

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
Portada	
Dedicatoria	
Comisión evaluadora	
Agradecimientos	
Índice de contenidos.....	i
Índice de figuras.....	v
Índice de tablas.....	vi
Palabras claves.....	vii
Lista de abreviaturas.....	viii
RESUMEN.....	x
SUMMARY.....	xi
CAPÍTULO I	
Introducción general.....	1
1. Formulación del Marco Teórico.....	2
2. Antecedentes Generales.....	4
2.1. <i>Physalis peruviana</i> Linnaeus.....	4
2.2. Calidad de la fruta.....	11
2.3. Aroma.....	12
2.4. Maduración.....	14
2.5. Volátiles.....	15
2.5.1. Volátiles derivados de ácidos grasos.....	15
2.5.1.1. β -Oxidación.....	16
2.5.1.2. Lipoxigenasa (LOX).....	18
2.5.2. Volátiles derivados de aminoácidos.....	20
3. Planteamiento del Problema.....	22
4. Formulación de Hipótesis.....	22

	Pág.
5. Objetivos Generales y Específicos.....	22
5.1. Objetivo General.....	22
5.2. Objetivos Específicos.....	22
CAPÍTULO II	
Generación de aroma en frutos de <i>Physalis peruviana</i> L. Efecto del estado de madurez y disponibilidad de sustratos alcoholes.....	
	23
1. Introducción.....	24
1.1. Ésteres y actividad alcohol aciltransferasa (AAT).....	24
1.2. Importancia de compuestos volátiles en el aroma de frutos.....	27
1.2.1. Umbral odorífico (“odor threshold”).....	27
1.2.2. Índice odorífico o valor de actividad odorífica.....	28
2. Materiales y Métodos.....	28
2.1. Material vegetal.....	28
2.2. Parámetros de madurez y calidad.....	29
2.2.1. Determinación del color del fruto.....	29
2.2.2. Producción de etileno y tasa respiratoria.....	29
2.2.3. Medición de firmeza del fruto.....	30
2.2.4. Concentración de sólidos solubles, acidez titulable y pH.....	30
2.3. Análisis de compuestos volátiles por “headspace-SPME”.....	32
2.3.1. Determinación del valor de actividad odorífica (OV).....	33
2.4. Ensayos de actividad AAT.....	33
2.5. Suministro exógeno de sustratos.....	34
2.6. Análisis estadístico.....	35
3. Resultados.....	35
3.1. Cambios en los índices de madurez en frutos de goldenberry.....	35
3.2. Producción de volátiles durante la maduración de goldenberry.....	38
3.3. Actividad AAT durante la maduración de goldenberry.....	41

	Pág.
3.4. Ensayo de suministro exógeno de alcoholes.....	42
4. Discusión.....	50
CAPÍTULO III	
Aislamiento y actividad transcripcional del gen alcohol aciltransferasa (<i>PhpAAT1</i>) de <i>Physalis peruviana</i>	
	53
1. Introducción.....	54
1.1. Genes involucrados en la generación de aroma en goldenberry.....	54
1.2. Superfamilia BAHD de aciltransferasas.....	55
1.3. Análisis filogénico y predicción de actividad de aciltransferasas BAHD.....	56
2. Materiales y Métodos.....	57
2.1. Material vegetal.....	57
2.2. Extracción y purificación de ácidos nucleicos.....	57
2.2.1. Extracción de RNA.....	57
2.2.2. Síntesis de cDNA.....	58
2.2.3. Síntesis de RACE cDNA.....	59
2.3. Aislamiento de la secuencia completa de AAT de <i>P. peruviana</i>	60
2.4. Análisis de la secuencia <i>PhpAAT1</i>	62
2.5. Análisis de expresión por PCR en tiempo real (qPCR).....	62
2.6. Expresión heteróloga de <i>PhpAAT1</i>	64
2.6.1. Transformación de <i>Pichia pastoris</i>	65
2.6.2. Expresión y purificación de <i>PhpAAT1</i> recombinante.....	65
2.7. Análisis estadístico.....	66
3. Resultados.....	66
3.1. Aislamiento del gen <i>PhpAAT1</i> desde goldenberry.....	66
3.2. Comparación de secuencia y análisis de <i>PhpAAT1</i>	69
3.3. Análisis de expresión de <i>PhpAAT1</i> durante la maduración.....	74
4. Discusión.....	76

	Pág.
CAPÍTULO IV	
Discusión general y conclusiones.....	80
1. Discusión general.....	81
2. Conclusiones.....	88
3. Proyecciones.....	89
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
Material suplementario.....	114

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Imágenes de <i>Physalis peruviana</i> L.....	6
Figura 2. Frutos de <i>P. peruviana</i> ecotipo Colombia.....	9
Figura 3. Diagrama esquemático de la β -oxidación de ácidos grasos (A), y vía central de la β -oxidación de ácidos grasos en plantas (B).....	17
Figura 4. Formación de ésteres por acción de la enzima alcohol aciltransferasa (AAT).....	25
Figura 5. Frutos de <i>P. peruviana</i> en diferentes estados de maduración.....	31
Figura 6. Cambios en la producción de etileno, tasa respiratoria, firmeza y peso, durante el desarrollo de goldenberry.....	36
Figura 7. Cambios en la acidez titulable, contenido de sólidos solubles, y ángulo Hue (H°), durante el desarrollo de goldenberry.....	37
Figura 8. Gráfico de carga de los primeros dos componentes del PCA para volátiles producidos durante la maduración de goldenberry.....	45
Figura 9. Perfiles de producción de volátiles para cada Grupo de acuerdo al PCA, durante la maduración de goldenberry.....	46
Figura 10. Cambios en la actividad AAT durante la maduración de goldenberry.....	47
Figura 11. Secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida para PhpAAT1p	67
Figura 12. Electroforesis de productos obtenidos por RACE-PCR.....	68
Figura 13. Alineamiento de la secuencia nucleotídica <i>PhpAAT1</i> con el fragmento parcial PhpAAT1p.....	70
Figura 14. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de PhpAAT1 con AATs de flores y frutos de diferentes especies.....	71
Figura 15. Análisis filogénico de PhpAAT1.....	72
Figura 16. Análisis de expresión de <i>PhpAAT1</i> en frutos en diferentes estados de maduración y tejidos vegetativos.....	75
Figura 17. Análisis de clones transformantes de <i>Pichia pastoris</i>	91

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Concentración de principales volátiles producidos por goldenberry durante la maduración.....	43
Tabla 2. Umbrales odoríficos, valores de actividad y descripción aromática de compuestos identificados durante la maduración de goldenberry.....	44
Tabla 3. Concentración de compuestos volátiles producidos por frutos de <i>Physalis peruviana</i> L., después del tratamiento exógeno con alcoholes, relacionados con el alcohol suministrado.....	48
Tabla 4. Umbrales odoríficos, valores de actividad y descripción aromática de compuestos volátiles producidos por frutos de <i>Physalis peruviana</i> L., después del tratamiento exógeno con alcoholes.....	49
Tabla 5. Secuencias utilizadas en el alineamiento múltiple y análisis filogenico de AATs de diferentes especies.....	73
Tabla S1. Concentración de compuestos volátiles producidos por frutos de <i>Physalis peruviana</i> L., después del tratamiento exógeno con alcoholes.....	114

PALABRAS CLAVES

Alcohol aciltransferasa; aroma; compuestos volátiles; ésteres; goldenberry; maduración.

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>g</i>	Aceleración de gravedad
TA	Acidez titulable
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
LA	Ácido linoleico
LNA	Ácido linolénico
HPOD	Ácido 9-(<i>S</i>)- o 13-(<i>S</i>)-hidroperóxido octadecadienoico
HPOT	Ácido 9-(<i>S</i>)- o 13-(<i>S</i>)-hidroperóxido octadecatrienoico
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
ACX	Acil-CoA oxidasa
ATP	Adenosina trifosfato
AAT	Alcohol aciltransferasa
ADH	Alcohol deshidrogenasa
AOS	Aleno óxido sintasa
RACE-PCR	Amplificación rápida de los extremos de secuencias de cDNA por PCR
ACL	ATP-citrato liasa
CTAB	Bromuro de cetilmetilamonio
BrEt	Bromuro de etidio
CS	Citrato sintasa
FID	Detector de ionización de llama
DEPC	Dietil piricarbonato
DES	Divinil éter sintasa
CoA	Coenzima A
SSC	Concentración de sólidos solubles
CG	Cromatografía gaseosa
CG-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
ES	Error estándar de la media
AAM	Estado amarillo-anaranjado maduro
AM	Estado anaranjado maduro

VI	Estado verde inmaduro
VM	Estado verde maduro
Gf	Gramos-fuerza
HPL	Hidroperóxido liasa
CAT	L-3-cetoacil-CoA tiolasa
LOX	Lipoxigenasa
FAD	Flavín adenín dinucleótido
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
kDa	Kilodalton
ORF	Marco de lectura abierto
msnm	Metros sobre el nivel del mar
SPME	Microextracción en fase sólida
RAM	Microsatélites amplificados al azar
N	Newton
qPCR	PCR en tiempo real
Pb	Pares de bases
POX	Peroxigenasa
PF	Peso fresco
PDMS/DVB	Polidimetilsiloxano/divinilbenceno
MFPs	Proteínas multifuncionales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
5'-UTR	Región no traducida del extremo 5'
3'-UTR	Región no traducida del extremo 3'
RNAsa	Ribonucleasa
ICS	Síndrome de cáliz inflado
t_R	Tiempo de retención
Tris	Tris [hidroximetil] amino-metano