha percibido en genes *4CL* de *A. thaliana*

de clase I (Soltani *et al.*, 2006). Ello supondría que el cambio en la expresión de este gen no pudo observarse, en lugar de mostrarse como reprimido.

Para la chalcona sintasa, se encontró que el nivel de expresión de este gen fue mayor en el receptáculo. Generalmente CHS se localiza en el citoplasma de las células epiteliales de la planta, por lo que se esperaría una mayor acumulación en el receptáculo. Ante estímulos ambientales bióticos y abióticos, su gen es activado a nivel transcripcional, lo que explica el incremento observado en todos los órganos evaluados después del tratamiento aplicado. De manera contraria, se ha reportado un nivel bajo en la expresión en uvas tratadas con luz UV-C, aunque los flavonoides totales de la misma se incrementaron (Xi *et al.*, 2015).

Por otro lado, se observó una mayor acumulación relativa del transcrito de *FaANS* en el receptáculo del fruto. La formación de pigmentos rojos requiere el mantenimiento de altos niveles de expresión de estos genes, por lo que esta acumulación podría estar relacionada con la coloración rojiza del receptáculo. Esto también se ha observado durante el desarrollo de la coloración rojiza en la piel de manzanas (Ubi *et al.*, 2006).

Los genes estructurales de la biosíntesis de flavonoides que mostraron una sobreexpresión de los transcritos de hasta 20 veces, como efecto del tratamiento al que fueron sometidos los tejidos en este trabajo fueron: *FaDFR*, *FaANR* y *FaUDP*, los cuales también se incrementaron en col morada cortada al aplicarse dosis de irradiación UV-C de 1.0, 3.0 y 5.0 kJ/m<sup>2</sup> (Wu *et al.*, 2017). La sobreexpresión de *FaUDP* podría explicar una acumulación de antocianinas diglucosiladas; aunque, por otro lado, la posible fotodegradación de compuestos, como antocianinas con alto grado de glucosilación, o acilación por el tratamiento con luz UV-C, permitirían a su vez la acumulación de antocianinas no aciladas y monoaciladas, lo que resulta en un aspecto interesante a evaluar. Considerando que en otras plantas la inducción de glucosiltransferasas permite la subsecuente acilación de compuestos, la respuesta de los frutos maduros de fresa podría más deberse a la acumulación de antocianinas poliaciladas como lo describen Wu y colaboradores (2017). En *A. thaliana*, algunos factores de transcripción de la familia MYB, como PAP, regulan

directamente la expresión los genes de biosíntesis de antocianinas en respuesta a la irradiación con luz UV-A y luz UV-B.

### **8.6 Cambios en la expresión de genes codificantes de enzimas clave en la biosíntesis de los flavonoides a diferentes tiempos post-irradiación en *F. x ananassa* D. cv. Camino Real.**

Estudios previos han demostrado que los genes de biosíntesis de antocianinas, son sobreexpresados con luz UV-C, pero estos efectos son transitorios observándose en las primeras 24 horas después del tratamiento.

Las fluctuaciones en la expresión de los genes que codifican a la PAL, pueden ser producto de factores a nivel transcripcional, como factores de transcripción (MYB, LIM y NTS) y post-traduccionalmente a través de la ubiquitinación por proteínas repetidas de Kelch F- box (KFB), como lo indican Zhang *et al.*, (2013), resultando en la degradación de PAL. También se ha observado la regulación post-traducciona por la PAL cianasa endógena reduciendo la estabilidad de PAL (Cheng, 2001).

Se observó la represión del gen *FaCHS*, hasta los 60 minutos después de la irradiación de los frutos. De acuerdo con Dao *et al.*, (2011), la CHS es inhibida competitivamente por productos de la vía de los flavonoides, como naringenina y chalcona naringenina, lo que podría sugerir una inactivación de la enzima, producto de la acumulación de dichos compuestos, que también explicaría la inducción y rápida disminución del nivel de *FaCHS* en frutos no tratados. De la misma manera, la disminución de la expresión de *4CL* en los frutos tratados, podría deberse a la inactivación de la enzima por la acumulación de estos compuestos como lo describen Voo *et al.*, (1995). El comportamiento de la expresión de *FaFLS* fue contrastante en los frutos tratados y no tratados, en donde se produjo una disminución de la expresión y un posterior aumento en frutos tratados. Esto podría indicar una acumulación en flavonoles a partir de la inhibición de *FaDFR* pues poseen una relación competitiva en la ruta metabólica. Para *FaFGT*, aquellos frutos a los que no se les aplicó el tratamiento, mostraron un aumento sucesivo de la

expresión hasta los 60 minutos; en contraste, los frutos irradiados, incrementaron su expresión hasta los 40 minutos posteriores al tratamiento. Los transcritos de *FaANS* y *FaLAR* mostraron un patrón semejante, sugiriendo una posible síntesis de antocianinas después de este tiempo. Posteriormente, *FaANS* fue reprimido a los 60 minutos en frutos tratados y no tratados y los niveles de expresión de *FaLAR* aumentan en este tiempo en frutos tratados con luz UV-C, lo que sugiere una disminución en el contenido de antocianinas y un aumento en *trans* flavan-3-ols.

### 8.7 Actividades enzimáticas

Otro de los efectos de la irradiación de luz UV-C es la prolongación de la vida de anaquel en diversos frutos, como consecuencia de un retraso en el proceso de senescencia y maduración de los mismos. Diversos autores han asociado este fenómeno al incremento en la actividad enzimática de PAL, entre otros (González-Aguilar *et al.*, 2001). Esta enzima, además de ser la principal en la ruta de biosíntesis de flavonoides, media la síntesis de otros compuestos como la lignina. En los frutos maduros de *F. x ananassa* cv. Camino Real analizados, la luz UV-C provocó un incremento estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) de la actividad, que coincidió con el aumento en la expresión de las secuencias codificantes para PAL (*FaPAL6* y *FaPAL2*), y la concentración de antocianinas, compuestos fenólicos y flavonoides totales inmediatamente después del tiempo de irradiación, deduciendo que probablemente el aumento en la actividad fue consecuencia de una inducción a nivel transcripcional. El incremento de la actividad enzimática de PAL resultó ser transitoria; por ejemplo, en frutos como la manzana, en donde perduró hasta las 72 horas, aunque también se ha reportado la disminución de la misma debido al tratamiento (Dong *et al.*, 1995; Chalmers *et al.*, 1973).

La reducción en la actividad de PAL, puede ser consecuencia de un incremento en la concentración del ácido ascórbico, el cual causa la disminución del pH óptimo para que la enzima trabaje (Ojeda *et al.*, 2002), lo que concuerda con el aumento en la actividad de la ascorbato oxidasa observada después de los 20 minutos. En los frutos de fresa no tratados, este comportamiento puede deberse a la

autorregulación metabólica para mantener la homeostasis. De acuerdo con Ayala-Gil (2011), la concentración de los compuestos aquí estudiados tiende a reducirse minutos después del tratamiento, pero para los frutos no tratados el patrón fue contrario, por lo que el incremento en la actividad de PAL observado hasta los 20 minutos puede deberse a la síntesis de otros compuestos como ácidos fenólicos, lo cual concuerda con Maccarrone *et al.*, (1993).

Un incremento en la actividad de la ascorbato oxidasa, está correlacionado con la disminución de los niveles del ácido ascórbico en frutos tratados. Es importante destacar que este patrón tiene relevancia, ya que los mecanismos de defensa inducidos deberían conferir tolerancia cruzada a las plantas frente al estrés oxidativo.

## IX. CONCLUSIONES

- El tratamiento con luz UV-C en *F. x ananassa* Duch. cv Camino Real provoca un incremento en el contenido de antocianinas, compuestos fenólicos y flavonoides totales, así como en la capacidad antioxidante en los diferentes órganos del fruto entero (aquenios y receptáculo).
- El tratamiento en frutos maduros de *F. x ananassa* cv Camino Real resultó en un aumento en la cantidad de proteína (Figura 7 y 8) que aparentemente incluyó a la enzima PAL ya que la actividad enzimática también aumento significativamente (Fig. 16) así como la activación del gen estructural (Fig. 11).
- La fluctuante expresión de los genes de las diferentes enzimas de biosíntesis de flavonoids a través del tiempo como consecuencia del tratamiento con luz UV-C, sugiere que la expresión de algunos de estos genes o miembros de la familia, podrían estar controlados por la luz UV-C pero otros responden a otros factores.
- El tratamiento con luz UV-C provoca un cambio en el metabolismo de compuestos fenólicos y antocianinas.

## X. PERSPECTIVAS

- Analizar funcionalmente los genes codificantes para PAL, en frutos maduros de fresa, durante la aplicación de luz UV-C u otros elicitores mediante transformación genética (silenciamiento y/o sobreexpresión), con la finalidad de dilucidar el posible papel de los diferentes genes.
- Analizar los niveles de expresión génica de los miembros funcionales de las familias de los genes de biosíntesis de flavonoides, identificados en este trabajo, en frutos maduros de fresa ante la irradiación con luz UV-C.
- Realizar mediciones de la actividad de las diferentes enzimas codificadas por estos genes, para complementar los resultados de expresión de los mismos como por ejemplo CHS, DFR, ANS y UDP.
- Para complementar los resultados, sería interesante evaluar los niveles de expresión de genes regulatorios de familias como PAP, MYB, TTG y TT.
- Determinar el contenido de lignina y proantocianidinas en diferentes órganos de fresa, con el objetivo de lograr una mejor interpretación de la regulación de la vía y de la actividad enzimática de ésta.
- Dado que los compuestos fenólicos aumentan como consecuencia del tratamiento con luz UV-C y estos actúan como precursores de moléculas del sabor, sería interesante evaluar perfiles de expresión de genes relacionados funcionalmente al sabor, como los de las enzimas pineno sintasa e hidroxilasa, aciltransferasas, furaneol y eugenol sintasa.
- Para obtener mayor información sobre la respuesta a la luz UV-C, y basados en reportes existentes, se podrían complementar estos resultados con la medición de compuestos antioxidantes en los aquenios del fruto.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

- Aaby, K., Skrede, G., Wrolstad, R. E. (2005). Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4032–4040. doi:10.1021/jf048001o.
- Aadil, R. M., Zeng, X. A., Han, Z., Sun, D. W. (2013). Effects of ultrasound treatments on quality of grapefruit juice. *Food Chemistry*, 141(3), 3201-3206.
- Allende, A. M., Alicia B., Begoña T. M., María, F. G. (2007). Impact of combined postharvest treatments (UV-C light, gaseous O<sub>3</sub>, super atmospheric O<sub>2</sub> and high CO<sub>2</sub>) on health promoting compounds and shelf-life of strawberries. *Postharvest Biology and Technology*, 46, 201-211. doi:10.1016/j.postharvbio.2007.05.007.
- Amil-Ruiz, F., Blanco-Portales, R., Munoz-Blanco, J., & Caballero, J. L. (2011). The strawberry plant defense mechanism: a molecular review. *Plant and Cell Physiology*, 52, 1873-1903.
- Archbold, D., y Dennis, F.J. (1984). Quantification of free ABA and free and conjugated IAA in strawberry achene and receptacle tissue during fruit development. *Journal of American Society and Horticultural Science*, 109, 330–335.
- Ariza, M. T., Reboledo-Rodríguez, P., Mazzoni, L., Forbes-Hernández, T. Y., Giampieri, F., Afrin, S., Mezzetti, B. (2016). Strawberry achenes are an important source of bioactive compounds for human health. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1103. doi:10.3390/ijms17071103.
- Asano, N., Kato, A., Oseki, K., Kizu, H., Matsui, K. (1995). Calystegins of *Physalis alkekengi* var. Francheti (Solanaceae). *The FEBS Journal*, 229, 369-376.
- Ayala-Gil, M. E. Efecto de la luz ultravioleta y la temperature en la concentración de flavonoides del fruto de fresa (*Fragaria x ananassa*) (Tesis de Maestría). Cinvestav-Unidad Irapuato. Obtenida de [http://www.ira.cinvestav.mx:86/tesis/ayala\\_2011.pdf](http://www.ira.cinvestav.mx:86/tesis/ayala_2011.pdf)

- Bais, H.P., Vepachedu, R., Gilroy, S., Callaway, R. M., Vivanco, J. M. (2003). Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes in species interaction. *Science*, 301, 1377–1380.
- Ben-Yehoshua, S. (Ed), Mercier, J. (2005). UV irradiation, biological agents, and natural compounds for controlling postharvest decay in fresh fruits and vegetables. *Environmentally friendly technologies for agricultural produce quality*, 265-299. Boca Raton, Estados Unidos: Taylor & Francis Group, LLC.
- Besseau, S., Hoffmann, L., Geoffroy, P., Lapierre, C., Pollet, B., Legrand, M. (2007). Flavonoid accumulation in *Arabidopsis* repressed in lignin synthesis affects auxin transport and plant growth. *Plant Cell*, 19, 148–162.
- Bintsis, T., Litopoulou-Tzanetaki, E. and Robinson, R. K. (2000). Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry – a critical review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 637–645. doi:10.1002/(SICI)1097-0010(20000501)80:6<637::AID-JSFA603>3.0.CO
- Borevitz, J. O., Xia, Y., Blount, J., Dixon, R. A., Lamb, C. (2000). Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis. *Plant Cell*, 12, 2383–2394.
- Boss, P. K., Davies, C., Robinson, S. P. (1996). Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiology*, 111, 1059–1066.
- Boudet, A. M. (2007). Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*, 68, 2722-2735.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brand-Williams, W, M., Cuvelier, E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Brueggemann, J., Weisshaar, B., Sagasser, M. (2010). A WD40-repeat gene from *Malus x domestica* is a functional homologue of *Arabidopsis thaliana*

TRANSPARENT TESTA GLABRA1, *Plant Cell Reports*, 29, 285-294. doi: 10.1007/s00299-010-0821-0

- Butler, B., R. Vergano, R. Testing, J. Bunn, J. Wiles. (1996). Mechanical and barrier properties of edible chitosan films as affected by composition and storage. *Journal of Food Science*, 61, 953-961.
- Caminiti, I. R., Francesco, N., Desmond J. M., Denis, A., James G. L. (2012). The effect of pulsed electric fields, ultraviolet light or high intensity light pulses in combination with manothermosonication on selected physico-chemical and sensory attributes of an orange and carrot juice blend. *Food and Bioprocess Processing*, 90, 442-448.
- Canitez, N. (2002). *Pasteurization of apple cider with UV irradiation*. Orono: University of Maine (Doctoral dissertation, MSc thesis).
- Cantos, E., Espin, J. C., Tomas-Barberan, F. A. (2001). Postharvest induction modeling method using UV irradiation pulses for obtaining resveratrol-enriched table grapes: A new 'functional' fruit?. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 5052-5058.
- Carbone, F., Preuss, A., De Vos, R. C., D'amico, E., Perrotta, G., Bovy, A. G., Rosati, C. (2009). Developmental, genetic and environmental factors affect the expression of flavonoid genes, enzymes and metabolites in strawberry fruits. *Plant, Cell & Environment*, 32, 1117-1131.
- Carbonell-Bejerano, P., Diago, M.P., Martínez-Abaigar, J., Martínez-Zapater, J.M., Tardaguila, J., Núñez-Olivera, E. (2014). Solar ultraviolet radiation is necessary to enhance grapevine fruit ripening transcriptional and phenolic responses. *BMC Plant Biology*, 14, 183.
- Chalmers, D. J., Faragher, J. D., Raff, J. W., (1973). Changes in anthocyanin synthesis as an index of maturity in red apple varieties. *Journal of Horticulture Science*, 48, 387– 392.
- Chang, L., Zhang, X. X., Ren, Y. P., Cao, L., Zhi, X. R., & Zhang, L. T. (2013). Simultaneous quantification of six major flavonoids from *Fructus sophorae* by LC-ESI-MS/MS and statistical analysis. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75, 330.

- Chappel J., Hahlbrock, K. (1984). Transcription of plant defense genes in response to UV light or fungal elicitor. *Nature*, 311, 76-78.
- Charles, M.T., Goulet, A., Arul, J. (2008). Physiological basis of UV-C induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruit IV: Biochemical modification of structural barriers. *Postharvest Biology and Technology*, 47, 41-53. doi: 10.1016/j.postharvbio.2007.05.019
- Cheel, J., Theoduloz, C., Rodriguez, J. A., Caligari, P. D. S., Schmeda-Hirschmann, G. (2007). Free radical scavenging activity and phenolic content in achenes and thalamus from *Fragaria chiloensis* ssp. *chiloensis*, *F. vesca* and *F. x ananassa* cv. Chandler. *Food Chemistry*, 102, 36–44.
- Cheng, G. W., Breen, P. J. (1991). Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116, 865–869.
- Cheng, S. H., Sheen, J., Gerrish, C., Bolwell, G.P. (2001). Molecular identification of phenylalanine ammonia-lyase as a substrate of a specific constitutively active Arabidopsis CDPK expressed in maize protoplasts. *FEBS Letters*, 503, 185–8. doi: 10.1016/S0014-5793(01)02732-6.
- Cheng, X. Y., Zhou, H. Y., Cui, X., Ni, W., Liu, C. Z. (2006). Improvement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in *Cistanche deserticola* cell suspension cultures by chitosan elicitor. *Journal of Biotechnology*, 121, 253–260.
- Clive, Lo, S. C., Nicholson, R. L. (1998). Reduction of light-induced anthocyanin accumulation in inoculated sorghum mesocotyls: Implications for a compensatory role in the defense response. *Plant Physiology*, 116, 979-989.
- Costa, L., Ariel, R. V., Pedro, M. C., Alicia, R. C., Gustavo, A .M. (2006). UV-C treatment delays postharvest senescence in broccoli florets. *Postharvest Biology*, 39, 204-210.

- Dao, T. T. H., Linthorst, H. J. M., Verpoorte, R. (2011). Chalcone synthase and its functions in plant resistance. *Phytochemistry Reviews*, 10, 397–412. doi:10.1007/s11101-011-9211-7.
- Darrow, G. M. (1966). The strawberry: history, breeding and physiology. Holt, Rinehart and Winston, New York. Pp. 447.
- Davis, T. M., Denoyes-Rothan, B., Lerceteau-Kohler, E. (2007) *Strawberry*. Springer, Berlin: Editorial C Kole, Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants IV: Fruits and Nuts, 189–206.
- Deng, N., Liu, C., Chang, E., Ji, J., Yao, X., Yue, J., ... Shi, S. (2017). High temperature and UV-C treatments affect stilbenoid accumulation and related gene expression levels in *Gnetum parvifolium*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 25, 43-49. doi: doi:10.1016/j.ejbt.2016.11.001.
- Donahue, D. W., Canitez, N., Bushway A. A. (2004). UV inactivation of *E. coli* o157:H7 in apple cider: Quality, Sensory and Shelf-Life Analysis. *Journal of Food Process*, 28, 368–387. doi:10.1111/j.1745-4549.2004.23062.x.
- Dong, Y. H. D., Mitra, A., Kootstra, C., Lister, L., Lancaster. (1995). Post-harvest stimulation of skin color in 'Royal Gala' apple. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 120, 95-100.
- Dudareva, N., Martin, D., Kish, C. M., Kolosova, N., Gorenstein, N., Fäldt, J., Miller, B., Bohlmann, J. (2003). Ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: function and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase sub-family. *Plant Cell*, 15,1227–1241.
- El Ghaouth, A., Wilson, C. L., Callahan, A. M. (2003). Induction of chitinase, glucanase, and phenylalanine ammonia lyase in peach fruit by UV-C treatment. *Phytopathology*, 93, 349–355.
- Erendorfer, F. (1983). Sinopsis del reino vegetal. En Tratado de Botánica, Barcelona: Omega, 854-856.
- Erkan, M., Wang, S. Y., Wang, C. Y. (2008), Effect of UV treatment on antioxidant capacity, antioxidant enzyme activity and decay in strawberry fruit.

- Postharvest Biology and Technology*, 48, 163-171. doi:doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.09.028.
- FAO/STAT. (2014). Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2014). FAO/STAT statistics database. Rome, Italy: FAO. Obtenida Octubre 2016 de <http://faostat3.fao.org/home/E>.
  - Folta, K. M., Davis, T. M. (2006). Strawberry genes and genomics. *Critical Reviews in Plant Science*, 25, 399–415. doi:10.1080/07352680600824831
  - Frohman, M.A. (1990). PCR Protocol: a Guide to Methods and Applications In (Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. & White, T.J., Eds.), p. 28. Academic Press, San Diego.
  - Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez-Suarez, J. M., Quiles, J. L., Mezzetti, B., Battino, M. (2012). The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition*, 28, 9–19. doi:10.1016/j.nut.2011.08.009
  - Giovannoni, J. (2001). Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 725–749.
  - González-Aguilar, G. A., Wang, C. Y., Buta, J. G. and Krizek, D. T. (2001). Use of UV-C irradiation to prevent decay and maintain postharvest quality of ripe ‘Tommy Atkins’ mangoes. *International Journal of Food Science & Technology*, 36, 767–773. doi:10.1111/j.1365-2621.2001.00522.x
  - González-Aguilar, G. A., Villegas-Ochoa, M. A., Martínez-Téllez, M. A., Gardea, A. A., Ayala-Zavala, J. F. (2007). Improving antioxidant capacity of fresh-cut mangoes treated with UV-C. *Journal of Food Science*, 72, 197–202. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00295.x.
  - Gonzalez-Barrio, R., Vidal-Guevara, M. L., Tomas-Barberan, F. A., Espin J. C. (2009). Preparation of a resveratrol-enriched grape juice based on ultraviolet C-treated berries. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 374- 382.
  - Hancock, J. F. (1999). Strawberries. *CABI Publishing*, New York.

- Hannum, S. M. (2004). Potential impact of strawberries on human health: a review of the science. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, 2004, 44, 1–17.
- Hemphill, R., Martin, L. H. (1992). Microwave oven-drying method for determining soluble solids in strawberries. *Horticultural Science*, 27, 1326.
- Hirakawa, H., Shirasawa, K., Ohshima, A., Fukuoka, H., Aoki. (2013). Genome-wide SNP genotyping to infer the effects on gene functions in tomato. *DNA Research*, 20, 221–233.
- Hollósy, F. (2002). Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron*, 33, 179–197. doi:10.1016/S0968-4328(01)00011-7
- Howard, C. M., Albregts, E. E. (1984). Anthracnose. Pages 85-87 In: *Compendium of Strawberry Diseases*. J.L. Mass, Ed. APS Press, St. Paul, MN. 138 pp.
- Huang, J., Gu, M., Lai, Z., Fan, B., Shi, K., Zhou, Y., Yu, J., Chen, Z. (2010). Functional analysis of the Arabidopsis *PAL* gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiology*, 153 (4), 1526–1538. doi: 10.1104/pp.110.157370.
- Iwashina, T. (2003). Flavonoid function and activity to plants and other organisms. *Biology Science in Space*, 17, 24-44. doi.org/10.2187/bss.17.24
- Jagadeesh, S., Charles, M. T., Garipey, Y., Goyette, B. Raghavan, G. S. V., Vigneault, C. (2011). Influence of postharvest UV-C hormesis on the bioactive components of tomato during post-treatment handling. *Food Bioprocess*, 4, 1463–1472. doi: 10.1007/s11947-009-0259-y.
- Jagadeesh, S. L., Charles, M. T., Garipey, Y., Goyette, B., Raghava, G. S. V., Vigneault C. (2009). Influence of postharvest UV-C hormesis on the bioactive components of tomato during post-treatment handling. *Food Bioprocess Technology*, 4, 1463-1472.
- Kao, Y. Y., Harding, SA, Tsai, C. J. (2002). Differential expression of two distinct phenylalanine ammonia-lyase genes in condensed tannin-accumulating and lignifying cells of quaking aspen. *Plant Physiology*, 130, 796–807.

- Kirubakaran, S. I., Begum, S.M., Ulaganathan, K., Sakthivel, N. (2008). Characterization of a new antifungal lipid transfer protein from wheat. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46, 918-927.
- Knee, M., Sargent, J. A., Osborne, D. J. (1977). Cell-wall metabolism in developing strawberry fruits. *Journal of Experimental Botany*, 28, 377–396.
- Kovinich, N., Saleem, A., Arnason, J. T., Miki, B. (2012). Identification of two anthocyanidin reductase genes and three red-brown soybean accessions with reduced anthocyanidin reductase 1 mRNA, activity, and seed coat proanthocyanidin amounts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 574–584. doi:10.1021/jf2033939.
- Kumar, J., Babele, P. K., Singh, D., Kumar, A. (2016). UV-B Radiation Stress Causes Alterations in Whole Cell Protein Profile and Expression of Certain Genes in the Rice Phyllospheric Bacterium *Enterobacter cloacae*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1440. doi:10.3389/fmicb.2016.01440.
- Kusano, M., Tohge, T., Fukushima, A., Kobayashi, M., Hayashi, N., Otsuki, H., Kondou, Y., Goto, H., Kawashima, M., Matsuda, F., Niida, R., Matsumi, M., Saito, K., Fernie, A. R. (2011). Metabolomics reveals comprehensive reprogramming involving two independent metabolic responses of arabidopsis to ultraviolet-b light. *The Plant Journal*, 67, 354–69. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04599.x.
- La Camera, S., Gouzerh, G., Dhondt, S., Hoffmann, L., Fritig, B., Legrand, M., Heitz, T. (2004). Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunological Reviews*, 198, 267–284.
- Lin-Wang, K., Micheletti, D., Palmer, J., Volz, R., Lozano, L., Espley, R., Hellens, R. P., Chagné, D., Rowan, D. D., Troglio, M., Iglesias, I., Allan, A. C. (2011). High temperature reduces apple fruit colour via modulation of the anthocyanin regulatory complex. *Plant, Cell & Environment*, 34, 1176–1190. doi:10.1111/j.1365-3040.2011.02316.x
- Liu, J., Stevens, C., Khan, V. A., Lu, J. Y., Wilson, C. L., Adeyeye, O., Kabwe, M. K., Pusey, P. L., Chalutz, E., Sultana, T., Droby, S. (1993). Application of

- ultraviolet-C light on storage rots and ripening of tomatoes. *Journal of Food Protection*, 56, 868-872.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*, 25 (4), 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
  - Loh, E. (1991). Anchored PCR: amplification with single-sided specificity. *Methods*, 2, 11-19.
  - Lunkenbein, S., Bellido, M. L., Aharoni, A., Salentijn, E. M. J., Kaldenhoff, R., Colner, A., Muñoz-Blanco J., Schwab, W. (2006). Cinnamate metabolism in ripening fruit: characterisation of an UDP-glucose:cinnamate glucosyltransferase from Strawberry. *Plant Physiology*, 140 (3) 1047-1058. doi: 10.1104/pp.105.074955
  - Maccarrone, M., D'Andrea, G., Salucci, M. L., Avigliano, L., Finazzi-Agro, A. (1993). Temperature, pH, and UV irradiation effects on ascorbate oxidase. *Phytochemistry*, 32, 795–798.
  - MacDonald M. J., D'Cunha G. B. (2007). A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochemistry Cell Biology*, 85, 273–282. doi: 10.1139/o07-018.
  - Mackerness, S. A. H. (2000). Plant response to ultraviolet-B (UV-B: 280–320) stress: what are the key regulators?. *Plant Growth Regulation*, 32, 27–39.
  - Manning, K. (1998). Isolation of a set of ripening-related genes from strawberry: their identification and possible relationship to fruit quality traits. *Planta*, 205, 622–631.
  - Mabry, T. J., Harborne, J. B. (1982). *The flavonoids: advances in research*. Chapman and Hall, London; New York.
  - Matsumi, Y., Kawasaki, M., (2003). Photolysis of atmospheric ozone in ultraviolet region. *Chemical Reviews*. 103, 4767-4782. doi:10.1021/cr0205255.
  - Mohd-Hanif, H. A., Shamsudin, R., Mohd-Adzahan, N. (2016). Effects of UVC irradiation and thermal treatment on the physico-chemical properties and

- microbial reduction of clear and turbid tamarind juice. *International Food Research Journal*, 23 (Suppl): S107-S112 (December 2016).
- Muthukumaran, S., Tranchant, C., Shi, J., Ye, X., Xue, S. J. (2017). Ellagic acid in strawberry (*Fragaria* spp.): Biological, technological, stability, and human health aspects. *Food Quality and Safety*, 1, 227-252.
  - Nakano, Y., Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22, 867-880. doi:[10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232).
  - Nasibi, F., M-Kalantari, K. (2005). The effects of UV-A, UV-B and UV-C on protein and ascorbate content, lipid peroxidation and biosynthesis of screening compounds in *Brassica napus*. *Iranian Journal of Science and Technology (Sciences)*, 29, 39-48. doi: 10.22099/ijsts.2005.2782.
  - Nigro, F., Ippolito, A., Lattanzio, V., Di Venere, D., Salerno, M. (2000). Effect of ultraviolet-C light on postharvest decay of strawberry. *Journal of Plant Pathology*, 82, 29–37.
  - Ohl, S., Hedrick, A. S., Chory, J., Lam, J. C. (1990). Functional properties of a phenylalanine ammonia-lyase promoter from Arabidopsis. *The Plant Cell*, 2, 837-848.
  - Ojeda, H., Andary, C., Creaba, E., Carbonneau A., Deloire, A. (2002). Influence of pre-and post verasion water deficit on synthesis and concentration of skin phenolic compounds during berry growth of *Vitis vinifera* var. Shiraz. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53 (4), 261–267.
  - Oliveira, I. R., Crizel, G. R., Severo, J., Renard, C., Chaves, F. C., Rombaldi, C. V. (2016). Preharvest UV-C radiation influences physiological, biochemical, and transcriptional changes in strawberry cv. Camarosa. *Plant Physiology and Biochemistry*, 108, 391-399.
  - Pala, C. U., Toklucu, A. K. (2013). Effects of UV-C light processing on some quality characteristics of grape juices. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 719-725.
  - Pan, J., Vicente, A. R., Martínez, G. A., Chaves, A. R. and Civello, P. M. (2004). Combined use of UV-C irradiation and heat treatment to improve

- postharvest life of strawberry fruit. *Journal of Food and Agriculture*, 84, 1831–1838. doi:10.1002/jsfa.1894
- Paniego, N. B, Zuurbier, K. W., Fung, S. Y., van der Heijden, R., Scheffer, J. J., Verpoorte, R. (1999). Phlorisovalerophenone synthase, a novel polyketide synthase from hop (*Humulus lupulus* L.) cones. *European Journal of Biochemistry*, 262, 612– 616.
  - Perkins-Veazie, P. (1995). Growth and ripening of strawberry fruit. *Horticultural Reviews*, 17, 267–297.
  - Perkins-Veazie, P., Collins K. J., Howard, L. (2008). Blueberry fruit response to postharvest application of ultraviolet radiation. *Postharvest Biology and Technology*, 47, 280-285. doi:10.1016/j.postharvbio.2007.08.002.
  - Pombo, M. A., Dotto, M. D., Martínez, G. A., Civello, P. M. (2011). UV-C irradiation delays strawberry fruit softening and modifies the expression of genes involved in cell wall degradation. *Postharvest Biology and Technology*, 59, 94-102.
  - Pombo, M. A., Rosli, H. G. R., Martínez, G. A., Civello P. M. (2009). UV-C treatment affects the expression and activity of defense genes in strawberry fruit (*Fragaria x ananassa*, Duch.). *Postharvest Biology and Technology*, 51, 141-148.
  - Reyes, L. F., Miller, J. C., and Cisneros-Zevallos, L. (2004). Environmental conditions influence the content and yield of anthocyanins and total phenolics in purple- and red-flesh potatoes during tuber development. *American Journal of Potato Research*, 81, 187–193. doi: 10.1007/BF02871748.
  - Rivas-González, M. (2006). Caracterización fisicoquímica y molecular del almidón de plátano (*Musa paradisiaca* L. var. Macho) modificado por métodos químicos. Tesis maestría. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos-Instituto Politécnico Nacional.
  - Rivera-Lopez, J., Ordorica-Falomir, C., Wesche-Ebeling, P. (1999). Changes in anthocyanin concentration in Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) pericarp during maturation, *Food Chemistry*, 65, 195–200.

- Rosli, H. G., Civello, P. M., Martínez, G. A. (2004). Changes in cell wall composition of three *Fragaria x ananassa* cultivars with different softening rate during ripening. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 823–831.
- Rott, M. E., Jelkmann, W. (2001). Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR), and modification of an RNA extraction protocol. *European Journal of Plant Pathology*, 107, 411–420.
- Ryan, K. G., Swinny, E. E., Markham, K. R., Winefield, C. (2002). Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant *Petunia* leaves. *Phytochemistry* 59, 23–32. 10.1016/S0031-9422(01)00404-6.
- SAGARPA/SIAT Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera de SAGARPA. (2014). SIAP/SAGARPA estadística. Ciudad de México, México. Obtenida Octubre 2017 de <https://www.gob.mx/siap/>.
- Santhirasegaram, V., Razali, Z., Somasundram, C. (2013). Effects of thermal treatment and sonication on quality attributes of Chokanan mango (*Mangifera indica* L.) juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 1276–1282.
- Schenk, M., Guerrero, S., Alzamora, S.M. (2008). Response of some microorganisms to ultraviolet treatment on fresh-cut pear. *Food and Bioprocess Technology*, 1, 384–392.
- Severo, J., Tiecher, A., Pirrello, J., Regad, F., Latché, A., Pech, J. C. (2015). UV-C radiation modifies the ripening and accumulation of ethylene response factor (ERF) transcripts in tomato fruit, *Postharvest Biology and Technology*, 102, 9-16.
- Shulaev, V., Korban, S. S., Sosinski, B., Abbott, A. G., Aldwinckle, H. S., Folta, K. M., et al. (2008). Multiple models for rosaceae genomics. *Plant Physiology*, 147, 985-1003.
- Sinkard, K. L., Singleton, V.L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*. 28, 49–55.
- Skrovankova, S., Sumczynski, D., Mlcek, J., Jurikova, T., Sochor, J. (2015). Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries.

*International Journal of Molecular Sciences*, 16, 24673–24706. doi:10.3390/ijms161024673.

- Soltani, B. M., Ehlting, J., Hamberger, B., Douglas, C. J. (2006). Multiple *cis*-regulatory elements regulate distinct and complex patterns of developmental and wound-induced expression of *Arabidopsis thaliana* 4CL gene family members. *Planta*, 224, 1226-1238.
- Springob, K., Nakajima, N., Yamazaki, M., and Saito, K. (2003). Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. *Natural Products Reports*, 20, 288–303.
- Stracke, R., Favory, J. J., Gruber, H., Bartelniewoehner, L., Bartels, S., Binkert, M. (2010). The Arabidopsis bZIP transcription factor HY5 regulates expression of the PFG1/MYB12 gene in response to light and ultraviolet-B radiation. *Plant, Cell and Environment*. 33, 88–103. doi: 10.1111/j.1365-3040.2009.02061.x.
- Tanner, G. J., Francki, K. T., Abrahams, S., Watson, J. M., Larkin, P. J., Ashton A. R. (2003). Proanthocyanidin biosynthesis in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 31647–31656.
- Thornton, B., Basu, C. (2011). Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 39, 145–154. doi: 10.1002/bmb.20461.
- Tiecher, A., Paula, L.A., Chaves, F.C., Rombaldi, C.V., (2013). UV-C effect on ethylene, polyamines and the regulation of tomato fruit ripening. *Postharvest Biology and Technology*, 86, 230-239.
- Tilbrook, K., Arongaus, A. B., Binkert, M., Heijde, M., Yin, R., Ulm, R. (2013). The UVR8 UV-B Photoreceptor: Perception, Signaling and Response. *The Arabidopsis Book*, 11, 0164. doi:10.1199/tab.0164.
- Tran, M. T. T., Farid, M. (2004). Ultraviolet treatment of orange juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5, 495–502.
- Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Vernet, G., Aziz, A. (2006). Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 114, 405-413.

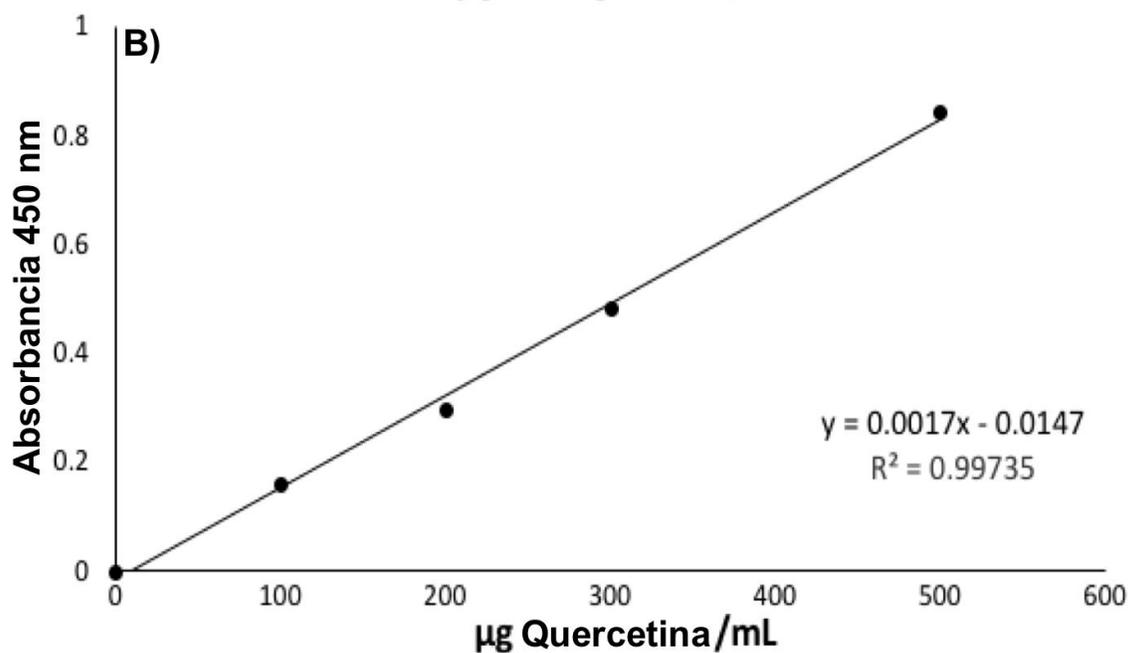
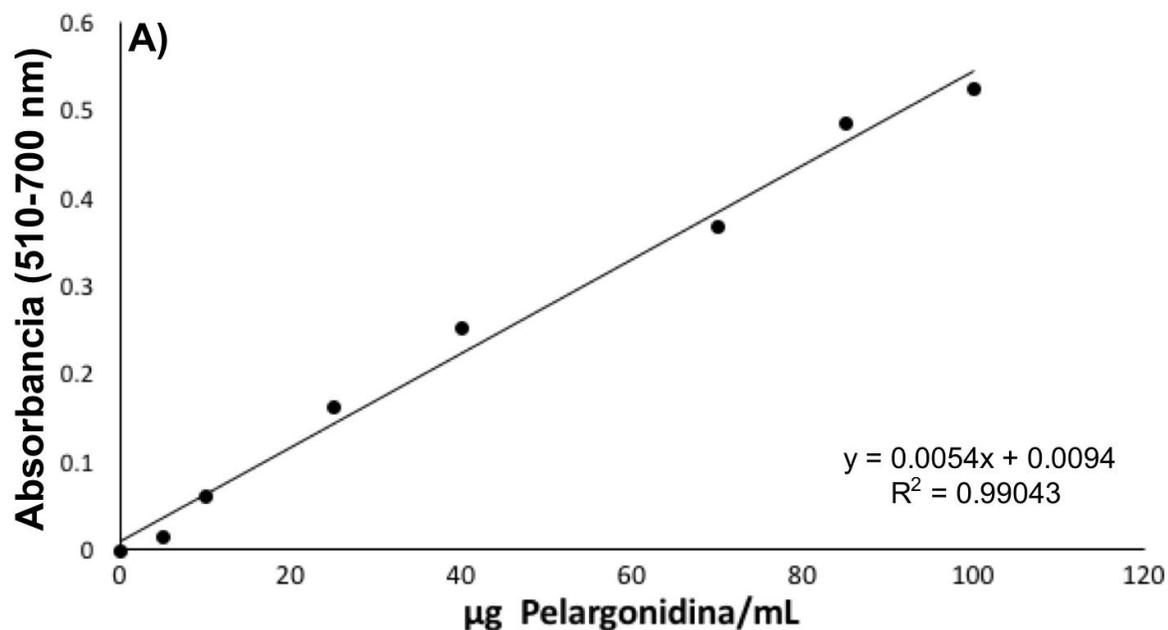
- Tzanetakis, E. I., Martin, R. R. (2008). A new method for extraction of double-stranded RNA from plants. *Journal of Virological Methods*, 149,167–170. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.01.014.
- Ubi, B. E., Honda, C., Bessho, H., Kondo, S., Wada, M., Kobayashi, S., Moriguchi, T. (2006). Expression analysis of anthocyanin biosynthetic genes in apple skin: effect of UV-B and temperature. *Plant Science*, 170, 571-578.
- Urban, L., Charles, F., Alcántara M. M., Aarouf, J. (2016). Understanding the physiological effects of UV-C light and exploiting its agronomic potential before and after harvest. *Plant Physiology and Biochemistry*, 105, 1-11, doi:10.1016/j.plaphy.2016.04.004.
- Voo, K. S., Whetten, R. W., O'Malley, D. M., Sederoff, R. R. (1995). 4-Coumarate: coenzyme A ligase from loblolly pine xylem (isolation, characterization, and complementary DNA cloning). *Plant Physiology*, 108, 85-97.
- Wang S. Y., Jiao H. (2000). Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5677–5684. doi:10.1021/jf000766i
- Wang, S. Y., Gao H. (2003). Effect of chitosan-based edible coating on antioxidants, antioxidant enzyme system, and postharvest fruit quality of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Food Science and Technology*, 52, 71-79.
- Wellmann, F., Lukacin, R., Moriguchi, T., Britsch, L., Schiltz, E., Matern, U. (2002). Functional expression and mutational analysis of flavonol synthase from *Citrus unshiu*. *European Journal of Biochemistry*, 269, 4134-4142.
- Williams, R. J., Spencer, J. P., Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?. *Free Radial Biology Medicine*, 36, 838-849.
- Wilmouth, R. C., Turnbull, J. J., Welford, R. W., Clifton, I. J., Prescott, A. G., Schofield, C. J. (2002). Structure and mechanism of anthocyanidin synthase from *Arabidopsis*. *Structure*, 10, 93–103.

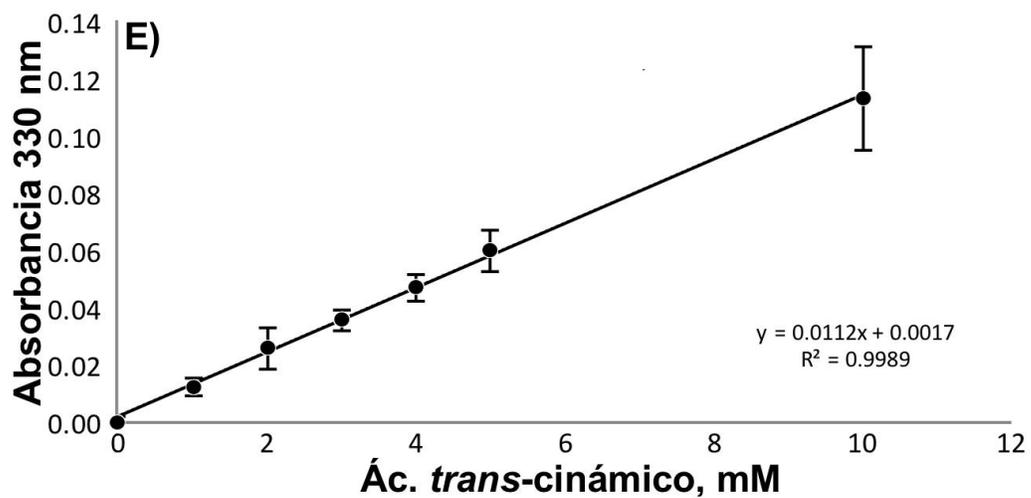
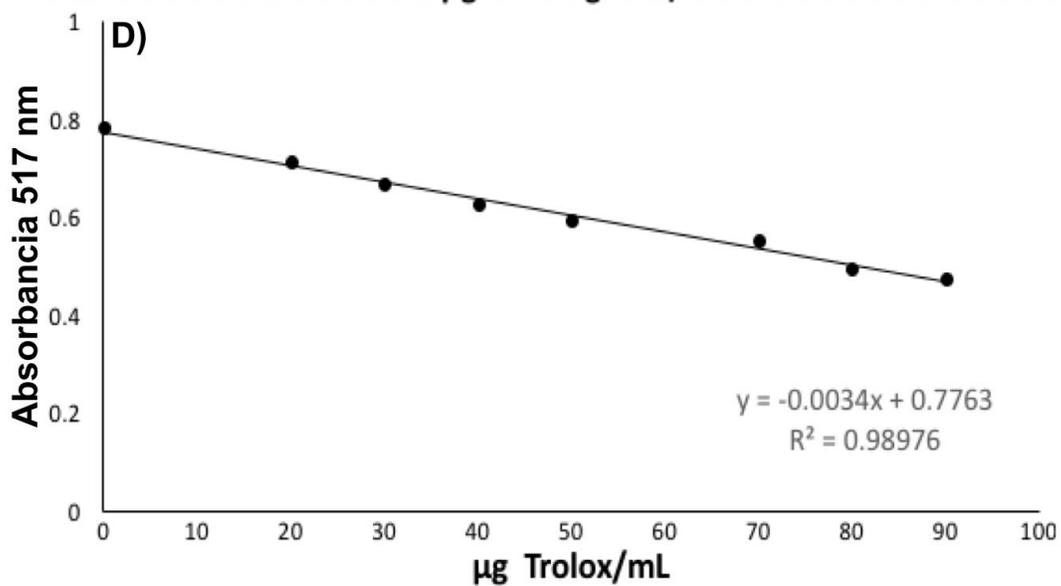
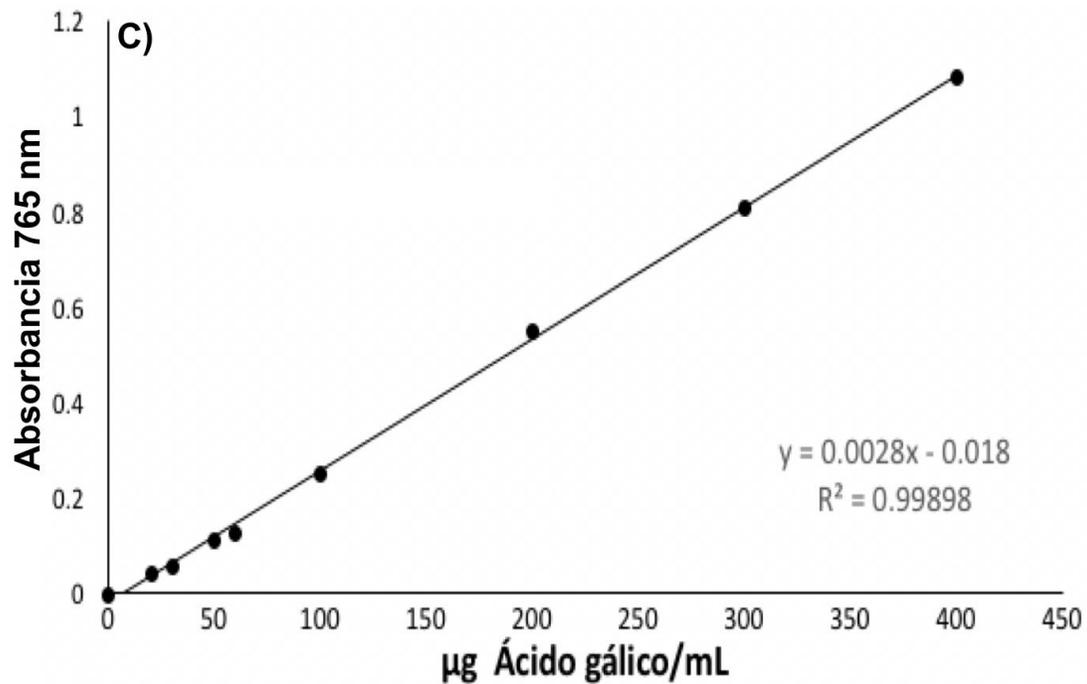
- Windram, O., Madhou, P., McHattie, S., Hill, C., Hickman, R., Cooke, E., Jenkins, D.J., Penfold, C.A., Baxter, L., Breeze, E., et al. (2012). Arabidopsis defense against *Botrytis cinerea*, chronology and regulation deciphered by high-resolution temporal transcriptomic analysis. *Plant Cell*, 24, 3530-3557.
- Woisky, R. G., Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, 37, 99-105.
- Wrolstad R.E., Shallenberger R.S. (1981). Free sugars and sorbitol in fruits a compilation from the literature. *Journal of the Association of Analytical Chemistry*, 64, 91-103.
- Wu, J., Liu, W., Yuan, L., Guan, W. Q., Brennan, C. S., Zhang, Y. Y., Zhang, J., Wang, Z.-D. (2017). The influence of postharvest UV-C treatment on anthocyanin biosynthesis in fresh-cut red cabbage. *Scientific Reports*, 7, 5232. doi:10.1038/s41598-017-04778-3.
- Xi, H. F., Ma, L., Wang, L. N., Li, S. H., Wang, L. J. (2015). Differential response of the biosynthesis of resveratrols and flavonoids to UV-C irradiation in grape leaves. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 43, 163–172.
- Xi, Z. M., Zhang, Z. W., Huo, S. S., Luan, L. Y., Gao, X., Ma, L.N., Fang, Y. L. (2013). Regulating the secondary metabolism in grape berry using exogenous 24-epibrassinolide for enhanced phenolics content and antioxidant capacity, *Food Chemistry*, 141, 3056–3065.
- Xie, Z., Fan, J., Charles, M. T., Charlebois, D., Khanizadeh, S., Rolland, D., Roussel, D., Zhang, Z. (2016). Preharvest ultraviolet-C irradiation: Influence on physicochemical parameters associated with strawberry fruit quality. *Plant Physiology and Biochemistry*, 108, 337-343.
- Zhang, H., Li, R., Liu, W. (2011). Effects of chitin and its derivative chitosan on postharvest decay of fruits: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 917-934.

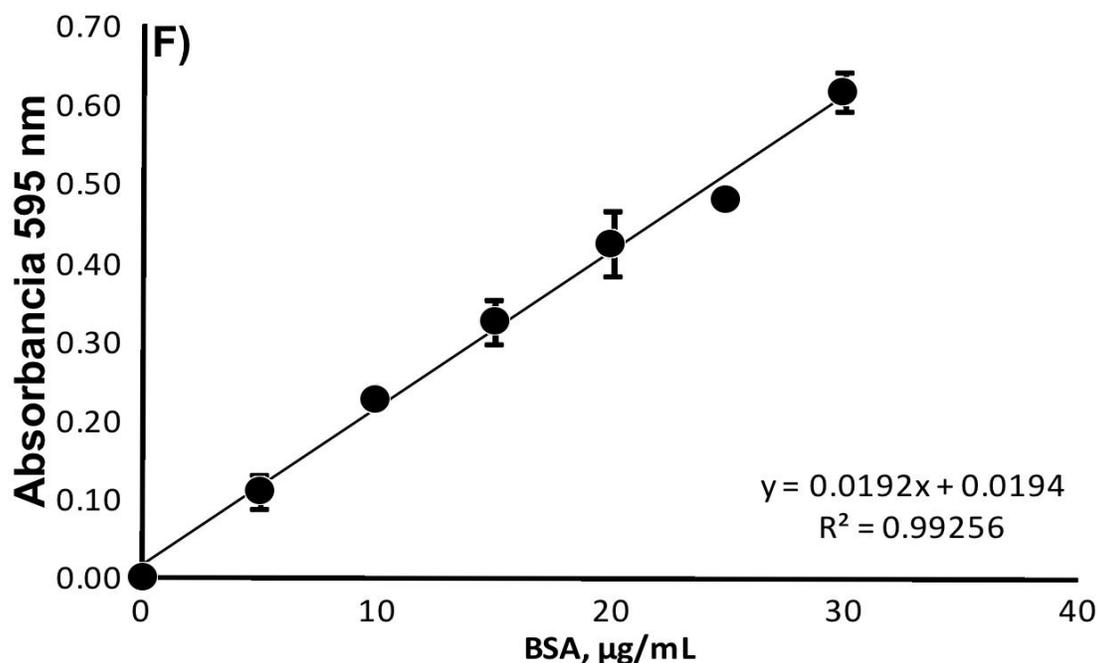
- 
- Zhang, M, G. Xiao, J. Peng, V.M. Salokhe. (2003). Effect of modified atmosphere package on preservation of strawberries. *International Agrophysics*, 17, 143-148.
  - Zhang, X., Gou, M., Liu, C.-J. (2013). Arabidopsis Kelch repeat F-Box proteins regulate phenylpropanoid biosynthesis via controlling the turnover of phenylalanine ammonia-lyase. *The Plant Cell*, 25, 4994–5010. doi:10.1105/tpc.113.119644
  - Zhong, R., Ye, Z.H. (2012). MYB46 and MYB83 bind to the SMRE sites and directly activate a suite of transcription factors and secondary wall biosynthetic genes. *Plant Cell Physiology*, 53, 368–380.

## XII. . ANEXOS

**ANEXO 1.** Curvas de calibración por espectrofotometría UV y UV-VIS. **A)** Antocianinas totales, **B)** flavonoides totales, **C)** compuestos fenólicos totales, **D)** capacidad antioxidante, **E)** ácido *trans*-cinámico, y **F)** proteínas.







**ANEXO 2.** Lista de oligonucleótidos empleados en el presente trabajo. **A)** Secuencias y características de los oligonucleótidos diseñados para la cuantificación de la expresión por qPCR, y **B)** señalamiento de la región que flanquea los oligonucleótidos seleccionados.

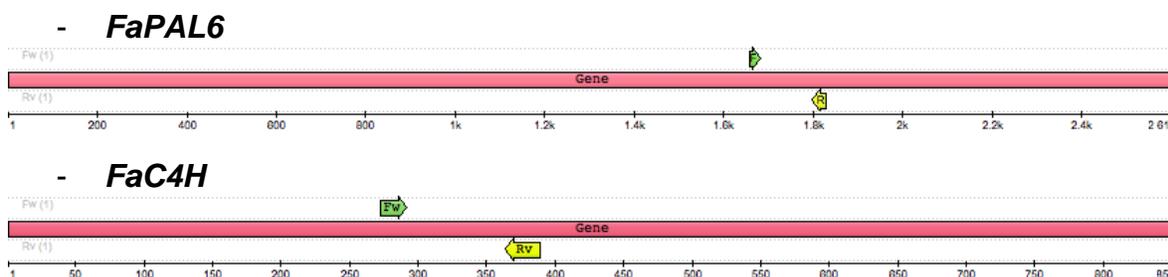
**A)**

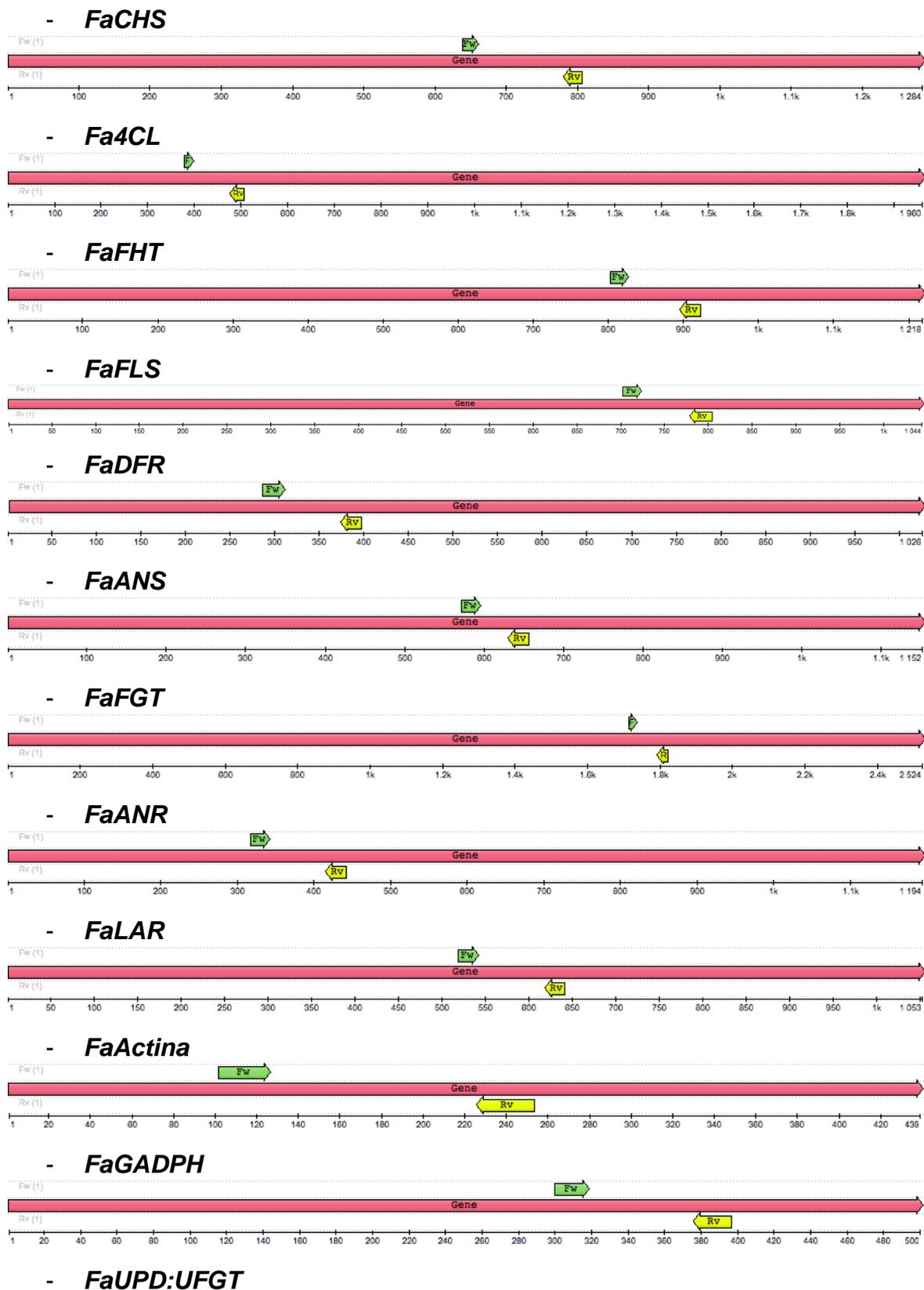
**Tabla A2.** Secuencias y características de los oligonucleótidos diseñados para la cuantificación de la expresión por qPCR en frutos maduros de *F. x ananassa* cv. Camino Real.

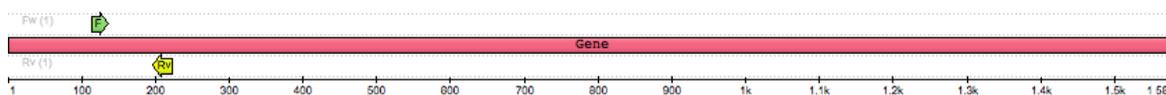
Gen	Nombre del gen	Accesión NCBI	Longitud del amplicon (pb)	Eficiencia de amplificación (%)
<i>FaPAL1</i>	Fenilalanina amonió liasa 1	AB360390.1	201	89
<i>FaPAL2</i>	Fenilalanina amonió liasa 2	AB360391.1	197	92
<i>FaPAL5</i>	Fenilalanina amonió liasa 5	AB360394.1	201	78

<i>FaPAL6</i>	Fenilalanina amonio liasa 6	HM641823.1	169	96
<i>FaCHS</i>	Chalcona sintasa	AB201757.1	168	82
<i>FaC4H</i>	Cinamato-4 hidroxilasa	DQ898278.1	117	88
<i>Fa4CL</i>	4-cumarato CoA ligasa	KX450230.1	152	94
<i>FaFHT</i>	Flavanona 3-hidroxilasa	AY691918.1	119	84
<i>FaFLS</i>	Flavonol sintasa	DQ087252.1	151	97
<i>FaDFR2</i>	Dihidroflavonol 4-reductasa	AY695812.1	122	93
<i>FaLAR</i>	Leucocianidina reductasa	JX134096.1	105	82
<i>FaANS</i>	Antocianidina sintasa	JX134095.1	164	86
<i>FaFGT</i>	Flavonoide 3-O-glucosiltransferasa	AY695816.1	135	87
<i>FaANR</i>	Antocianidina reductasa	DQ664192.1	151	82
<i>FaGADPH</i>	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	AB363963.1	107	98
<i>FaUDP/UFGT</i>	UDP glucosa:Flavonoide 3-O-glucosiltransferasa	AY575056.1	109	96
<i>FaActina</i>	Actina	AB116565	125	98

**B)** Señalamiento de la región que flanquea los oligonucleótidos seleccionados. El sitio de anclaje de los oligonucleótidos diseñados se muestra de manera gráfica para cada uno de ellos en la siguiente lista; donde de color verde se muestra el sitio de unión para el oligonucleótido en directo y en amarillo el reverso.







### ANEXO 3. Correlación de la expresión génica y la actividad enzimática de PAL.

Análisis de varianza multifactorial de la expresión de los genes de referencia,  $\beta$ -actina y *GADPH*. También se enlistan los grados de libertad (GL, en abreviaturas), la suma de cuadrados (SC), las medias cuadráticas (MC), el valor F y el valor p. El código de significancia es  $0 < \text{****} < 0.001 < \text{***} < 0.01 < \text{**} < 0.05$

ANOVA multifactorial de la expresión del gen de  $\beta$ -actina

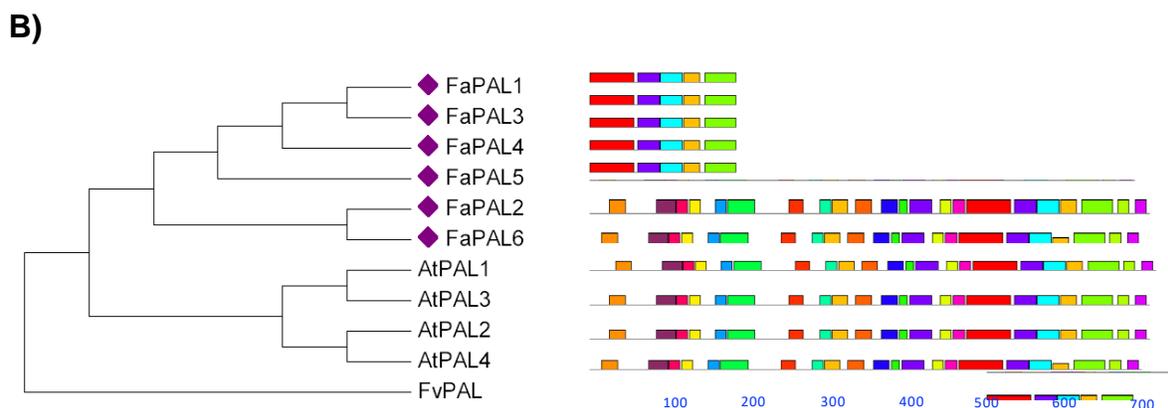
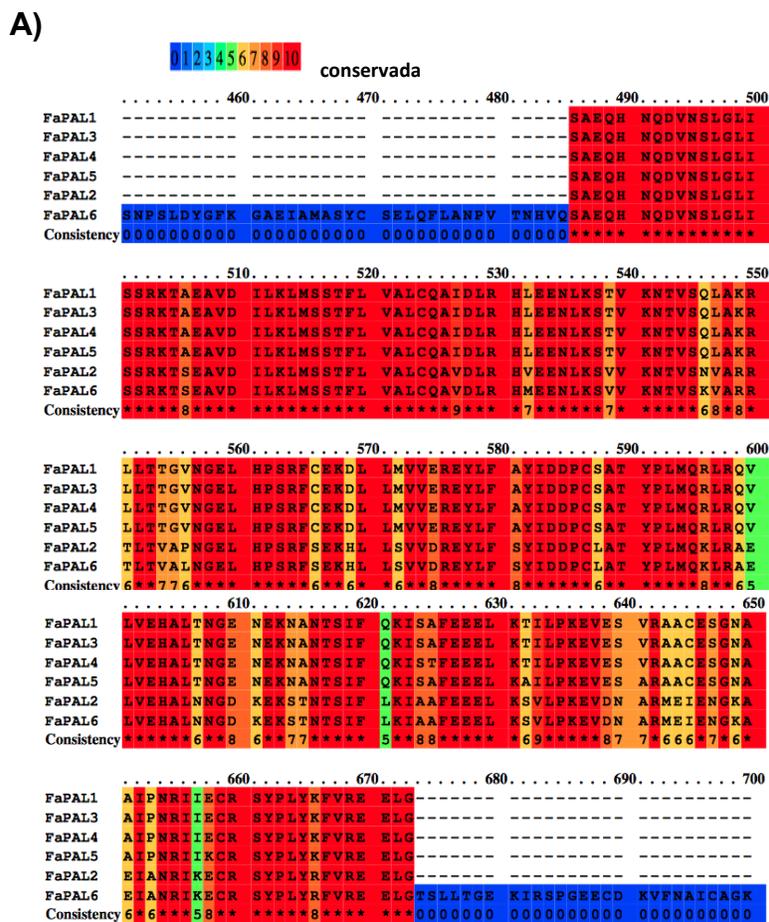
Factor	GL	SC	MC	F	p	Significancia
Órgano	2	24.84	12.420	1.761	0.241	
Tratamiento	1	10.90	10.904	1.546	0.237	
Tiempo	1	25.79	25.788	4.794	0.0474	*
Órgano*Tratamiento	2	1.63	0.813	0.115	0.892	
Tiempo*Tratamiento	4	52.13	13.033	35.021	9.03e-09	***

ANOVA multifactorial de la expresión del gen de *GADPH*

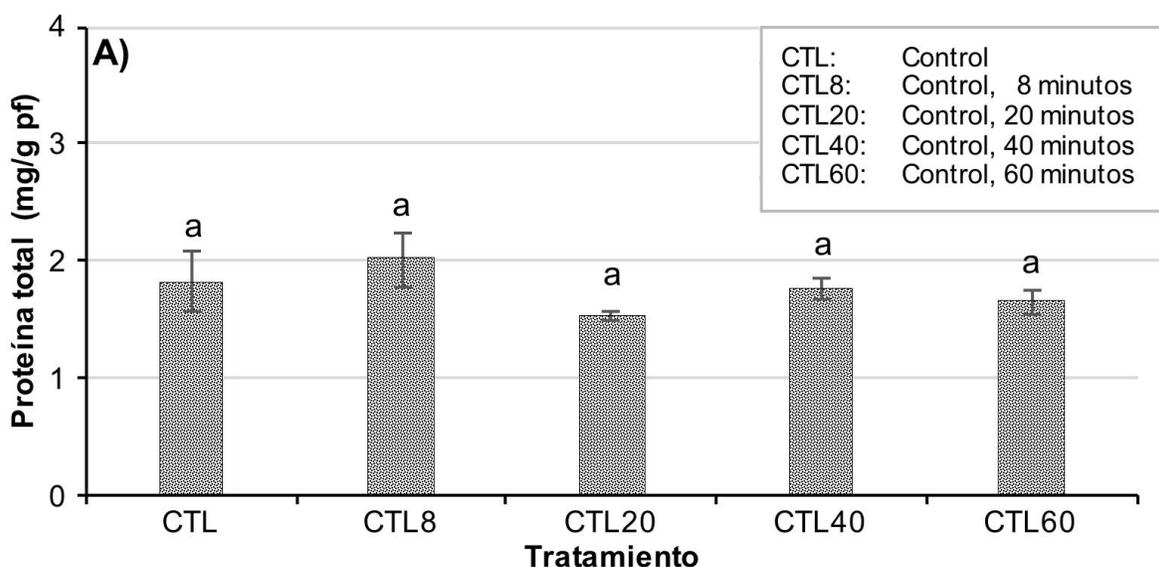
Factor	GL	SC	MC	F	p	Significancia
Órgano	2	1.60	0.801	0.288	0.755	
Tratamiento	1	3.28	3.282	1.180	0.299	
Tiempo	4	47.94	11.985	44.991	1.00e-09	***
Órgano*Tratamiento	12	3.38	1.690	0.608	0.560	
Tiempo*Tratamiento	20	11.96	2.990	11.223	6.12e-05	***

### ANEXO 4. Comparación de secuencias de proteínas FaPAL.

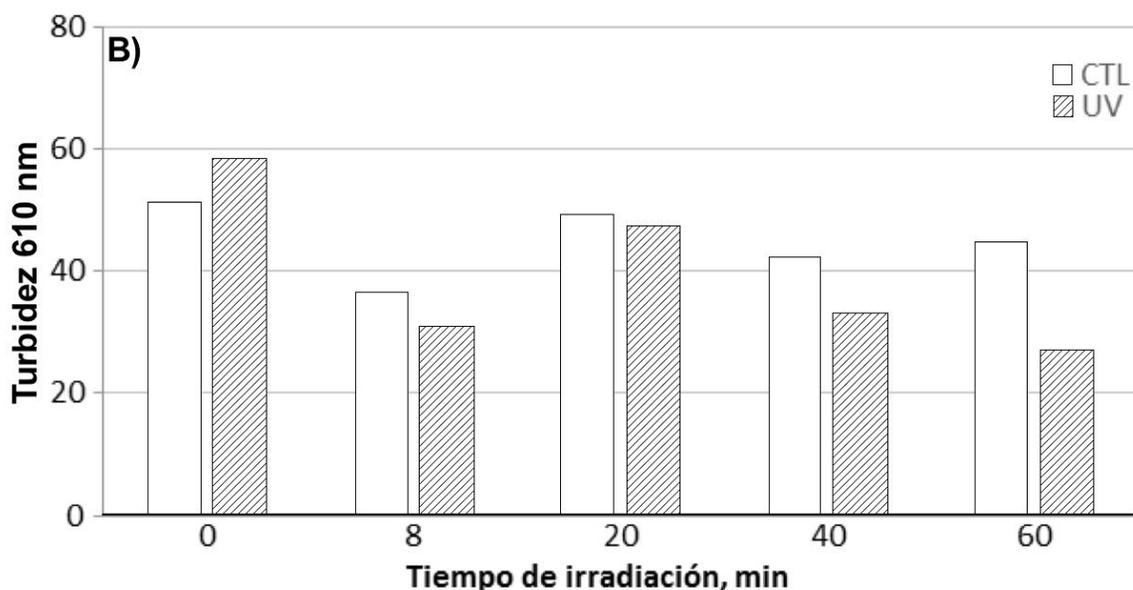
Se muestra el alineamiento de las secuencias utilizando el programa PRALINE (A) y la relación filogenética de los genes *FaPAL* en conjunto con los dominios estructurales de la proteína en *A. thaliana* (B). Se construyó un árbol filogenético enraizado con la secuencia PAL de *Flammulina velutipes* utilizando MEGA 7 por el método de Neighbor-joining con 1000 iteraciones bootstrap. La búsqueda de dominios se realizó con el programa MEME.



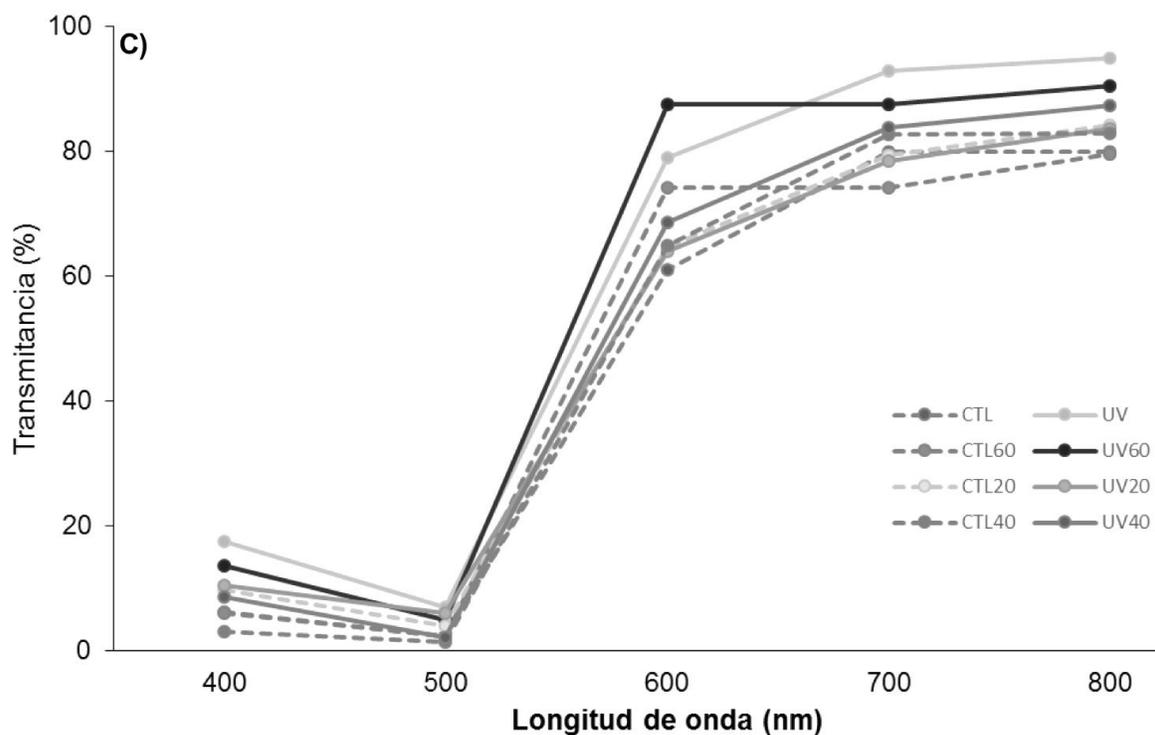
**ANEXO 5.** Contenido de: **A)** proteínas totales, **B)** turbidez, y **C)** transmitancia (%); en frutos maduros de *F. x ananassa* cv. Camino Real sin tratamiento de luz UV-C,



**Figura 6A.** Efecto del tiempo de incubación en el contenido total de proteínas en frutos maduros de *F. x ananassa* cv. Camino Real sin tratamiento de luz UV-C. Los valores representan el promedio de tres réplicas, las barras indican la desviación estándar y las letras diferentes denotan diferencias significativas entre tratamiento (ANOVA-Tukey)  $p \leq 0.05$ .



**Figura 6B.** Efecto del tiempo de incubación en la turbidez de jugos de frutos maduros de *F. x ananassa* cv. Camino Real con y sin tratamiento de luz UV-C. **CTL** y **UV-C** denota las muestras de fruto sin y con tratamiento, respectivamente.



**Figura 6C.** Espectros de las muestras que muestran la claridad en jugos de frutos maduros de *F. x ananassa* cv. Camino Real, determinado por el porcentaje de transmitancia.

## Anexo 6. Secuencias identificadas

### Fenilalanina amonio liasa

```
>FAN_icon19502613.1.g00001.1 /partial
tattacaacaatggcttgccatccaatttgtccgggtgggaggaaccaagtttgattatggctttaaggag
ctgagattgccatggcatcttattgttctgagcttcagtttctcgaaaatccagtgaccaaccatgtccagag
tgctgagcaacacaaccaggatgtcaactctttgggggttgatttctgacgaaaaactgcagaagcagttgac
atactgaagctcatgtcttccacatttttggtagcgctttgccaagccattgatttgaggcatttggaggaga
acttgaagagcaccggttaagaa
>FAN_icon19657031.1.g00001.1 /partial
ccctgccttgctacctatccattgatgcaaaaaactgagggcagagctagtagaacaatgccttgaataatggg
acaaagagaagagcacaacacctccatcttctcaagattgctgcttttgaagaggaactgaagagtgtctt
gcctaaagaagtcgacaatgctaggatggaaattgagaatgggaaagcagaaattgcaaacaggatcaaggaa
tgcaggtcttatccattgtacaggtttgtgagggaggaattggggactagtttattgactggtgagaagatca
ggtcacctggagaagaatgtgacaaggtgttcaacgca
>FAN_icon19833627.1.g00001.1 /partial
gattggtgacctgtttcgattgatagagctgtgtatgcgctgaagaattgcgacgggatttgggaggaagct
actgaggaggagctgatggacgctatggcgcaagctgattcgactgggatgtttatatgcccgcacactgggg
tggcgctgacggcattggataagcttaggaagagtgggggttattggagctggtgatcggactgtggtggttag
cactgctcatggtttgaagtttacacagtttaaggttgattatcactcaaaggccataccagagatggcttgc
cggtttgccaatccaccaacggaggtcaaggcagagttcggggcggtcatggatgttctt
>FAN_icon20525477.1.g00001.1 /partial
```

```

ggcaagt caggtggcg tttccgggagagaagatccttggggatg c gaaagagtttgcgaccaagttccttaga
gagaacaggtttccaatgagttttcagacaaatggatcattaccaaagacttacctggagaggtggttacg
cattggattttccatggatg c g c g a g c t t a c c c c g a c t g g a g a c t a g a t t c t a c a t t g a a c a g t a t g g c g g c g a
agatgacgtttggattgccaagactctctacag
>FAN_iscf00213646.1.g00001.1 /partial
gactactacatgaccggttgaactggaacttggcggcgggaggggttgaaagggagccacctggacgagctgaa
aagaatggtgaatgactaccggaagccgggtggtgatgctgggaggggagagcctcactgtagggcaggtggcg
gcgattgccaaccacgacgggtggcgtg c g c g t g g a g c t t t c c g a g g a g a a g c g g g t g g g g t g a a g g c c a g c a
gtgactgggtcatggattcaatggggaaggggtacagacagttacgggtg c a c c a c c g g g t t c g g t g c t a c c t c
ccaccggagaacccaaaacgggtggagctctccagaaagaactcatcag
>FAN_iscf00286784.1.g00001.1 /partial
atggagaccgtaaccagaatggataccaccagaatggatccaaaacggttccttggacattctctgcgtca
aaacagagtccctcaaagctgtttcggaccgccttaactggggagcggcggcggagtcocatgacaggcagcca
ccttgatgaagtgaagcgc at g g t g g c c g a g t a c a g g a a g c c t g t g g t g a a g c t c g g t g g a a g a c c t t g a c t
attgctcaggtgcggccatagctaaccatgactctggtg c a a g g t t g a a c t g g a t g a g t c t g c c a g g g c t g
gtgtgaagggcagtagtgactgggtgatggactccatgaacaaaggaacagacagctatggtg c a c t a c c g g
gttcggtgcgacctccacagacgaaccaagcaagggcgtgcacttcagaaagagctgattagattcttgaac
gctggagttttggcaagggaaacagagttctcacacctg c c t c a c c c t a c a a a g a g c a g c c a t g c t t g t t a
gaatcaacactctcctgcaaggctactccggcataagattc g a a a t c t t a g a a g c c a t c a c c a a g t t t c t c a a
ccacaacattactccctgcttgcctctccggcggcaccatctcctcctccgggagaccttggtgcccctttcctat
attg c c g g a c t a c t a a c c g g c g c c c a a t t c t a a g t c o g t t g g a c c a a a a g g c g a g a c c c t c a a t g c t g c t c
aggctttcgaacaagtcgggtatcagctcagggtttttcogag
>FAN_iscf00312646.1.g00001.1 /partial
CacatTTTTGGTAGCGCTTTGCCAAGCCATTGATTTGAGGCAATTTGGAGGAGAAGCTTGAAGAGCACGGTTAAG
aatactgtgagtcagttggccaagaggcttttaactaccgggggtgaatggagagcttcacccttcgaggttct
g c g a g a a g g a t t t g c t t a t g g t t g t c g a a a g g g a g t a c c t t t t c g c c t a c a t t g a c g a t c c t t g c a g c g c t a c
at at c c g t t g a t g c a a a g g c t a a g g c a a g t g c t t g t t g a a c a c g c c t t g a c a a a t g g t g a a a a t g a g a a g a a c
g c a a a c a c t t c a a t t t t c a a a a g a t t t c g g c a t t t g a g g a a g a g c t t a a g g c a t t t t g c t a a a g a g g t t g
a a a g c g t a g g g c t g c a t g c g a g a g c g g t a a t g c g g c g a t t c a a a c a g a a t c a t c g a g t g c a g g t c a t a t c c
t t t g t a c a a a t t t g t g a g g g a g g a g t t g g g g g a g a g t t c t t g a c g g g c g a a a g g t c a g g t c a c c c g g g g a g
g a g t g t g a c a a g g t a t t c a c a g c t a t g t g c c a g g g g a a a a t c a t t g a t c c a a t t c t c g a t t g c c t c a g t g g t t
g g a a c g g t g a a c c t c t t c c g a t a t g c t a g
>FAN_iscf00320447.1.g00001.1 /partial
Caaccatgtccaaagtgtgagcaacacaaccaagatgtcaactccttgggactgatctcctctagaaaaaca
tccgaggctgtgcacattttgaagcta at g t c a t c a a c a t t c c t a g t t g c a t t g t g c c a a g c t g t t g a t c t c a
ggcatatggaagagaacttgaagagcgttgtcaagaacactgtaagta at g t g g c c a g g a g g a c t c t c a c c g t
t g c c c c t a a c g g t g a g c t t c a c c c c t c t c g a t t c t c a g a g a a a c a c c t g c t c t c a g t c g t g g a c c g c g a g t a c
c t t t t c t c t a c a t t g a c g a c c c c t g c c t t g c t a c c t a t c c a t t g a t g c a a a a a c t g a g g g c a g a g c t a g t a g
a a c a t g c c t t g a a t a a t g g t g a c a a a g a g a a g a g c a a a c a c c t c c a t c t t c c t c a a g a t t g c t g c t t t t g a
a g a g g a a c t g a a g a g t g t c t t g c c t a a a g a a g t c g a c a a t g c t a g g a t g g a a a t t g a g a a t g g g a a a g c a g a a
a t t g c a a a c a g g a t c a a g g a a t g c a g g t c t t a t c c a t t g t a c a g g t t t g t g a g g g a g g a a t t g g g g a c t a g t t
t a t t g a c t g g t g a a g g t g a t t t g g t a a g g t c t c a a t c a a g a a g a a c c c a c a a t c g a t c a a t a c a a t a g c t g c
t a t c a a a g g t g c a g a a a t c g c a a t g g c a t c a t a c t g c t c c g a g c t t c a g t t c c t a g c c a a c c c t g t g a c c a a c
c a t g t c c a a a g t g c t g a g c a a c a c a c c a a g a t g t c a a c t c c t t g g g a c t g a t c t c c t c t a g a a a a a c a t c c g
a g g c t g t c g a c a t t t t g a a g c t a a t g t c a t c a a c a g c a a a c a g a t a a

```

## Cinamato 4-hidroxilasa

```

>FAN_iscf00015016.1.g00002.1
atg c g c a g g a t c a t g a c a c t g c c a t t t t t c a c c a a c a a a g t t g t g c a a c a t t a t a g c a a c a t g t g g g a g g a g g
a a a t g g a c c t a g t t g t g c a t g a t c t a a g t a a a g a t g a g g g a g t g a a g a c t a g a g g t a t a g t c a t a a g g a a a c g
c t t g c a a c t g a t g t t g t a c a a c a t t a t g t a t a g g a t g a t g t t t g a t g c c a a g t t t g a a t c a c a a g a g g a c c c c
t t g t t c a t t g a a g c t a c c c g g t t t a a c t c c g a a a g a a g c c g g t t g g c t c a g a g c t t t g a g t a t a a c t a t g g t g
a t t t c a t t c c t t t g c t c a g a c c a t t t c t a a g a g g g t a c t t g a a c a a g t g c a g t g a c t t g c a a a c c a g g c g a c t
g g c c t t t t t c a a c a a c t t t t a t g t t g a g a a a a g a a g g c a a a t t a t g g c t g c c a a t g g a g a g a a g c a a a a t a
a g t t g t g c c a t a g a t c a c a t a a t a g a t g c t c a a a t g a a g g g t g a g a t c a a t g a a g a a a a t g t g c t c t a c a t t g
t a g a g a a c a t t a a c g t t g c a g a a a t a g a g a c a a c c c a t a g g t c c a t g g a a t g g g c a a t a g c t g a a c t g g t g a a

```



gtaacgagctcactgaagaggccgtcaaagaattcatagcaaagcaggtggtgttttacaagagactgcacaa  
 ggtgtacttctgcatgcaattcccaaatctccgtctggaaaaatcttaagaaaagacctcagagccaagcta  
 ggtgcagctactccaaacgtctaa  
 >FAN\_iscf00187887.1.g00001.1  
 Atgaaggatgatgctgctggcgaggttccggttgccctttgtagtgaggtcaaactggaactcagatcactgagg  
 atgaaatcaaacaatatttttcaaaacaggttgatattctacaaaagaataaatagagtatatttttcatcgaagc  
 cattcccaagtctccatcaggcaaaatcttgcggaaggagttaagagcgaagcttgctgctggctttgcaaat  
 tga

### Chalcona sintasa

>FAN\_iscf00114710.1.g00001.1  
 atggagtctctagccaaagaagcaaagggtccagcctcaatactagccattggcactgcaaatccagtaagct  
 gctactaccaagatgactatcccgaacttcttggttcaaagtcaccaaagcagcagcagagacgggattaaaaga  
 caagttcaaacacatatgtgaaaagtcgatggggaagaagcgttatctgggcatcaccgaagagagtctgaaa  
 gccaacctaacatatgctcctacaaggctccctcactcaatgcacgtcaagacttggtgggttcacgaggtcc  
 ctaaactccacctcatcttctgcacagcttccctgcgtgcacatacctgggtgcccgaacttccagctcatcaagct  
 cctcggcctcaatccatctatcaaccgcgtcatgatctacctgcaaggctgctttgctggtgggacggtgcta  
 cggattgccaaggacatagccgagaacaatgcccggagctcgtggtcttatcgtctgctctgagatcaccacca  
 tgttatttcagcaaccttgtgacactcacttggatgtattggctgggacaggcactggttggagacgggtgccc  
 ggctttgatcgttgggggtaaatccggaccctgaaagtgaatgtcaacttttcaatgttatgtctgctagagag  
 actattatcccaactcggagcatgcagttatgggacacttgcgtgagatgggatttgagtattattatcat  
 cagaagttccaggggtgggtgggtgcaacatagaagaggttttgagtaaaagggattgagggcattgggtgtaa  
 tggtaattggaactcattggtctatagatattcatcctgggggtcctgccattctggacaaagtggaagaacaa  
 ctgggtttgaaggaggggaagctgagagcaacaaggcatattcttagtgagtttgggaatatgggagctccat  
 gtgtgtattttattttggatgagatgaggaagaagtcagtgccggaaggaaaagccacaactggtgaaggggt  
 ggaatggggggtcttaattgggatcgggcccaggacttactgtggagactgttgtgctccgtagtgctccggcc  
 actgctatttga  
 >FAN\_iscf00123220.1.g00001.1  
 atgggtgaagaagcgttatctgggcatcaccgaagagagtctgaaagccaaccctaagatatgcacctataagg  
 ctccctcactcgtatgcacgtcaagacttggtgattcacgaggttcccaactcggcaaggaagcggcgttgaa  
 ggccatcagagaatggggacatctcatcttaagcctcaccacctcatcttctgcacagcttccctgcgtccac  
 atgcccgggtgcccgaacttccagctcgtcaagctcctcggcctcaatccatctatcaaccgggttcatgatctacc  
 agcaaggctgctttgctggtggcacagctcctacggatttccaaggatgtcgcggagaacaatgcccggagctcg  
 tgttcttatcgtgtgctgtgagatcaccaccatgttttttccagcaaccttgtgacagctccaaggatgtattg  
 gtcggacaggtctggttttcggatggtgcccggcgtttcatcgttgggtgtaaatcctgaccccaaaagtgaac  
 aagttccggagttgggtgggtgcaacatagaagaggtttcogagtaaaagggattgagggcattgggggttaatgg  
 tgattggaactcattgttctatagtatctcctgggggtcctgccattctggacaaagtggatcggagaac  
 aactgcatgaggaagaagctcgggtgaaggggttggaaatggggggtcttaattgggatcggggccagaacttactg  
 tggagactggttgtgctgpcactgaagctctcgtcttccctaatagcctcattgaagcaaaaaggagaggtt  
 tacaaggtggagattgaaggtgactccaagcttgtggttagatgccattaatggccactctacaccccttggga  
 gaattcgcgagctttgtcaagatattaaggttagagaacctcgtgtatgggaggagtggttccccagatg  
 cggcgtagctttaacctttgactatgtaaaacttcatgtgcacttga  
 >FAN\_iscf00382872.1.g00001.1  
 Atgactgggtctatgggcaggaaagggtaaggatgatgagaatgattgtaatgagaagagacaagatgagcaaa  
 gcagggaacctatctgccccaaagccaagggaaacttttggagaaaaacaaagctaaatctgccatagactgtat  
 tccttatgcctccggcagccctcaaactgagatagagagctttggaggaagtagacatgtgggttgatctgcaa  
 agaagaagttgtgcatgtaggaggtgggatctcactggcattccatgcaaacgtcaaaaagttgatgggtgaaga  
 agcattatctaggtatcacagaagagagtctgaaagccaatcctaacatatgcacctacaaggctccctcact  
 cgtatgcacgtcaagacttggtgattcacgaggttcccaactcggcaaggaagcggcgttgaaggccatcaga  
 gaatggggacatcccatctcaagcctcaccacctcatcttttgcacagcttccctgcgtgcacatgcccgggtg  
 ccgactttctataa

### Dihidroflavonol reductasa

>FAN\_iscf00009622.1.g00002.1

atgggatcggagtcogaatcagtttgtgtcaccggagcctccggtttcgtcggatcatggctggatcatgagac  
 tccatagagcgtggctacactgtccgagccaccgtgagagaccctactaatgogaagaaggtgaagcatctgct  
 agacttgccgaaggcggcgactcacttgacgctgtggaaggcggacctggcggacgagggcagcttcgacgaa  
 gccattaagggatgcagcgggtgtgttccatgtcgccacacctatggatthttgagtoaaaggaacctgagaatg  
 aagtataaagccaacaataaacggggcgttagacatcatgaaagcatgtctgaaagcaaagactgttagaag  
 gctgggtgtttacagcttctgcgggatctgtaaatggtgaaagagaccaaaagccgggtctacaatgaaagcaac  
 tggagcgtatgcaatthttgcccggagagttaaagatgactggctggatgtatthttgtgtcaaaaactctggctg  
 agcaagaggcatggaagtttgctaaagaaaacaacattgatttcattaccattataccaactctggatcatcgg  
 tccatttctcatgcccggctatgcccggagctctcattaccggactttcgcctctatttggaaatgaaggtcat  
 tattcgatcataaagcaaggccagtttgtgcatctagacgacctctgcccagctctcatatatacttgcagac  
 atccgaaagcagagggctcgtacatttgttccatcgcacgctctacgattcatgaaattgcaaaattgctaag  
 agaaaagtatcccgaatacaatgttccatacaagttcaagggcattgaaagataacttgacaaaggtccatttt  
 tcttcaagaaattgttggaaacaggggttgagttcaagtagcagcttggaggacatgtttgtagggcagctcg  
 atgcttataagcaaaggggttgcctccgcctcctactgaaagagttgagaagcaggaggctggcgatagcag  
 tgcgtccatgtcgaagtcactggctaa

>FAN\_iscf00201018.1.g00001.1

atgggggttgggagcagaatccggatccggttgggtgacggggcgcctccggtttcgtcggttcatggctcgtca  
 tgagactcctcgagcgggctacaccgtccgagccaccgtgagagaccctgctaatttgaagaagaacgaagt  
 gataaagccaacaataaatgggatgttagacatcatgaaagcatgtctcaaagcaaagacagttcggaggggtg  
 gtgtttacatcttccggcggagctgtcgccattgaagagcatcgaaaagaggtctacagcgaaaaacaactgga  
 gcgatgttgtgttttgcgggaaagtaagatgactgggtggatgtatthttgtatccaaaactctagccgagca  
 agcagcatggaagtttgccaaagaaaacaacattgatttcattaccgattatoccaaactcttgtaatcggctct  
 tttctcgcgccatctatgccaccaagcctcatatctggactttcaccactcactggtaattaa

>FAN\_iscf00271438.1.g00001.1

atggctcgtcatgagactcctcgagcgggctacaccgtccgagccaccgaggcatgggggttgggagcagaat  
 ccggatccggttgggtgacggggcgcctccggtttcgtcggttcatggcttgcgtcatgagactcctcgagcggg  
 ctacaccgtccgagccaccgtgagagaccctgctaatttgaagaaggtgagacatctgctggagttaccacag  
 gcggccacgcgactcagcgtgtggaaggcggacctggacgtcgaggggaagctttgatgaaagcattataagggct  
 gcaccggaggtttcatgtcgccacgcctatggatttcogagtcggaggaccctgagaacgaagtaaaagcc  
 aacaataaatgggatgttagacatcatgaaagcatgtctcaaagcaaagaccgttcggaggggtggtgtttaca  
 tcttcggccggagctgtcgccattgaagagcatcgaaaggaggtctacagcgaaaaacaactggagcgtatgtg  
 tgttttgcgggaaagtaagatgactgggtggatgtatthttgtatccaaaactctagccgagcaagcagcatg  
 gaagtttgccaaagaaaacaacattgatttcattaccgattatoccaaactcttgtaatcggctcctttctcgcg  
 ccatctatgccaccaagcctcatatctggactttcaccactcactggtaatgttccactagctttggaggaa  
 atgaagctcattatgggattataaagcaatgtcaatacgttcacctagatgatctctgccaatctcatatatt  
 cctctacgagcatccgaaagccgagggccgctacatctgttccatcacatgatgccacgattcacgacattgtg  
 aaattgctgaatgaaaattaccccaagtataatgttccataagaagtaa

### Flavanona-3-hidroxilasa

>FANhyb\_icon00001777\_a.1.g00001.1

atggcccactactactactctgaccgcatagcgggggagaagaacctccaacagagcttcgtccgagcag  
 aagatgagcgcctaaaggtggcctacaaccaattcagcaatgatattccgatcatttccctctccggcatcga  
 agaggtcgaaggccgcgcgctgagatthttgcaagaagattgttgaggcctgagaggactggggcgttttccag  
 attgttgatcacggcatcgaccccaagctcatctcagaaatgactcgtctcgccagagagttcttcgctttgc  
 cgccggaggaaaagctccggttccgacatgtccgggtggcaaaaaggggtggcttccatcgtttccagccatttaca  
 gggagagggcgggtgcaggattggcgcgagattgtgacctacttctcataccgggtgcccaccgctgactactcg  
 aggtggccggacaagccggaggggtggagagatgtgacaaagcagtagcagtgacgagctgatgagcttggcat  
 gcaagctattggaggttttatcagaggccatgggttttagagaaggaggcattgacaaagggcatgtgtggacat  
 ggacaaaaggttgggttaatttctaccggaaatgccccagccggacctcactctcggactcaaacgccac  
 acggatccgggtaccatcaccttttgcgtgcaggaccaagtcgggtggacttcaggccaccagggagcggcgaa  
 agacgtggatcaccttcaacctgtggaaggagctttcgtgggtgaaccttggagaccatggacatgtgagtat  
 actttgcgacaatttcaattaa

>FANhyb\_rscf00001226.1.g00004.1

atggcggcgaacacaatggcgagatcctttcttcagggttgcggctacagaagagtttgcctcctcctcagag  
 ttgttcagatcgagggactgggtatthttaaagataatcaaacactgcaaggagttttcacctaactctggctcac

cgggcagcttcttggattggatggttggtagtggttcttgaagttactaattggtttcccggttcccggaagggtg  
 gtggaggaggatgaagagattgaagctgaaggtgccattaccaacttgagatgatgaggtggttgagagagg  
 tgaatggtgacaacaacactggttggatggtaccaatccacggtgatgggtgcttatcaaacagatgaggtgat  
 tcaaacatttcttgaactaccaggaaaatatcaaacgatggtggtgcatcatttatgatocattgaaatccaat  
 cagggagtcttagcactcaaggcgttgaagcttctgattcattcatggagctgtaccgcagtaacaatttta  
 caggagagaagatgagggagaaaaaccttctgagggtggatatacttggaggaaatacctatcaaagtttcaaa  
 ttctgcacttatttagtgcatttatgacggaggttggaaagctgatacacctgttaccagtggtgattgtgatcgt  
 ctgcaattatcaactagtccatttctggagaggaatgtggaatttcttattgagtgcattggatgatctgctg  
 cggaccagcagaagttccaatactattacagaaacctgtcacgccagcaagcccaacaacaagcctggcttca  
 aaagagaagctacagctcacctggagttgcttattgcatttgacgtgactggcctacttaactggactgagaac  
 atggcacgggaaggtgctgggagaagaaccttctgaagaggtacttcaaactccatttcaagccactac  
 ccgagccttcacgggttggacagctatctgataacaaatcaagtctcaaactactgcaaccaaatatgggtg  
 ggtatgcttgtatattagctccggtcaacttggaaaggggtccgactggctgattcttaccacttgaaaact  
 ggacgggttccgggtgggtcttctgctggcgcaaacgcttataattacagttacgccaccgatgctcttttctc  
 caaacgctacaggggtggcgaaatgcagcccaaacgcttctgattctcttgatgattatttcaatttccggtcac  
 gctgggttatcctaagctgcagttgatgaataaggtgtcaaacggcactcttctggaagctctacatgggttcta  
 tacttgggttctgggttagtggaatgtagccgaagtttaggggtcattgaaactgctgcaaacgctcgggggtca  
 ctgttttaagtgggtggcggtggaagtttgggggtcattgaaaccgccagcgtcgggggtcactgttctctagt  
 ggtggcggtgggtgcttctcgtacattagttgcttccggttcttctttagcttgtatggactattgactatg  
 cttgaattgacaaaaccttctatgtgatgcgagcaatatgggtatggcactatgcttccgctgtag

### Chalcona isomerasa

>FANhyb\_rscf00000241.1.g00008.1

atgattccagatatacagggaaaaagctcttcgcaattattggcggttaaagtatatgctgcgggattatacgtaa  
 atcagtcocatcttaataaactgaatgcttggaaaggaagaccagctgctgagattcaaaaggatccatccct  
 gttcagctocatgtttcaatctcctctgagaaatcattacagattattctgggttagagatggtgatgggaaa  
 acattctgggatgccttgaatgatgccatctctccaagaatcaaatacaccactcctggtgatgattacatct  
 attgtgacattcaggttctatctcatctaatgggcttccgctctagtgtggatgctacaatagaatcagaaaa  
 cgtgagttcggcgctttttgatgtatttttgggagacactcctgtttctcctaccttaaaggcttctggttga  
 accggattggaatcagtcctcaagtag

>FANhyb\_rscf00001140.1.g00004.1

atgcttgaaaaggctatattggcataaatgtatttatgctgatgataaagacgtaaaagaattgcttagcgaaa  
 aatatggaaaattgtcccttctgaaactccaggaaaaacaaggagataatgatgtgctgctggaaactgatat  
 aggggtgactgttagacttcaaatagtttatggcaaatgagcattgggtctgtacgtagtgtctttgaggag  
 tccgtaggaaccagacttcagaagtttgggggatcagataatcaagaattgctacagaggttcaacttctcaat  
 tcaaagatgaaatataaataaccacaaggatctataatagaacctgtcaagggaaaccgggctatgtacttogaac  
 aaccattgatggaaatgatgtaggaagtatccagagcaaaagctcctgtgtaaatcgattctggatttgtatata  
 ggtgaggaaccatttgataaacaagccaaagaagatgtgaagctcaatttggcctctgtcctcaggagtag

### Antocianina sintasa

>FAN\_iscf00130585.1.g00001.1

atggtgactacaatggtgactgctgcatccattgggttcaagagttgagagtttggccagcagcgggatctcaa  
 cgatcccgaaggagtacgtgagacccaaagaggagctcgttaacatcgggtgacatattcgaagacgagaagag  
 caccgaagggcctcaagtacctaccattgatttgaaggagatagattccgaggacatcaaagtgaggaagcaa  
 tgtagggaggagttgaagaagcagccgtcgaatgggggtgcatgcaccttgtcaaccacggcatctccgacg  
 agctcatggaacgggtcaagaaggccggaaaagccttcttctgatcttccattgagcagaaggagaagtagtgc  
 caatgaccaggcctccggcaaaattcaaggctacggaagcaagcttgcacaacaatgcttccgggcaacttgag  
 tgggaggactacttttccactgtgtttatcctgaggataagcgtgacttgtccatttggcctcaaacacctt  
 ccgactatatgcaagtggttacaacccac  
 tgctag

## Antocianidina reductasa

>FAN\_iscf00122841.1.g00001.1

atgtcgcgaagaatgatgatggagttggattcagacccttacttgatgagtcagtgttgacaccccttgatg  
cctcatctacttatggaaatgagttcactttggggtacatcaaatacaagaccttagctgagaaagtagtgct  
gagctacaatgactctgatgatagtaaattagaagtggttaactcttctctgtggcttagtgggaggagaaact  
ctactttcatatttgcaggaagtggtgggtgcaattctgggatttctggccaacttactggggacttgcttt  
cttgcaatgccttaaaattcttgcaagaatttatgggatcagttcctctgggtgcacattgatgatgtttgcca  
agcacatatcttctgcatattgactgaaggcctgaagaaggaagcaaaagtgatttcagtaagctgaagaag  
atgggggttgagtaaccagtatggcatcaaggagatactagatgacagtgtagcatgggaaaagaagtaaaaa  
gagctctttttctcaagcagtttagccctgggtacttga

>FAN\_iscf00190964.1.g00002.1

atggagaagaacaaagtctctagagtttgtggttacaggtgggttctgggatataattgggttgctggcttgctcaaaa  
cgctcctcgagaaggggcacacagtcctatgccactctcagaaacttagaggatgaatcaaaagtaggccttct  
gaagtctctcccaatgcagacactaatttctgctgctgttcagtgctgatataatacaatcctaatgacttcaag  
cctgctattgaggggtgtgagtttgttttcatggttgcactcctatgcaacataattcccaaagctcccagg  
ggatattaaatacaagaccttagctgagaaagcagtgctgagctacaatgactttgatgatagtaaattaga  
agtggttaactcttctgtggcttagtgggaggagaaggtcttcttcatatttgcgggaagtggtgggagta  
attctggcacaacttactggggacttgctttcttgcaatgccttaaaattgatgcaagaatttatgggatcag  
tccctctgggtgcacattgatgatgtttgccgagcacatatcttctgcatggaacagccatcaatgaaaggcag  
attctgttgtgcagttgcgtgtcactctatcaaaactcggccatctagaagactattaa

## Flavonol sintasa

>FAN\_iscf00079845.1.g00002.1

atgggggtacaaagagtgcaagacattgcatctacaatttccgaggacacaatcccggcagagtagcttaggt  
cggagaatgagcagccgggaatcaccaccgtcccccaatacagtcctcgaatgccctaccattgatttcagcga  
ccctgatgaggagaagctcctcaaaacaaatcttcgaggccagcaccgactggggcatgtaccaaatcgtgaac  
cacgacatttccaaacgaggccatataccaagttacaggccgttggaaaagaattctttgaaactcccgaggagg  
agaaagaggtttacgcaaaagatcctaactcaaagtcogtgggaaggatacggtaacatttctacagaaggaact  
ggaagggaagaaaggggtgggtggatcatctgttccataagatttggccaccttctgccattaactaccgcttt  
tggcctaagactccagcttcttacaggcattcaataattggagctcgacccaaattaggtgatactccgcagc  
tacgggtgggactctcactctctcagccatggcaaaacttctgggttggccacaaattctgggtccctgagat  
tgggggttcttattttgcttgtgtgtatcaatacgaaccaagtgctcctatgatcttctcattcatcacaacc  
ctaatagaattatttcatatgccttctcaggttctggggtaggggaagccaatgaagagtagtcaaaagaatttac  
acaaggtgggtggagaagctatttaaacttttatctttgggggttagggcttgaagcacaagaactgaaaaaggc  
agttgggtgggtgatgacttgggtgaccttctcaaaatcaattaactatccgccgtgtcctcgccctgatcttgc  
cttgggtgtgggtgctcactgacatgtccgcctcaccattctcgtccccaaacgaagttcagggcctccaag  
cttgcgcgatggccagtggtacgatgtcaagtatatccctaattgcctgggtcatccacattgggtgatcaaat  
ggagataatgagcaatgggaagtagcagggctgtgctgcacagaaccacagtgagcaaaagacaagacgagaatc  
tcttggcctgtattcctggaacctccagcagaccaagtaataagggcctcatcccaaaactcgttgatgataagg  
agaatccaccgaagtacaagaccaagaagtagcagcgagtagtgtttacaacaagctcaacaaaatccccagtg  
a

>FAN\_iscf00135625.1.g00003.1

Atgccggtagagagagttcagggcattggcctttggcgggatcaaggagctcccgaccaagttcatccgctct  
tccatgagcagccacagaacagcaaggccgtggaggagttgcagtgccgggtcatttccctagcatcgccaca  
tgaggaccttgtggaaaaagttgocgaggcagctgctgagtggggggttctttctcatcactgaccatgggggtg  
ccagcttccattgatagaggagttacagaaggttagcaaaagagtttttatgctgccacaggaggaaaaggagg  
cctatgcaaatgacctgctagtcoccataccatcaaatctgcaccatgggggtgccagcttccattgatagagg  
agttacagaagcgcaccogttcatctccgccgtccatttgacgaggacttttgacttttcaaaatagacggc  
ggagatggacgggtgocgcccgcaccccggggaagtaaatgaggagtagaagaaggaaatgctgagagtgacag  
acaagctattggaggtgctttcagaggggtctaggcctggataggaagatggagatcttgagcaatggtaagta  
caagagtgcttctcagaggagcttgggtgaacaaggaaacgcatgocgatgtcgtgggctgtgttccattgtgccg  
ccacatgaggctgtgattggcctctgcccggagcttggttgatgagcaaaatcctgccaataactcgacaaaa  
catacagcgaataaccgataaccgcaaatcaataagatcccacaatag

## Leucoantocianidina reductasa

```
>FAN_iscf00330982.1.g00001.1 /partial
cacttacgtcctcgtccgaccggcccgctctcgtccttccaagtcgacaccatcaagtc
cctcaaagacagaggcgccatcatcctacatgggggatgagtgataagccattgatgga
gaagctactgaaagagcatgagatcgagatagtcatatcagccgctgggtggtgcaacaat
tctagaccagatcaccctagtcgaagccattacttctgtaggaacggtcaagaggttct
gccgtcggagttcgggcatgacgtggaccggggcgatccgggtggaaccgggtctgacat
gtatgtggagaagcgcaaggtgaggcgtgcgattgagaagagtggggtcct
```

```
>FAN_icon19536065.1.g00001.1 /partial
accgggtctgacatgtatgtggagaagcgcaaggtgaggcgtgcgattgagaagagtgg
ggtcccttacacgtacatttgttgcaattctattgcttcttggccctactatgacaaca
gcatccttccgaggttgttccaccggttgatcagttccagatctacggtgatggcacggt
taaaggtatggttgtacggttccgatataattccttggaaaactctgaagaaagatattg
a
```

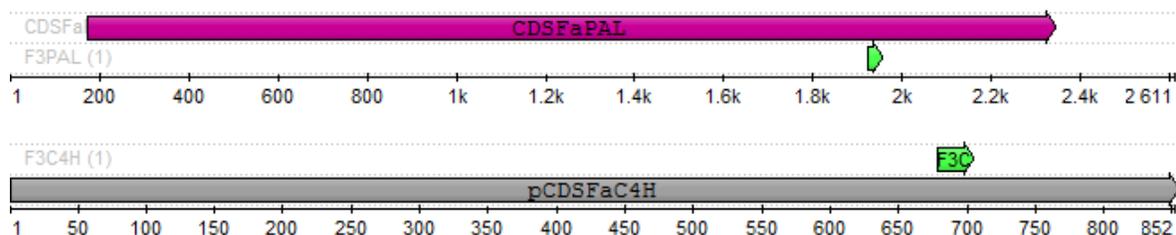
## Anexo 7. Primers 3' RACE

El diseño de los oligos se realizó de acuerdo a lo establecido por Frohman (1990) y Loh (1991). El sitio de anclaje de los oligos diseñados se muestra de manera gráfica para cada uno de ellos en la siguiente lista; donde de color **rosa** se muestra la región codificante de cada gen y en **verde** la secuencia de los oligos diseñados. Para los genes cinamato 4 hidroxilasa, la secuencia es parcial y pertenece a *Fragaria chiloensis* f. Patagonia.

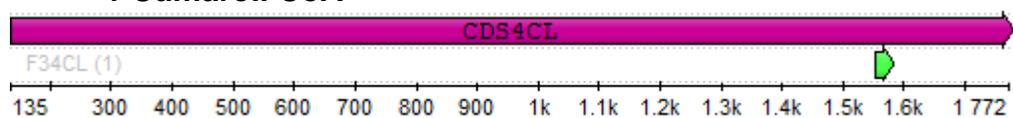
Gen	NCBI Accesión	Secuencia5'-3'
<b>Fenilalanina amonio liasa</b>	HM641823.1	ACGACCCCTGCCTTGCTACCTATCC
<b>Cinamato 4 hidroxilasa 4-coumaroil CoA ligasa</b>	DQ898278.1 APB87291.1	GTCACAGAACCCGAACTTCACAAGC ATGAAAGATGAGGCTGCAGGAGAGG
<b>Flavonol sintasa Dihidroflavonol 4- reductasa</b>	DQ087252.1 AY695812.1	CCTGATCTTGCTCTTGGTGTGGTTG GAGGGCCGCTACATCTGTTCATCAC
<b>Leucoantocianidina 4- reductasa</b>	JX134096.1	CAAGAGGTTTCTGCCGTCGGAGTTC

**Chalcona sintasa** AB201757.1 GGGCTCACATTTACCTCCTCAAAG

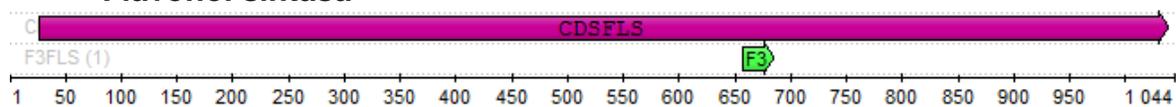
- **Fenilalanina amonio liasa**



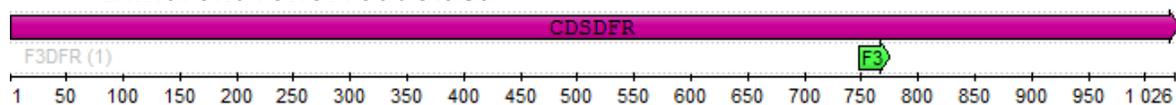
- **4-Cumaroil CoA**



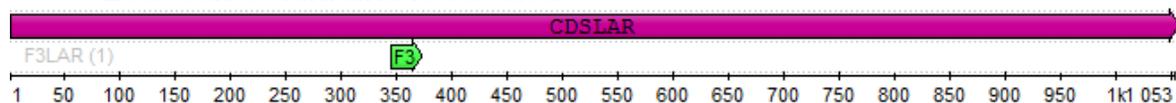
- **Flavonol sintasa**



- **Dihydroflavonol reductasa**



- **Leucoantocianidina reductasa**



- **Chalcona sintasa**

