



Sociedad  
Española  
de **Ciencias**  
**Hortícolas**

**90**

**Septiembre 2022**

# **ACTA DE HORTICULTURA**

**Comunicaciones Técnicas  
Sociedad Española de  
Ciencias Hortícolas**

**X Congreso Nacional de  
Mejora Genética de Plantas**

**Editores:  
Rosa Ana Malvar  
Pedro Fiz Rocha**

**Pontevedra, 19-22 de septiembre 2022**

## 7. Análisis de la expresión génica de cinco enzimas involucradas en el pardeamiento del fruto tras el corte en manzano

F. J. Bielsa<sup>1</sup>, P. Irisarri<sup>1,2</sup>, J. Urrestarazu<sup>3</sup>, P. Errea<sup>1,2</sup>, C. Miranda<sup>3</sup>, L. G. Santesteban<sup>3</sup>, A. Pina<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Departamento de Ciencia Vegetal, Avenida Montañana 930, 50059, Zaragoza, España.

<sup>2</sup>Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2, CITA-Universidad de Zaragoza, Calle Miguel Servet, 177, 50013, Zaragoza, España

<sup>3</sup>Universidad Pública de Navarra, Departamento de Agronomía, Biotecnología y Alimentación, Campus de Arrosadía, 31006, Pamplona, España.

\*Autor para correspondencia: [fjbielsa@cita-aragon.es](mailto:fjbielsa@cita-aragon.es)

**Palabras clave:** Pardeamiento, *Malus x domestica Borkh.*, antioxidante, rutas metabólicas, RT-qPCR.

### RESUMEN

El pardeamiento enzimático del fruto en manzano (*Malus x domestica Borkh*) es un carácter agronómico no deseado que está controlado por un mecanismo molecular en el que intervienen diversas enzimas y que afecta directamente a su calidad. La creciente industria del fruto cortado en fresco demanda de frutos resistentes a pardeamiento de mayor calidad para el consumidor y adaptados a las condiciones que requiere su procesamiento. Este trabajo tiene como objetivo el esclarecimiento del mecanismo molecular asociado al pardeamiento y establecer su relación con cinco enzimas (PPO, PAL, SOD, CAT y APX) involucradas en este proceso que permitirá seleccionar las variedades con mejor respuesta. Para ello, se estudiaron los perfiles de expresión génica de 3 genotipos con diferente grado de susceptibilidad al pardeamiento en 6 tiempos de oxidación y dos tipos de pulpa (externa e interna) mediante Real-Time qPCR. Los genotipos con un grado medio y alto de susceptibilidad mostraron ‘foldchanges’ significativamente mayores a 24 horas para los genes de la ruta fenilpropanoide PPO y PAL que el genotipo con un grado bajo de susceptibilidad. Los perfiles de expresión de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y APX presentaron una tendencia estable con cambios menos notables en el transcurso del tiempo. Los resultados obtenidos en este trabajo han demostrado que el grado de susceptibilidad al pardeamiento enzimático es genotipo dependiente, así como la ausencia de un perfil de expresión general que justifique las diferencias fenotípicas y que, por tanto, apunta a que es un carácter controlado por diversos factores entre los que se encuentra la expresión de las enzimas señaladas en este trabajo.

### INTRODUCCIÓN

El pardeamiento enzimático es un carácter agronómico que merma la calidad del fruto en manzano (*Malus x domestica Borkh*). Tradicionalmente se ha descrito que los factores más importantes que determinan el grado de pardeamiento son: el número y concentración de PPO activas, la concentración de compuestos fenólicos, el pH, la temperatura y la disponibilidad de oxígeno en el tejido (Amiot et al., 1983). Sin embargo, algunos estudios recientes sugieren que las diferencias en la expresión de PPO entre genotipos con distinto grado de susceptibilidad al pardeamiento no son suficientes para

explicar las diferencias observadas en su fenotipo, y que se deben esclarecer los mecanismos moleculares responsables de este carácter (Tang et al., 2022).

Aumentar la disponibilidad y variedad de cultivos de gran calidad que sean resistentes al pardeamiento podría conllevar una expansión del mercado del manzano. Sin embargo, el pardeamiento del fruto es un proceso complejo que comprende varias rutas metabólicas y todavía no se conoce en su totalidad. Por tanto, el objetivo de este trabajo es identificar y entender las rutas metabólicas involucradas en el pardeamiento del fruto tras el corte para avanzar en el estudio precoz de este carácter.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Material vegetal**

Se seleccionaron 3 cultivares atendiendo al grado de susceptibilidad al pardeamiento determinado por análisis de imágenes digitales tomadas a diferentes tiempos (Miranda et al., 2021): ‘MA-117’ (muy susceptible al pardeamiento), ‘Pinova’ (medianamente sensible al pardeamiento) y ‘Golden Supreme’ (muy poco susceptible al pardeamiento). Se recogieron 10 frutos de estos cultivares de los que se cortaron rodajas de 1 cm de grosor y se dejaron a temperatura ambiente durante 24 horas. Se tomaron muestras de dos zonas diferenciadas (pulpa interna y pulpa externa) de las diferentes rodajas de cada variedad a 6 tiempos diferentes de oxidación tras el corte (0, 15, 30, 45, 60 min y 24 horas) y se congeló 1 gramo de este ‘pool’ de frutos a -80°C.

### **Extracción de ARN, síntesis de cADN y qPCR a tiempo real**

Las muestras congeladas fueron trituradas mecánicamente con mortero sumergidas en nitrógeno líquido, se extrajo el ARN utilizando el método CTAB-SEVAG y se resuspendió el pellet final en 30 µL de H<sub>2</sub>O DEPC. La cuantificación del RNA se realizó en un espectrofotómetro Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo scientific). La integridad del ARN extraído se comprobó con un gel de agarosa 1% (p/v). La eliminación del ADN genómico de las muestras se realizó siguiendo el protocolo del kit TURBO DNA-free kit (Invitrogen, Thermo Fisher scientific). La síntesis de cDNA se llevó a cabo utilizando el First Strand cDNA Synthesis kit, tomando las concentraciones obtenidas con el espectrofotómetro como medida de partida para obtener una concentración final por muestra de 50 ng/ µL de cDNA en 20 µL. El análisis de la expresión génica de 6 genes de referencia (housekeeping) candidatos (ACT, CKL, WD40, EF-1 $\alpha$ , GAPDH, PDI) y 5 genes clave en el pardeamiento del fruto (fenilalanina-amonio-liasa (PAL), polifenol oxidasa (PPO), superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX) y catalasa (CAT)) se realizó en un StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) con un ‘pool’ de 3 muestras biológicas, 5 réplicas técnicas por muestra y 10 ng de cDNA de cada muestra por reacción. La estabilidad de los genes de referencia fue analizada mediante el uso del software NormFinder siguiendo el protocolo establecido en Penna et al., (2011). La expresión génica de los genes de interés se analizó utilizando la fórmula GED, descrita en Schefe et al., (2006), la combinación de los genes housekeeping CKL-WD40 fue empleada como factor de normalización contra los valores de los genes de interés y se seleccionó el tiempo 0 de ‘Golden Supreme’ como calibrador de todos los genotipos.

### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico entre la expresión de los genes se realizó con el software SPSS v21.0. Se realizó un análisis de la normalidad con el test de Saphiro-Wilk y se evaluó la homogeneidad de varianzas con el test de Levene. Se utilizaron los test de Tukey y Tahmane T2 para evaluar las diferencias significativas entre genotipos y tiempos, así como los test de Welch y T-student para evaluar las diferencias entre pulpa externa y pulpa interna. Posteriormente se analizaron las relaciones entre los distintos genes utilizando el test de correlación de Pearson.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de la estabilidad de los genes de referencia reveló que la combinación de los genes CKL y WD40 presentó el mejor valor de estabilidad (0.082) de los 6 genes estudiados y sus posibles combinaciones. El ranking de estabilidad obtuvo un rango de valores de 0.082 (CKL-WD40) a 0.276 (ACT), siendo el valor más bajo el que representa la mayor estabilidad. Los resultados obtenidos de expresión génica de los genes de la ruta fenilpropanoide (PPO y PAL) mostraron una tendencia creciente para todos los genotipos estudiados. Si bien el nivel de expresión endógeno fue superior en ‘Golden Supreme, otros estudios en manzana han demostrado que la expresión génica de PPO no es siempre el único factor determinante del pardeamiento enzimático (Tang et al., 2020). Además, se observó que los cambios en la expresión fueron más pronunciados a tiempo 24 horas para ‘Pinova’ y ‘MA-117’, de tal forma que los genotipos con mayor susceptibilidad expresaron mayores niveles de los genes de la ruta fenilpropanoide (Fig. 1A). También se ha observado que existe una mayor expresión génica de ambos genes en pulpa externa en comparación con la encontrada en pulpa interna (Fig. 1A). Estos resultados concuerdan con los publicados por Wang et al., (2020) en un estudio sobre el pardeamiento enzimático en patata. Por otra parte, los genes involucrados en la respuesta antioxidante (SOD, CAT y APX) presentaron un perfil de expresión génica más estable, a excepción de APX que mostró cambios acentuados a distintos tiempos en ‘Golden Supreme’ y ‘MA-117’. Así mismo, se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión génica de CAT en los genotipos de susceptibilidad media y alta a pardeamiento enzimático, con mayores cambios de expresión en pulpa externa que en pulpa interna (Fig. 1B). El análisis estadístico de las relaciones entre los genes estudiados en los tiempos 30 y 60 min mediante el coeficiente de correlación de Pearson ha demostrado la existencia de correlaciones significativas. Para pulpa interna existe una correlación significativa positiva entre SOD y CAT ( $R = 0,95$ ,  $p = 0,004$ ), mientras que SOD y PAL mantienen una correlación significativa negativa ( $R = -0,92$ ,  $p = 0,008$ ). Para pulpa externa existe una correlación significativa positiva entre PPO y PAL ( $R = 0,89$ ,  $p = 0,016$ ) y entre SOD y APX ( $R = 0,90$ ,  $p = 0,014$ ).

En conclusión, el análisis de la expresión génica de las cinco enzimas estudiadas en este trabajo ha demostrado la existencia de cambios en los niveles de expresión significativos para los tres genotipos con distinta susceptibilidad al pardeamiento. La heterogeneidad observada en estos cambios en el nivel de expresión de los genes refleja la complejidad de los mecanismos moleculares subyacentes al pardeamiento enzimático, y que es necesario estudiar el contenido de polifenoles totales de cada genotipo y el papel que estos compuestos fenólicos pueden tener en la respuesta antioxidante.

## AGRADECIMIENTOS

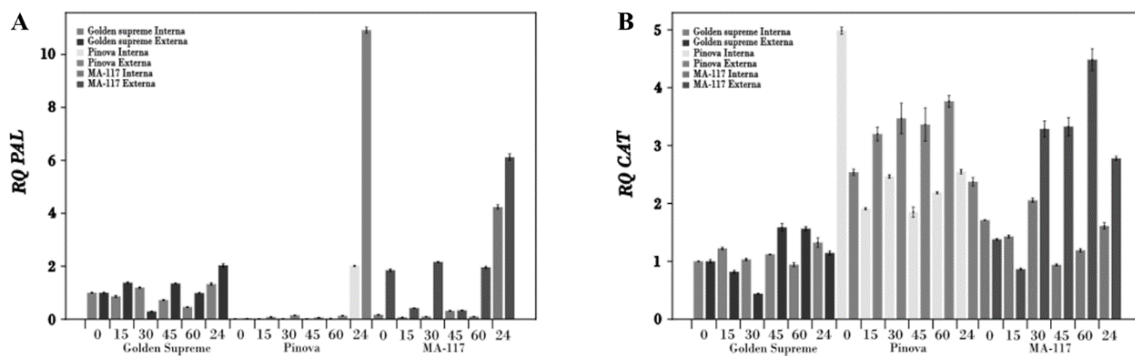
Este trabajo ha sido financiado por el proyecto PID 2019 108081 RR (financiado por MCIN/AEI 10 13039 501100011033 y por el Grupo consolidado A12 del Gobierno de Aragón – Fondo Social Europeo de la Unión Europea.

## REFERENCIAS

- Amiot MJ, Tacchini M, Aubert S, Nicolas J. 1992. Phenolic compounds and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. *J Food Sci.* 57, 4: 958-962.
- Miranda, C., Arellano, J., Irisarri, P., Navarro, J. A., Castel, L., & Errea, P. 2021. Fenotipado de la oxidación de la carne en manzana cortada mediante análisis de imagen. *Actas de Horticultura.* 86: 76–79.

- Penna, I., Vella, S., Gigoni, A., Russo, C., Cancedda, R., & Pagano, A. 2011. Selection of candidate housekeeping genes for normalization in human postmortem brain samples. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 9: 5461–5470.
- Scheffe, J. H., Lehmann, K. E., Buschmann, I. R., Unger, T., & Funke-Kaiser, H. 2006. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: Current concepts and the novel “gene expression’s C T difference” formula. *J. Mol. Med.* 84, 11: 901-910.
- Tang, T., Xie X., Ren, X., Wang, W., Tang, X., Zhang, J., Wang, Z. 2020. A difference of enzymatic browning unrelated to PPO from physiology, targeted metabolomics and gene expression analysis in Fuji apples. *J. Postharvest Biol. Technol.* 170.
- Wang, L., Wang, W. X., Zeng, L., Suo, H.C., Li, C. C., Shan, J. W., Liu, J. T., Luo, H. M., Li, X. B., Xiong, X. Y. 2020. Characteristics and differences of polyphenol oxidase, peroxidase activities and polyphenol content in different potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Appl Ecol Env Res.* 18, 6: 8171-8187.

## FIGURAS



**Figura 1.** Expresión relativa de las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL) (A) y catalasa (CAT) (B) para 'Golden Supreme', 'Pinova' y 'MA-117' a seis tiempos de oxidación tras el corte (0, 15, 30, 45, 60 min y 24h). En color claro, pulpa interna, en oscuro pulpa externa.