



INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTIVIDAD ALCOHOL ACILTRANSFERASA, EFECTO DE LA  
DISPONIBILIDAD DE SUSTRATOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE  
ÉSTERES EN FRUTOS DE *Physalis peruviana* L.**

RAFAEL ENRIQUE ZÚÑIGA HORMAZÁBAL

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS,  
MENCION INGENIERÍA GENÉTICA VEGETAL

DIRECTORA DE TESIS: Dra. María Alejandra Moya León

TALCA - CHILE

2018

## CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2019

*A mi familia, padres, hermanos e hijo*

ACTIVIDAD ALCOHOL ACILTRANSFERASA, EFECTO DE LA DISPONIBILIDAD DE SUSTRATOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ÉSTERES EN FRUTOS DE *Physalis peruviana* L.

ALCOHOL ACYLTRANSFERASE ACTIVITY, EFFECT OF SUBSTRATE AVAILABILITY ON ESTER PRODUCTION IN *Physalis peruviana* L. FRUIT

CANDIDATO A DOCTOR: Rafael Enrique Zúñiga Hormazábal

FECHA DE INICIO DE LA TESIS: 2011

FECHA DE TÉRMINO: 2017

PROFESORA GUÍA: Dra. María Alejandra Moya León, Universidad de Talca, Instituto de Ciencias Biológicas, Av. Lircay S/N, Talca, alemoya@utalca.cl

COMISIÓN DE EVALUACIÓN:

Dr. Simón Aurelio Ruiz Lara, Universidad de Talca, Instituto de Ciencias Biológicas.

Dr. Jorge Eduardo Villaseñor Fica, Universidad de Talca, Instituto de Química de Recursos Naturales.

Dr. Bruno Giorgio Defilippi Bruzzone, Instituto de Investigación Agropecuaria (CRI La Platina), Departamento de Mejoramiento y Biotecnología.

## AGRADECIMIENTOS

A través de las siguientes palabras deseo expresar mi agradecimiento a aquellas personas e instituciones que contribuyeron al desarrollo del trabajo de Tesis:

A la Universidad de Talca por el otorgamiento de la Beca Universidad de Talca y la Beca Reconstrucción, y al Proyecto Anillo del Programa Bicentenario de Ciencia y Tecnología, PBCT-Anillo (ACT-41), los cuales hicieron posible el financiamiento para la realización de esta Tesis Doctoral.

A la Dra. Alejandra Moya León, directora de la Tesis, por su confianza, constante dedicación, disposición y apoyo recibido durante todo el trabajo de Tesis.

Al Dr. Raúl Herrera, del Instituto de Ciencias Biológicas (ICB) por su constante apoyo para el desarrollo de la Tesis.

En forma muy especial a los integrantes de la comisión de tesis Dr. Bruno Defilippi, Dr. Jorge Villaseñor y Dr. Simón Ruiz quienes, con su análisis crítico, comentarios y sugerencias del trabajo aportaron de gran manera al escrito.

También merecen un reconocimiento importante, los integrantes del grupo de investigación del Laboratorio de Fisiología Vegetal y Genética Molecular, los compañeros del Programa de Doctorado en Ciencias Mención Ingeniería Genética Vegetal, y los profesores del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Talca.

Finalmente, al Instituto de Química de los Recursos Naturales de la Universidad de Talca, en especial al Dr. Iván Razmilic y Sergio Reyes por su disposición para facilitar el uso del GC-MS Clarus 6000.

## 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. $\beta$ -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
<b>CAPÍTULO III</b>	
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.
<b>CAPÍTULO IV</b>	
Discusión general y conclusiones.....	80
1. Discusión general.....	81
2. Conclusiones.....	88
3. Proyecciones.....	89
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>92</b>
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 $\beta$ -oxidación de ácidos grasos (A), y vía central de la $\beta$ -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 ( $H^\circ$ ), 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

## RESUMEN

Aroma y sabor son los atributos de calidad que afectan de manera más importante el consumo de frutas. La producción de compuestos volátiles que generan el aroma, es un factor determinante de la calidad sensorial de la fruta, y la aceptación del consumidor. La obtención y generación de información cualitativa y cuantitativa, que permita la caracterización de compuestos que producen aroma, es de gran relevancia para el mejoramiento y mantención de la calidad de la fruta. *Physalis peruviana* Linnaeus produce frutos climatéricos que se caracterizan por su sabor e intenso aroma, propiedades que se desarrollan durante la maduración. En frutos de *P. peruviana*, los ésteres representan un grupo de gran diversidad. Sin embargo, a pesar del creciente interés y demanda por goldenberry en los mercados internacionales, no existen estudios bioquímicos relacionados con la formación de ésteres durante la maduración, e información de enzimas implicadas en la generación del aroma en goldenberry. Mediante headspace-SPME fue posible identificar y cuantificar diferentes compuestos durante la maduración de goldenberry. Los compuestos dominantes fueron ésteres con abundante impacto en el aroma, siendo butanoato de etilo, acetato de etilo, butanoato de hexilo, butanoato de butilo, acetato de hexilo, y acetato de butilo los más abundantes en frutos maduros. Como los ésteres son los principales volátiles producidos por goldenberry y son sintetizados por la acción de la enzima alcohol aciltransferasa (AAT), se aisló un cDNA de largo completo (*PhpAATI*) de 1799 pb desde frutos de *P. peruviana*. La secuencia polipeptídica deducida de 440 aminoácidos, presentó los dominios característicos de la superfamilia BAHD: el motivo del sitio activo (HxxxD), y el motivo altamente conservado (DFGWG) localizado en el extremo carboxilo terminal de la enzima. El análisis filogenético indicó que *PhpAATI* está estrechamente relacionado con genes AAT de la familia III, cuyos miembros participan en la síntesis de compuestos volátiles en frutos. El análisis de qPCR mostró que *PhpAATI* se expresa de manera intensa en goldenberry en estado maduro, y es indetectable en tejidos vegetativos. En frutos, el incremento en la producción de compuestos de aroma durante la maduración es coincidente con el aumento en la acumulación de transcritos de *PhpAATI* y actividad AAT. El suministro de alcoholes reflejó que la producción de ésteres está limitada y determinada por la disponibilidad de precursores. Los resultados sugieren que el gen *PhpAATI* está involucrado en la biosíntesis de aroma en goldenberry, y la producción de ésteres depende de la actividad AAT y de la disponibilidad de sustratos.

## SUMMARY

Aroma and flavour are the most important attributes and quality criteria that affect the consumption of fruits. The production of volatile aroma compounds is an important factor determining the sensory quality of fruit and consumer acceptance. The generation of qualitative and quantitative information that allows the characterization of aroma compounds, is of great importance for the improvement and maintenance of fruit quality. *Physalis peruviana* Linnaeus produces a climacteric fruit characterized for having great aroma and flavor properties that develops during ripening. In *P. peruviana* fruits, esters represent a very diverse group of compounds. However, despite the growing interest and demand for goldenberry in the international market, there are no biochemical studies related to the formation of esters during ripening, and information of enzymes involved in the generation of aroma in goldenberry. Using headspace-SPME different volatile compounds were identified and quantified during the ripening of goldenberry. The headspace was dominated by esters with great aroma impact, being ethyl butanoate, ethyl acetate, hexyl butanoate, butyl butanoate, hexyl acetate, and butyl acetate the most abundant in fully ripe fruit. As esters are the main volatile compounds produced by goldenberry and are synthesized through alcohol acyltransferases (AAT), a full-length cDNA (*PhpAAT1*) of 1799 bp was isolated from *P. peruviana* fruit. The deduced polypeptide sequence of 440 amino acids displayed the characteristic domains of most BAHD superfamily plant acyltransferases: the active site motif (HxxxD) and the highly conserved motif located towards the C-terminal end (DFGWG). Phylogenetic analysis indicates that *PhpAAT1* gene is closely related to AAT genes belonging to subfamily III, whose members participate in the synthesis of volatile compounds in fruit. The transcript accumulation pattern provided by qPCR analysis showed that *PhpAAT1* gene was highly expressed in fruit at the ripe stage, and it was undetectable in vegetative tissues. An increase in the production of aroma-related esters was found during ripening of the fruit which is coincident with the increase in *PhpAAT1* transcript accumulation and AAT activity. In addition, the supply of alcohols reflected that the production of esters is limited and determined by the availability of precursors. These results suggest that *PhpAAT1* gene is involved in aroma biosynthesis in goldenberry fruit, and the production of esters dependent on the AAT activity and the availability of substrates.

# **CAPÍTULO I**

## **Introducción general**

## 1. FORMULACIÓN DEL MARCO TEÓRICO

Goldenberry, el fruto de *Physalis peruviana* Linnaeus, tiene potencial para convertirse en una fruta comercial de gran interés para la industria de alimentos a nivel mundial. La explotación agronómica del goldenberry es considerada una alternativa interesante de bayas nativas, para el consumo interno en Chile y su exportación. El interés comercial en este fruto ha ido incrementado durante los últimos años, principalmente debido a características propias y únicas del goldenberry. Es un fruto de alto valor nutricional, con alto contenido de vitaminas, minerales, compuestos antioxidantes, e interesantes propiedades medicinales. Goldenberry es particularmente apreciado por su sabor e intenso aroma, cualidades organolépticas que facilitan su comercialización en fresco, principal forma de exportación.

Un aspecto de gran importancia para la comercialización de un fruto en fresco y de buena calidad, es la mantención de sus características organolépticas y nutricionales durante la post-cosecha. El sabor y específicamente, los compuestos volátiles que constituyen el aroma del fruto, son factores importantes que determinan la calidad sensorial de la fruta y la aceptación del consumidor. La síntesis de volátiles de aroma está asociada con la maduración del fruto. Durante la maduración, cambios moleculares y bioquímicos llevan a modificaciones físicas del fruto, que incluyen la generación de volátiles de aroma, el desarrollo del sabor, cambios de color y ablandamiento. Por lo tanto, es importante conocer los eventos moleculares que tienen lugar durante el desarrollo y maduración de goldenberry, de manera de poder conseguir un fruto de buena calidad sensorial.

Los constituyentes volátiles de goldenberry han sido caracterizados solo en frutos maduros. Sin embargo, la dinámica y el perfil de volátiles de aroma durante la maduración aún se desconocen. Considerando que la intensidad aromática de goldenberry ha sido escasamente investigada, resulta de gran interés determinar la dinámica de producción de volátiles durante el crecimiento y desarrollo de goldenberry. Entender la formación y evolución de los compuestos volátiles de aroma es esencial para poder asegurar y favorecer la conservación de la calidad de los frutos.

La fruta de consumo en fresco es sometida a diferentes condiciones y tratamientos que retrasan o detienen el avance de madurez, empleados para preservar la calidad de la fruta, extender la vida de post-cosecha y optimizar la calidad comercial. Sin embargo, estos tratamientos afectan la producción de compuestos volátiles y, por ende, alteran la calidad organoléptica final del fruto. Por lo tanto, es interesante examinar algunos de los factores que pueden influir en la producción de estos compuestos, con la finalidad de obtener un producto de calidad disponible por un mayor período de tiempo en el mercado. Es importante entonces poder identificar volátiles de alto impacto sensorial, las rutas metabólicas involucradas en su síntesis, y la caracterización y regulación de los genes que participan en éstas.

El presente trabajo de tesis doctoral, pretende generar información con respecto a la biosíntesis de aroma en goldenberry, principalmente en términos de conocer la dinámica de producción de los diversos compuestos volátiles durante la maduración. Dada la importancia que tienen los ésteres por su alto impacto para el aroma, este trabajo se ha enfocado en examinar el paso final en la biosíntesis de ésteres, que es catalizado por la enzima alcohol aciltransferasa (AAT). Se aísla el gen que codifica para AAT desde *P. peruviana* y se realiza caracterización de éste.

## 2. ANTECEDENTES GENERALES

### 2.1. *Physalis peruviana* Linnaeus

*Physalis peruviana* L., conocida comúnmente como goldenberry, cape gooseberry ó uchuva, es una planta que pertenece a la familia Solanaceae y género *Physalis*. El género *Physalis* es uno de los géneros más grandes de las Solanáceas e incluye aproximadamente 120 especies. La mayoría de las especies están distribuidas principalmente en América del Sur y América del Norte, y un número pequeño de especies encontradas en Europa y Asia [Ahmad et al., 1999; Sullivan, 2004; Fang et al., 2009; 2012].

El género *Physalis* es originario de las regiones tropicales y subtropicales de América, y actualmente, las especies cultivadas y las silvestres están distribuidas ampliamente por todo el mundo. Las especies del género *Physalis* varían considerablemente en su arquitectura general, desde formas arbustivas bajas a formas arborescentes altas [Benda et al., 2009]. Presentan plasticidad en respuesta a la densidad de la vegetación y luz que las rodea. Sin embargo, las formas descritas anteriormente predominan en las poblaciones naturales. La alta variación de las características morfológicas se ha usado para identificar las especies del género *Physalis* [Menzel, 1951; Axelius, 1996; Martínez, 1998; Vargas-Ponce et al., 2011].

El género *Physalis* incluye herbáceas anuales o perennes de vida corta, poseen hojas simples y flores hermafroditas con forma de campana. La corola es tubular de color amarillo y presenta puntos oscuros, púrpuras o marrones-violáceos, en la base de los pétalos. Sin embargo, la característica más importante del género es un cáliz acrescente formado por cinco sépalos, que envuelve completamente al fruto hasta la madurez. En el género *Physalis*, los sépalos reanudan el crecimiento después de la polinización para encapsular el fruto, formando la estructura conocida como “lámpara China”, carácter formalmente llamado “síndrome de cáliz inflado” (ICS) [He et al., 2004; He & Saedler, 2005]. El cáliz, que cubre y protege al fruto contra insectos, aves, patógenos y condiciones climáticas extremas, se asemeja a las lámparas de papel chinas, característica que hace de *Physalis* uno de los géneros más fáciles de reconocer dentro de la familia Solanaceae.

Diferentes especies del género, son recolectadas desde sus poblaciones silvestres con fines de investigación biomédica. Estas especies producen un variado grupo de lactonas esteroidales de 28 átomos de carbono denominados withanólidos, los cuales exhiben un amplio espectro de propiedades biológicas y actividad farmacológica [Glotter, 1991]. Estos compuestos presentan actividad antibiótica, antitumoral, anti-inflamatoria, hepatoprotectora, e inmunomoduladora [Glotter, 1991]. Ecológicamente, los withanólidos exhiben propiedades contra la herbivoría, actúan como insecticida y repelente de insectos [Glotter, 1991; Waiss et al., 1993]. La mayoría de los withanólidos son producidos por Solanáceas, y el género *Physalis* (14 especies) es el que presenta la mayor variedad de compuestos, con más de 10 tipos estructurales [Calderón et al., 2012; Zhang et al., 2012]. Particularmente, en *P. peruviana*, se han encontrado withanólidos en diferentes partes de la planta, mientras que en otras especies estos son órgano específico [Baumann & Meier, 1993; Ahmad et al., 1999], lo cual ha aumentando el interés en este género y sus productos durante la última década.

El género *Physalis* incluye un grupo de especies de importancia hortícola y económica, principalmente asociado al alto valor nutritivo, contenido de vitaminas, minerales y antioxidantes, así como potenciales propiedades medicinales de sus frutos. De estas especies, tres son cultivadas por sus bayas: *P. peruviana* L., goldenberry; *P. pruinosa* L., la cereza de tierra; y *P. ixocarpa* Brot., el tomatillo de México. *P. peruviana* es la especie que produce un fruto de exportación, que ha llegado a ser ampliamente conocido en los mercados internacionales. *P. peruviana* es también cultivada como planta medicinal, ampliamente utilizada en la medicina popular para el tratamiento de cáncer, malaria, asma, hepatitis, dermatitis y reumatismo [Wu et al., 2004; Franco et al., 2007; Yen et al., 2010].

Descrita por primera vez por Linnaeus en 1753, *P. peruviana* se ha cultivado durante décadas a lo largo de la Cordillera de los Andes. Es un arbusto nativo de América del Sur, donde crece de forma silvestre en zonas tropicales altas, entre los 1500 y 3000 metros sobre el nivel del mar (msnm) [Mayorga et al., 2001; Salazar et al., 2008]. Hoy en día, *P. peruviana* se ha introducido ampliamente como cultivo en zonas subtropicales, cálidas y regiones templadas.

*P. peruviana* es una planta herbácea, perenne, que cultivada alcanza hasta el metro y medio de altura. *P. peruviana* posee hojas simples acorazonadas, y flores con forma de campana de color amarillo con manchas púrpura en la base de los pétalos (**Figura 1**). Las flores son fácilmente polinizadas por insectos, el viento, o autopolinizadas [Gupta & Roy, 1981]. *P. peruviana*, es una planta alógama, de propagación sexual, que presenta una gran variabilidad morfológica y fenotípica en sus cultivos, razón por la cual, las características de la fruta y los tiempos de cosecha presentan una alta heterogeneidad [Mazorra et al., 2006].



**Figura 1.** Imágenes de *Physalis peruviana* L. Cultivo comercial de *P. peruviana* ecotipo Colombia localizado en Huaquén, Región del Maule, Chile (35° 05' S; 71° 41' O; 87 msnm) (**A**); Flor y fruto en su cáliz (**B**); Ampliación de la flor de *P. peruviana* (**C**).

*P. peruviana* ha sido clasificada en ecotipos, plantas de diferentes regiones o países, las cuales son diferenciadas por el tamaño, color y sabor del fruto que producen, la forma de la flor y del cáliz, la altura y tamaño de la planta. Tres ecotipos de *P. peruviana* son los más cultivados actualmente, los procedentes desde Colombia, Kenia y Sudáfrica [Puente et al., 2011]. El ecotipo Colombia o genotipo Sylvania [Criollo et al., 2014] se caracteriza por sus frutos de colores más vivos, mayor contenido de azúcar e intenso aroma [Criollo et al., 2014],

comparado con los ecotipos Kenia y Sudáfrica. Estas características hacen de los frutos del ecotipo Colombia o genotipo Silvania, los más sabrosos y de mayor demanda en los mercados internacionales [Balaguera-López et al., 2016].

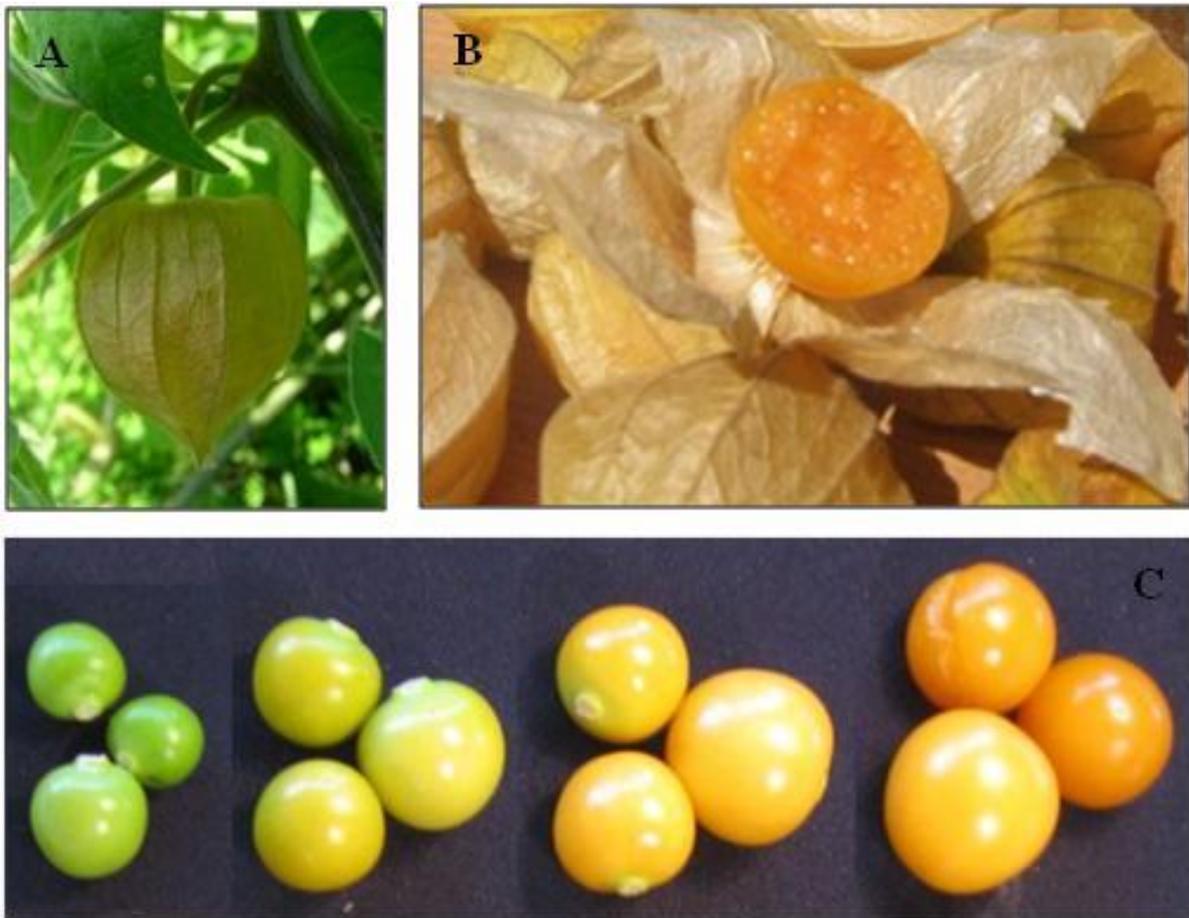
A pesar del creciente interés en *P. peruviana*, el conocimiento de su diversidad genética es escaso. Las colecciones mantenidas en bancos de germoplasma, solo han sido evaluadas de forma parcial, principalmente mediante el estudio de caracteres morfológicos y agronómicos [Trillos et al., 2008]. Aunque se ha reportado que *P. peruviana* es una especie diploide con un complemento cromosómico  $2n = 2x = 48$  [Menzel, 1951] y un tamaño del genoma de 1410,77–1985,34 Mb [Liberato et al., 2014; García-Arias et al., 2018], diferentes números de cromosomas pueden existir entre genotipos, ya que  $2n = 24$  se ha reportado para ecotipos silvestres,  $2n = 32$  para el ecotipo Colombia, y  $2n = 48$  para el ecotipo Kenia [Rodríguez & Bueno, 2006; Simbaqueba et al., 2011]. La diversidad genética de *P. peruviana* a nivel molecular ha sido escasamente estudiada, existiendo los reportes en el cual utilizan la técnica de marcadores basados en microsatélites RAM (microsatélites amplificados al azar) [Muñoz et al., 2008] y genotipificación por secuenciación (GBS) [García-Arias et al., 2018] para evaluar la diversidad genética y la estructura de la población. En dichos estudios se encontró una alta heterocigocidad, variabilidad fenotípica y diversidad genética en los individuos y poblaciones analizadas [Muñoz et al., 2008; García-Arias et al., 2018].

El cultivo de *P. peruviana* no requiere cuidados especiales, es una especie adaptable a diferentes tipos de suelos, y crece fácilmente desde semillas o estacas. Una planta de *P. peruviana* puede producir hasta 300 frutos, y cultivos con plantas bien mantenidas producen alrededor de 20–33 toneladas de fruta por hectárea [Ramadan & Mörsel, 2003]. Conjuntamente, la productividad de *P. peruviana* en suelos pobres, su fácil cultivo, y la baja necesidad de agua y fertilizantes [McCain, 1993] han hecho de *P. peruviana* un cultivo comercial muy atractivo durante los últimos años, especialmente para los exportadores de fruta fresca.

*P. peruviana* produce un fruto tropical, climatérico [Trincheró et al., 1999; Majumder & Mazumdar, 2002; Gutiérrez et al., 2008; Valdenegro et al., 2012], exótico y particularmente delicioso. Similar en forma y estructura a un tomate. El fruto de *P. peruviana*, goldenberry, es una baya jugosa, carnosa, de color amarillo-anaranjado cuando está maduro, con un diámetro de 1,2 a 2,5 centímetros y un peso promedio de 5 gramos. La pulpa es suave y contiene numerosas semillas pequeñas (**Figura 2**). La piel es delgada, suave y brillante [Mayorga et al., 2001].

El goldenberry está completamente cubierto por un cáliz (**Figura 2**) que lo protege durante su desarrollo y maduración, de las condiciones ambientales desfavorables. El cáliz, libera sustancias producidas en tejidos glandulares situados en la base de éste, cuya función es repeler el ataque de insectos [Mazorra et al., 2006].

Goldenberry es un fruto dulce con un ligero y equilibrado sabor ácido cuando está maduro, y un aroma exótico muy apreciado en los mercados europeos, particularmente en Francia y Alemania [Mayorga et al., 2001]. Goldenberry, contiene altos niveles de provitamina A, vitamina C, vitaminas del complejo B, y minerales esenciales como hierro y fósforo [Sarkar & Chattopadhyay, 1993], además de  $\beta$ -carotenos, ácidos grasos poli-insaturados y withanólidos [Baumann & Meier, 1993; Trincheró et al., 1999; Ramadan, 2011a]. Sin embargo, estudios recientes han determinado que el contenido de compuestos fenólicos, ácido ascórbico y las propiedades antioxidantes de goldenberry, varían entre los cultivares, con el tiempo de cosecha y el estado de madurez del fruto [Bravo et al., 2015]. Su aceite es rico en ácidos grasos esenciales, fitoesteroles, carotenos, vitaminas liposolubles y tocoferoles [Ramadan & Mörsel, 2003; Ramadan, 2011b].



**Figura 2.** Frutos de *P. peruviana* ecotipo Colombia o genotipo Sylvania. Goldenberry al interior de su cáliz (A); Corte de goldenberry maduro (B); y Bayas en diferentes estados de maduración sin cáliz (C).

Entre las principales características del goldenberry desatacan su excelente calidad nutricional y de antioxidantes. Otra de las bondades de goldenberry es su gran duración a temperatura ambiente una vez cosechado. Sin estar afectado directamente por el sol, goldenberry tiene una durabilidad de aproximadamente 25 días, sin grandes alteraciones. Puede ser almacenado en contenedores sellados y mantenido en atmósfera seca o congelado por varios meses [Ramadan & Mörsel, 2003]. Sin embargo, goldenberry es un fruto climatérico que presenta una tasa respiratoria y biosíntesis de etileno extremadamente alta

[Trincherero et al., 1999], lo cual resulta en un rápido deterioro y corta vida de anaquel. La vida en anaquel de goldenberry con cáliz es de un mes, mientras que sin cáliz es de 4 a 5 días [Puente et al., 2011].

El mayor valor de mercado para goldenberry es en fresco o elaborados que mantienen su forma intacta, es decir, debe tener su cáscara lisa, sin manchas, golpes, cortes ni picaduras; lucir fresco y tener buen aroma. Goldenberry se puede consumir en fresco, principal forma de exportación, o procesado como fruta congelada, jugos, néctar, pulpa, mermeladas, conservas y deshidratado. Es un ingrediente muy atractivo en salsas para carnes, ensaladas de frutas y vegetales, cócteles y licores. Diferentes especialidades gourmet lo utilizan fresco o seco en salsas, tortas y como decoración de platos especiales. Agroindustrialmente goldenberry se utiliza en la producción de vinos y lácteos a base de fruta, específicamente yogurt.

Durante los últimos años, el interés comercial por goldenberry ha incrementado significativamente. El mercado internacional ha mostrado una demanda creciente por alimentos exóticos, y en especial por aquellos productos con un elevado valor nutricional. Se ha incrementado la exportación de goldenberry desde países como: Colombia, Kenia, Sudáfrica, Egipto, Zimbabue, Madagascar, Malasia y China, destacando Colombia como uno de los mayores productores y exportadores de goldenberry a nivel mundial [Novoa et al., 2006], seguido de Sudáfrica [Mazorra et al., 2006; Salazar et al., 2008]. Anualmente, Colombia produce 11500 toneladas (ton) de goldenberry [Puente et al., 2011], siendo Europa el principal destino de exportación.

Actualmente, Colombia es el mayor productor de goldenberry a nivel mundial. Si bien, en Colombia existe una gran variedad de genotipos silvestres y ecotipos reintroducidos de África [Trillos et al., 2008], el más cultivado corresponde al ecotipo Colombia o genotipo Sylvania [Criollo et al., 2014], el cual presenta una alta demanda en los mercados internacionales con ventas totales de USD\$ 25,9 millones reportadas el año 2017 [Agronet, 2017]. El área de producción comercial de goldenberry el año 2012 fue de 749 hectáreas (ha) con un rendimiento de 15000 ton durante el 2013 [Osorio-Guarín et al., 2016]. A nivel

mundial el cultivo de goldenberry es cercano a las 30622 ha con un rendimiento de 162386 ton [Faostat, 2013].

En Chile, el cultivo de goldenberry al año 2010 contaba con alrededor de 5,5 ha cultivadas, concentrándose la producción en las regiones IV, V, VI y VII [Prochile, 2011]. Se estima que el rendimiento promedio nacional de *P. peruviana* es de 6 ton ha<sup>-1</sup>. Las exportaciones de este producto son muy pocas, siendo Japón el principal país comprador, en donde alcanza un precio promedio de USD\$ 5,66/kg [Fisher et al., 2014].

## 2.2. Calidad de la fruta

Tradicionalmente la definición de calidad de la fruta se ha basado en características externas, tales como: tamaño, color y ausencia de defectos. Sin embargo, el consumidor actual, además de estos parámetros de calidad, exige fruta libre de aditivos, con una mayor calidad nutricional, con óptimas características organolépticas, y con un mayor periodo de vida útil. Así consideramos la calidad como “todas las características de un alimento, que llevan al consumidor a estar satisfecho con el producto” [Cardello, 1995]. Definir y evaluar todas las características en la fruta, se hace complejo y frecuentemente se realiza de forma subjetiva. No obstante, diversos estudios con diferentes frutos han establecido algunos atributos que son determinantes en la aceptación de la fruta por parte del consumidor, tales como: la textura, el dulzor, la acidez y el sabor de la fruta. Ellos son determinados por la firmeza, el nivel de azúcares, el contenido de ácidos orgánicos, y el perfil de compuestos volátiles, respectivamente.

Los frutos son una rica fuente de vitaminas, minerales, antioxidantes y fibras, atributos que otorgan calidad a la fruta. El mejoramiento o mantención de la calidad del fruto beneficia tanto al consumidor como al productor, al reducir las pérdidas comerciales. Para goldenberry el mayor valor de mercado es en fresco o elaborados que mantienen su forma y preservan su intenso aroma. El índice de calidad de goldenberry es proporcionado por cuatro aspectos principales: apariencia, firmeza, sabor y valor nutricional. La apariencia considera la uniformidad en cuanto a color, tamaño, forma y ausencia de defectos. A su vez, el sabor

involucra el contenido de sólidos solubles, la acidez titulable, y el tipo y concentración de compuestos volátiles de aroma. El valor nutricional del goldenberry estaría dado principalmente por el contenido de vitaminas, minerales y  $\beta$ -carotenos. Donde el perfil de carotenoides en goldenberry (carotenoides en forma libre y esterificada) ha sido determinado en frutos en estados de maduración; verde, maduro y sobremaduro, así como en piel, pulpa y cálices de frutos maduros [Etzbach et al., 2018].

### 2.3. Aroma

El aroma es una mezcla compleja de un gran número de compuestos volátiles que contribuyen a la calidad sensorial de las frutas, la cual es específica para cada especie y cultivar [Dixon & Hewett, 2000]. Los compuestos corresponden a alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos y ésteres de bajo peso molecular encontrados en el vapor y tejido de la fruta [Rowan et al., 1999; Dixon & Hewett, 2000]. De estos compuestos, algunos están presentes en muy bajas concentraciones, pero contribuyen de forma potente a las características típicas del aroma (ej. butanoato de 2-metil etilo en aroma/sabor de manzanas), otros contribuyen a la intensidad del aroma (ej. *trans*-2-hexenal) o están relacionados con la calidad del aroma (ej. etanol) [Dixon & Hewett, 2000]. La contribución de cada compuesto al perfil de aroma de una especie y cultivar específico, depende de su umbral odorífico (concentración mínima de un compuesto detectado por olfato) y de su concentración. La concentración de un determinado compuesto volátil depende de la actividad de las enzimas encargadas de su biosíntesis, de la especificidad de sustrato de ellas y de la disponibilidad de sustratos [Fellman et al., 1993; Rizzolo et al., 2006]. El perfil final del aroma de un fruto es el resultado de un fino balance entre todos los compuestos emitidos y, por consiguiente, cualquier cambio en este balance resultará en cambios en el sabor de la fruta [Lara et al., 2006].

Para estudiar el aroma de una fruta es, por lo tanto, necesario conocer no solamente la naturaleza de los constituyentes sino cómo éstos cambian en tipo y concentración durante el desarrollo y maduración del fruto. También es importante comprender como cada constituyente es sintetizado y metabolizado.

Los compuestos volátiles producidos por goldenberry se han estudiado utilizando procedimientos de extracción líquido/líquido, seguido por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa, sólo en homogenizados y pulpa de frutos completamente maduros. Los volátiles neutros más abundantes en goldenberry son benzoato de metilo, cinamato de metilo, hexadecanoato de metilo, decanoato de metilo, metil bencil éter y 2,5-dimetil-4-metoxi-3(2H)-furanona [Berger et al., 1989]. Los ésteres de los ácidos benzoico, salicílico y ácido cinámico son los volátiles aromáticos más comunes en el fruto [Berger et al., 1989; Latza et al., 1996]. Entre los volátiles determinados se han identificado algunos compuestos de impacto odorífero, tal como 2-metilbutanoato de metilo (frutoso), 2,5-dimetil-4-hidroxi-3(2H)-furanona (almendra tostada) y su 4-metoxi derivado, 4-octanolido (coco) y 5-octanolido (dulce-nuez),  $\beta$ -ionona (violeta), y  $\beta$ -damascenona (similar a frambuesa) [Berger et al., 1989].

En goldenberry, además, de presentar compuestos terpenoides, se han descrito diferentes volátiles unidos con azúcares, glucósidos, específicamente alcoholes unidos, los que se han detectado indirectamente después de hidrólisis enzimática de los glucósidos, encontrando altas concentraciones de los glucósidos de alcohol bencílico y bajas concentraciones para glucósidos de alcoholes alifáticos [Berger et al., 1989]. También se ha aislado el volátil derivado del ácido cinámico, 1-*O-trans*-cinamoil- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranososa en frutos homogenizados de *P. peruviana* [Latza et al., 1996].

Aunque goldenberry, es altamente apreciado por su intenso aroma, hasta la fecha solo existen los reportes de Berger et al. [1989], Mayorga et al. [2001, 2002], y Yilmaztekin [2014b] relacionados con volátiles de aroma. Determinaciones de compuestos volátiles realizadas mediante extracción líquido/líquido [Berger et al., 1989; Yilmaztekin, 2014b], headspace dinámico [Ramadan et al., 2015], técnicas de SPME [Yilmaztekin, 2014a; Dymerski et al., 2015; Kupska et al., 2016] y el uso de extracción en tubo (ITEX) para el análisis de volátiles [Kupska & Jelen, 2017]. Sin embargo, solo algunas publicaciones reportaron datos cuantitativos de los compuestos volátiles determinados [Yilmaztekin, 2014a; Dymerski et al., 2015; Kupska & Jelen, 2017], así como el uso semicuantitativo del porcentaje de área relativo [Ramadan et al., 2015; Yilmaztekin, 2014a]. Y no hay registros sobre la

generación de éstos durante la maduración. Por lo tanto, estudiar la generación de aroma y las rutas de biosíntesis involucradas durante la maduración de goldenberry, es de gran interés considerando las características aromáticas que posee este fruto.

#### 2.4. Maduración

La maduración es un proceso complejo, genéticamente programado, que culmina en cambios de color, textura, sabor y aroma de la fruta. Debido a la importancia económica de las especies frutales, este proceso ha sido estudiado a nivel fisiológico, bioquímico y molecular [Wang et al., 2002]. Clásicamente, los frutos se han clasificado de acuerdo a su patrón de maduración en dos grupos: frutos climatéricos, en los cuales el proceso de maduración se caracteriza por un aumento de la tasa respiratoria y la biosíntesis de etileno, y frutos no climatéricos en los cuales la tasa respiratoria no experimenta cambios notorios durante la maduración y la producción de etileno permanece a muy bajo nivel [Giovannoni, 2004].

En frutos climatéricos como tomate, manzana, pera, duraznos y plátano, entre otros, el etileno induce y coordina el proceso normal de maduración. Es así como, al inhibir la síntesis de etileno en frutos transgénicos, o al bloquear su percepción, se produce un retraso de la maduración [Ayub et al., 1996; Fan et al., 1999; Watkins & Miller, 2005]. Si bien, etileno es la hormona que gatilla la maduración en frutos climatéricos, se ha sugerido la coexistencia de vías de regulación génica dependientes e independientes de etileno, y regulación dual [Flores et al., 2002]. Cambios en la acumulación de azúcares y síntesis de carotenoides durante la maduración, son independientes de etileno. El proceso de ablandamiento, la degradación de clorofila en la piel de la fruta y la regulación de enzimas como alcohol aciltransferasa, presentan una regulación dual, dependiente e independiente de etileno [Flores et al., 2002].

El desarrollo del aroma es aparentemente un proceso dependiente de etileno o al menos algunas etapas del proceso estarían moduladas por su acción. La existencia de una relación directa entre la acción de etileno y componentes del desarrollo de aromas se ha demostrado en frutos como melón y manzanas [Bauchot et al., 1998; Mir et al., 1999; Fellman et al., 2000].

## 2.5. Volátiles

Los volátiles de plantas son moléculas que cumplen múltiples funciones en órganos florales y vegetativos, así como también variadas funciones ecológicas [Pichersky & Gershenzon, 2002]. Los volátiles de aroma se componen de al menos cinco clases de compuestos químicos, los que derivan de diversos metabolitos primarios [Pichersky et al., 2006], por lo que hay varias vías de síntesis involucradas que no han sido totalmente descritas, pero parecen ser comunes para diferentes frutos [Dixon & Hewett, 2000]. Otro aspecto importante de la biosíntesis del aroma es la disponibilidad de sustratos, los cuales son altamente regulados en términos de cantidad y composición durante el desarrollo de la fruta [Song & Bangerth, 2003].

### 2.5.1. Volátiles derivados de ácidos grasos

Los ácidos grasos y lípidos son importantes constituyentes estructurales y metabólicos de la célula vegetal. Son componentes esenciales de membranas, importantes para la función ordenada y compartimentalizada de la mayoría de las reacciones químicas que tienen lugar en una célula [Song & Bangerth, 2003]. Además, de sus funciones estructurales, los ácidos grasos y lípidos sirven como precursores de importantes sustancias reguladoras (jasmonatos, fosfoinosítoles) y volátiles de aroma. Para los últimos, los ácidos grasos libres o aquellos liberados por la actividad de lipasas y posteriormente metabolizados por enzimas de la  $\beta$ -oxidación y/o el sistema lipoxigenasa, son los principales precursores de aldehídos, alcoholes y ésteres [Brackmann et al., 1993; Rowan et al., 1999; Schwab et al., 2008; Contreras et al., 2016; Shi et al., 2018] producidos en la mayoría de los frutos durante el desarrollo y maduración [Dixon & Hewett, 2000; Fellman et al., 2000]. En fruta intacta los ácidos grasos son metabolizados en general mediante  $\beta$ -oxidación, mientras en tejido homogenizado por lipoxigenasas.

Los ácidos grasos son los precursores de la mayoría de los ésteres de cadena lineal, pero su origen (metabolismo de lípidos y/o biosíntesis *de novo*) aún no está bien definido.

Investigaciones en manzanas sugieren que, la baja capacidad para la biosíntesis de ácidos grasos precursores puede ser un factor limitante para la producción de ésteres en fruta inmadura [Song & Bangerth, 1994; Bangerth et al., 1998].

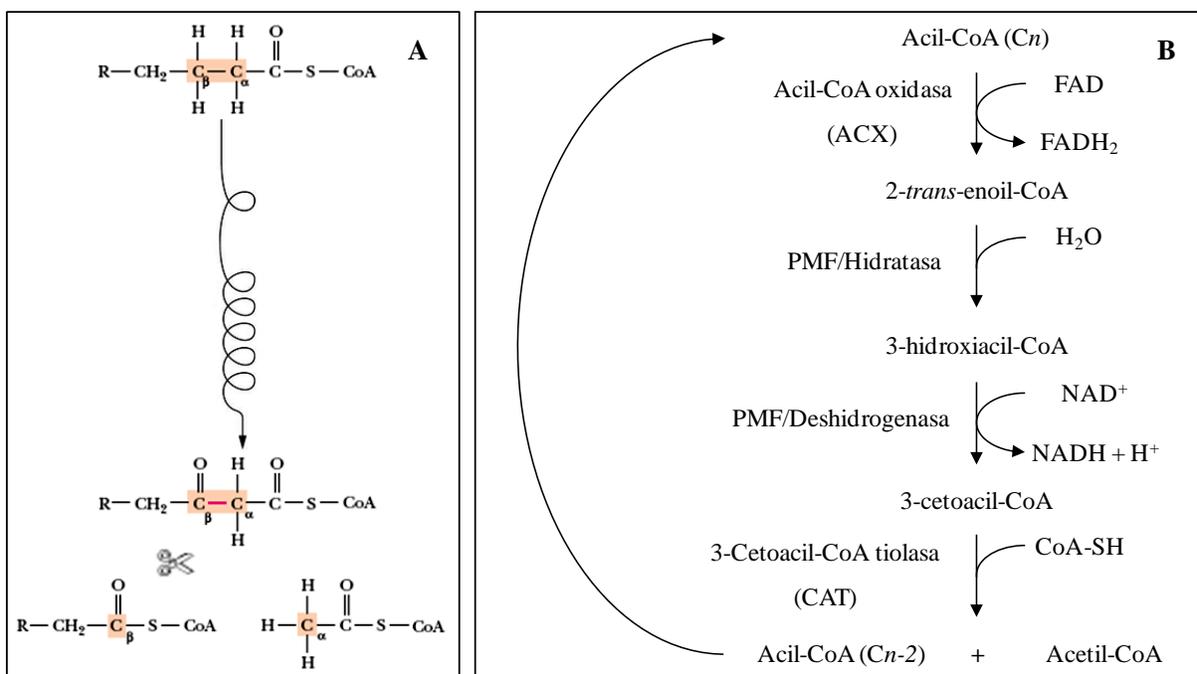
La relevancia del metabolismo de ácidos grasos para la producción de aroma se ha evidenciado por el desarrollo anormal de aroma en manzanas ‘Fuji’ [Lara et al., 2006], ‘Mondial Gala’ [Lara et al., 2007] y peras ‘Doyenne du Comice’ (*Pyrus communis* L.) [Lara et al., 2003] almacenadas en atmósfera controlada, después de transferirlas desde hipoxia al aire, condiciones de almacenaje que inhiben la actividad LOX. Esto sugiere que una reducida oxidación de ácidos grasos explicaría la falta de precursores para la producción de ésteres. Ello hace su estudio interesante y necesario si se desea mejorar la producción de aromas en diferentes especies o para realizar intervención biotecnológica en el tema.

#### 2.5.1.1. $\beta$ -Oxidación

La degradación de ácidos grasos en la mayoría de los organismos ocurre principalmente por  $\beta$ -oxidación. En mamíferos, tiene lugar en mitocondrias y peroxisomas, mientras que en plantas se presenta solo en peroxisomas [Poirier et al., 2006] durante el crecimiento y desarrollo de plantas, semillas en germinación y crecimiento post-germinativo [Baker et al., 2006; Goepfert & Poirier, 2007; Pracharoenwattana & Smith, 2008]. La  $\beta$ -oxidación peroxisomal tiene una participación fundamental en el catabolismo de lípidos de reserva, proporcionando energía metabólica y esqueletos carbonados durante los procesos de germinación, senescencia y estrés [Hooks et al., 1995]. Presenta, además, una función constitutiva en el recambio de lípidos de membrana y síntesis de moléculas señales derivadas de ácidos grasos como ácido jasmónico [Wasternack & Parthier, 1997].

La  $\beta$ -oxidación en plantas involucra la participación de enzimas de tres familias génicas, las cuales componen el centro de la  $\beta$ -oxidación: (i) acil-CoA oxidasas (ACX), (ii) proteínas multifuncionales (MFPs), que exhiben actividad 2-*trans*-enoil-CoA hidratasa, L-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, D-3-hidroxiacil-CoA epimerasa y  $\Delta^3, \Delta^2$ -enoil-CoA

isomerasa, y (iii) L-3-cetoacil-CoA tiolasas (CAT). Estas enzimas, en conjunto y de forma secuencial catalizan la degradación completa de ácidos grasos saturados e insaturados de cadena larga a acetil-CoA [Kleiter & Gerhardt, 1998]. La  $\beta$ -oxidación es un proceso oxidativo que produce cortes repetidos de unidades acetato desde el extremo tiol de la molécula de ácido graso [Graham & Eastmond, 2002]. En cada ciclo de  $\beta$ -oxidación, se genera una molécula de acetil-CoA (C2) y la longitud de la cadena sustrato se reduce en dos unidades de carbono, acil-CoA ( $C_{n-2}$ ), la cual puede experimentar nuevos ciclos de  $\beta$ -oxidación (**Figura 3**).



**Figura 3.** Diagrama esquemático de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos (**A**), y vía central de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos en plantas (**B**). Reacciones enzimáticas que llevan a la oxidación del carbono beta ( $C_{\beta}$ ) y al corte del enlace entre este carbono y el carbono alfa ( $C_{\alpha}$ ) produciendo acetil-CoA y un acil-CoA reducido en dos carbonos. Vía central de la  $\beta$ -oxidación y enzimas requeridas, Acil-CoA oxidasa, Proteína Multifuncional y 3-cetoacil-CoA tiolasa, para catalizar la oxidación, hidratación-deshidrogenación y el corte tiolítico del acil-CoA.

El transporte de los productos de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos fuera de los peroxisomas, es principalmente en forma de citrato. La enzima citrato sintasa peroxisomal (CS) cataliza la reacción de condensación del acetil-CoA generado por  $\beta$ -oxidación con oxaloacetato formando citrato, el cual es exportado al citoplasma [Raymond et al., 1992; Pracharoenwattana et al., 2005]. En el citoplasma la enzima ATP-citrato liasa (ACL) cataliza el corte del citrato, formando oxaloacetato y acetil-CoA, generando la reserva citosólica de acetil-CoA [Fatland et al., 2002]. Estas moléculas de acetil-CoAs pueden ser metabolizadas por carboxilación, condensación o acetilación [Fatland et al., 2005].

Los acil-CoAs producidos son convertidos por la enzima acil-CoA reductasa a aldehídos, los cuales experimentan reducción por acción de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) generando alcoholes. Estos acil-CoAs y alcoholes pueden ser usados por la enzima alcohol aciltransferasa (AAT) en la síntesis de ésteres volátiles de aroma, en diferentes frutos. Estudios en plátanos [Tressl & Drawert, 1973] y manzanas [Rowan et al., 1999], con suministro de sustratos y precursores marcados radiactivamente han establecido que la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos es el principal proceso que suministra sustratos para volátiles, proporcionando acil-CoAs y alcoholes para la formación de ésteres de aroma [Dixon & Hewett, 2000].

#### 2.5.1.2. Lipoxigenasa (LOX)

Las lipoxigenasas (LOXs, linoleato oxígeno oxidoreductasas) constituyen una familia génica de dioxigenasas que contienen hierro no hemo, ampliamente distribuidas en plantas y animales [Brash, 1999]. Varias isoformas LOX han sido identificadas en diferentes compartimentos [Siedow, 1991; Fischer et al., 1999; Wang et al., 1999; Feussner & Wasternack, 2002] y su actividad está asociada a membranas de diferente origen, como cloroplastos [Rangel et al., 2002], cuerpos lipídicos [Hause et al., 2000], tonoplastos [Trabanger et al., 1991] y membranas plasmáticas aisladas [Vianello et al., 1995]. Las propiedades químicas y enzimáticas de LOXs han sido intensamente caracterizadas y es

ampliamente aceptado que LOXs tienen diversas funciones fisiológicas en el metabolismo de las plantas [Feussner & Wasternack, 2002], correlacionadas con procesos de regulación del crecimiento, maduración, senescencia, defensa inducida por patógenos y heridas [Bleé, 2002; Leone et al., 2003; Myung et al., 2006; Veronico et al., 2006].

LOXs de plantas catalizan la dioxigenación de ácidos grasos 1,4 pentadieno *cis*-poliinsaturados generando sus correspondientes hidroperóxidos, los cuales pueden ser metabolizados por otras enzimas de la llamada vía LOX: aleno óxido sintasa (AOS), hidroperóxido liasa (HPL), peroxigenasa (POX), o divinil éter sintasa (DES) [Feussner & Wasternack, 2002]. La oxidación de lípidos por la acción secuencial de LOX y HPL produce compuestos volátiles, los cuales contribuyen al sabor y aroma en muchos tejidos de plantas [Pérez et al., 1999; Rowan et al., 1999; Salas et al., 2000; Vancanneyt et al., 2001]. Las distintas isoenzimas LOX incorporan oxígeno molecular en el carbono 9 (9-LOX) o 13 (13-LOX) de la cadena hidrocarbonada del ácido linoleico (LA) (18:2) y ácido linolénico (LNA) (18:3) para producir ácido 9-(*S*)- o 13-(*S*)-hidroperóxido octadecadienoico (HPOD) o ácido 9-(*S*)- o 13-(*S*)-hidroperóxido octadecatrienoico (HPOT), respectivamente. Ambos 9- y 13-hidroperóxidos pueden posteriormente ser metabolizados a  $\omega$ -ceto-ácidos grasos de C12 o C9 (ácido 12-oxododecenoico o ácido 9-oxononanoico) y aldehídos volátiles de cadena corta de C6 y C9 (*cis*-3-hexenal o 3,6-nonadienal), respectivamente, mediante el corte oxidativo catalizado por la acción de enzimas HPL [Matsui, 1998].

Las enzimas HPL se caracterizan como una clase especial de citocromo P450 [Noordermeer et al., 2001] de la familia CYP74 [Matsui et al., 1996]. Los aldehídos C6 producidos por HPL, son importantes constituyentes del sabor y aroma característico de frutas, estos proporcionan las notas “verdes” del aroma [Hatanaka, 1993]. Estos aldehídos pueden ser convertidos en sus isómeros mediante reordenamiento espontáneo o acción enzimática (alquenal isomerasas), o ser reducidos a alcoholes por la enzima ADH [Phillips et al., 1979; Gardner, 1995; Akacha et al., 2005]. Estos alcoholes pueden ser usados por la enzima AAT en la síntesis de los ésteres volátiles de aroma en frutas.

La vía LOX es más activa en fruta homogenizada, donde ácido linoleico y linolénico son oxidados a aldehídos de C6 y C9, que incluyen 1-hexanal, *cis*-3-hexenal y *trans*-2-hexenal, volátiles que alcanzan la máxima concentración en los primeros 10-30 minutos después de la homogenización. En frutas intactas, enzimas y sustratos de la vía LOX tienen diferentes localizaciones subcelulares, lo cual impide la formación de compuestos volátiles asociados a esta vía, dejando la  $\beta$ -oxidación como la principal vía metabólica para la producción de aroma [Lara et al., 2006; Villatoro et al., 2008]. Sin embargo, la biosíntesis de lípidos y la fluidez de membrana incrementan con la maduración, haciendo las paredes celulares y membranas permeables a diferentes sustratos, permitiendo a la vía LOX activarse y funcionar como una alternativa a la  $\beta$ -oxidación. La participación del sistema LOX en la síntesis de compuestos de aroma se ha reportado en tomate [Kausch & Handa, 1997; Cass et al., 2000], pepino [Contreras et al., 2017], olivos [Salas et al., 2000], pimentón [Matsui et al., 1997], manzanas [Rowan et al., 1999; Echeverría et al., 2004; Villatoro et al., 2008], cítricos [Gomi et al., 2003] y frutillas [Pérez et al., 1999; Leone et al., 2006].

### 2.5.2. Volátiles derivados de aminoácidos

Los aminoácidos proporcionan esqueletos carbonados para la biosíntesis de aroma en frutas, y su metabolismo es responsable de la producción de un amplio número de compuestos que incluyen alcoholes, ácidos y ésteres ramificados. Los alcoholes y ésteres ramificados son producto del metabolismo de los aminoácidos alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina y ácido aspártico [Hansen & Poll, 1993]. Estos aminoácidos son convertidos a alcoholes y ésteres ramificados durante el período post-climatérico, involucrando enzimas de tres vías biosintéticas: aminotransferasas, descarboxilasas y alcohol deshidrogenasas.

En melón, los aminoácidos L-fenilalanina, L-metionina, L-leucina, L-isoleucina y L-valina, se metabolizan en compuestos aromáticos [Gonda et al., 2010; 2013]. Donde, los compuestos volátiles que presentan anillos aromáticos derivan principalmente de L-fenilalanina e incluyen benzenoides ( $C_6-C_1$ ), compuestos de fenetilo ( $C_6-C_2$ ), fenilpropanos ( $C_6-C_3$ ), fenilpropenos ( $C_6=C_3$ ) así como fenilpropenos hidroxilados y metoxilados [Freilich

et al., 2015]. Entre los compuestos aromáticos más importantes derivados de L-fenilalanina se encuentran (*E*)-cinnamaldehído y acetato de (*E*)-cinamilo que imparten las notas de “canela”, así como los derivados de fenitilo y metilbenzoato que proporcionan notas “florales” [Schwab et al., 2008]. Los ésteres derivados de L-fenilalanina como acetato de bencilo y acetato de 2-fenetilo son los principales contribuyentes del aroma característico del melón según se determina en estudios organolépticos [Pang et al., 2012; Gonda et al., 2018].

Experimentos usando [U-<sup>14</sup>C]-L-valina en cortes de plátano se ha mostrado la conversión del aminoácido a 2-metil 1-propanol, acetato de 2-metil propilo y ácido 2-metil propanoico, entre otros [Tressl & Drawert, 1973]. Isoleucina se considera el precursor biosintético de ácido 2-metil butanoico y sus ésteres derivados, 2-metil 1-butanol, acetato de 2-metil butilo o butanoato de 2-metil etilo en manzanas [Rowan et al., 1996]. Isoleucina (Ile) y leucina (Leu) son precursores de acetato de 3-metil butilo en frutilla [Pérez et al., 1992]. Ile y Leu presentan tasas de conversión metabólica a compuestos volátiles diferentes en distintas variedades de frutas. Ello sugiere que sería la diferente actividad y selectividad enzimática, en vez de la disponibilidad de sustratos para la vía de degradación de aminoácidos, lo que determina la concentración de ésteres de cadena ramificada en cada cultivar.

La importancia de los aminoácidos como precursores de aroma ha sido estudiada y reconocida en manzanas [Rowan et al., 1996], plátanos [Wyllie & Fellman, 2000] y frutilla [Pérez et al., 2002]. Sin embargo, el conocimiento es aún limitado respecto de las concentraciones requeridas de los diferentes aminoácidos para determinar el aroma de un fruto durante su maduración.

Considerables esfuerzos se han realizado durante las últimas décadas, para clarificar las rutas biosintéticas de los diferentes grupos de volátiles de aroma en frutas, y su regulación por factores ambientales, hortícolas y de post-cosecha [Fellman et al., 2000]. A pesar de esto existen aún muchos vacíos, particularmente en relación a los factores reguladores y mecanismos fisiológicos asociados.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a la importancia que tiene la generación de compuestos volátiles de aroma, como un factor determinante de la calidad de la fruta, y los escasos estudios relacionados con aroma en goldenberry, es de gran interés generar y ampliar el conocimiento científico en esta área. En esta tesis se abordarán específicamente aspectos relacionados a la biosíntesis de ésteres en frutos de *P. peruviana* durante el desarrollo y maduración, proceso de gran impacto en el atributo del sabor de esta fruta.

### 4. FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS

“La enzima alcohol aciltransferasa (AAT) y la disponibilidad de sustratos específicos, determinan el contenido y diversidad de ésteres generados durante la maduración de frutos de *Physalis peruviana* L.”

### 5. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

#### 5.1 Objetivo general

Caracterizar la ruta de biosíntesis de ésteres durante la maduración de frutos de *P. peruviana*.

#### 5.2 Objetivos específicos

1. Conocer la dinámica de producción de compuestos volátiles durante la maduración de frutos de *P. peruviana*.
2. Evaluar el efecto de sustratos alcoholes en la producción de volátiles en frutos de *P. peruviana*.
3. Correlacionar el perfil transcripcional del gen *PhpAAT1* durante la maduración del fruto de *P. peruviana* con la actividad de la enzima alcohol aciltransferasa.

## **CAPÍTULO II**

**Generación de aroma en frutos de *Physalis peruviana* L.**

**Efecto del estado de madurez y de la disponibilidad de  
sustratos alcoholes**

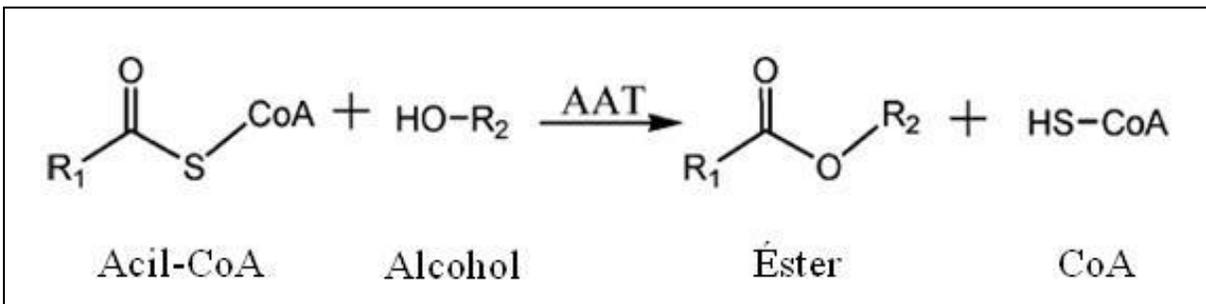
## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Ésteres y actividad alcohol aciltransferasa (AAT)

Uno de los componentes más significativos del sabor de la fruta, desde la perspectiva de los consumidores, es el aroma proporcionado por los ésteres [Dandekar et al., 2004], los cuales incrementan sus niveles en los períodos tardíos de la maduración, y están asociados con los atributos ‘frutosos’ [Souleyre et al., 2005]. Así, los ésteres forman el grupo mayoritario de compuestos volátiles producidos por las frutas.

Existen ésteres de cadena lineal y de cadena ramificada. Los ésteres de cadena lineal derivan de ácidos grasos [Rowan et al., 1999], generados a partir de moléculas de acil-CoAs [Ohlrogge & Jaworski, 1997] mediante  $\beta$ -oxidación. En tanto que, los ésteres de cadena ramificada son productos del metabolismo de aminoácidos [Tressl & Drawet, 1973; Rowan et al., 1996; Wyllie & Fellman, 2000].

El paso final en la biosíntesis de ésteres es catalizado por aciltransferasas (ATs), enzimas que transfieren un grupo acil desde un acil-CoA donador al grupo hidroxilo de un alcohol, amino o tiol de una molécula aceptora produciendo un derivado acil éster (**Figura 4**). Estas enzimas son miembros de la superfamilia BAHD [Shalit et al., 2003; Gang, 2005; Souleyre et al., 2005; D’Auria, 2006] dentro de las cuales al menos dos subfamilias presentan transferasas con actividad alcohol aciltransferasa (AAT) [Schaffer et al., 2007]. La actividad AAT es responsable de la producción de ésteres volátiles observada en tejidos vegetales tales como flores y frutos [Ueda et al., 1997; Dudareva et al., 1998; Aharoni et al., 2000]. La producción de ésteres en frutas es el resultado de la esterificación de alcoholes y acil-CoAs en una reacción dependiente de oxígeno catalizada por AAT, la cual en manzanas es más activa en la epidermis [Li et al., 2006].



**Figura 4.** Formación de ésteres volátiles por acción de la enzima alcohol aciltransferasa (AAT). La enzima AAT cataliza la formación de ésteres usando acil-CoAs y alcoholes como sustratos.

La mezcla de ésteres producidos en diferentes frutos depende de la actividad de la AAT, su especificidad por sustratos y disponibilidad de ellos. Esta especificidad por sustrato difiere de fruto a fruto y la esterificación de alcoholes de cadena lineal es favorecida sobre alcoholes ramificados en frutilla, plátano y manzana [Olías et al., 1995; Rowan et al., 1996]. En frutilla por ejemplo, AAT presenta una mayor actividad sobre alcoholes de cadena lineal que ramificados del mismo número de carbonos, siendo acetil-CoA y 1-hexanol los sustratos preferidos [Pérez et al., 1993].

Por otro lado, manzanas expuestas a atmósferas con alcoholes de bajo peso molecular (“Precursor Atmosphere Technology”) generan altas concentraciones de los ésteres correspondientes. Manzanas ‘Jonagold’ expuestas a vapores de hexanal sintetizan 1-hexanol y volátiles relacionados tales como acetato de hexilo, hexanoato de butilo y hexanoato de hexilo, mientras que manzanas ‘Golden Delicious’ tienen una mayor capacidad para convertir hexanal a 1-hexanol [Song et al., 1996]. Por lo tanto, diferencias en la preferencia por acil-CoAs y alcoholes pueden ser determinantes en la concentración de diferentes ésteres encontrados en los perfiles de aroma de las frutas.

Debido a su importancia en la biosíntesis de ésteres, la actividad de AATs ha sido investigada en diferentes frutos como plátano, frutilla, melón y manzana [Harada et al., 1985; Pérez et al., 1993, 1996; Wyllie & Fellman, 2000; Shalit et al., 2001; Olías et al., 2002; Echeverría et al., 2004]. Estos estudios revelaron, inducción de la actividad AAT durante la maduración y un amplio rango de especificidad de sustrato de las AATs, para los acil-CoAs y alcoholes evaluados.

Recientemente, varios cDNAs de largo completo que codifican enzimas con actividad AAT han sido aislados y caracterizados desde frutilla [Aharoni et al., 2000; González et al., 2009], melón [Yahyaoui et al., 2002], plátano [Beekwilder et al., 2004] y manzana [Li et al., 2006]. Los genes identificados se expresan en fruto y los niveles de expresión incrementan durante la maduración.

Aunque cambios en la actividad AAT han sido asociados con el avance de la maduración en frutas como melón (*Cucumis melo* L.) [Shalit et al., 2001], frutilla (*Fragaria × ananassa* Duch.) [Aharoni et al., 2000], *Fragaria chiloensis* L. (Duch.) [González et al., 2009], plátano (*Musa* L. spp.) [Jayanty et al., 2002] y manzana [Defilippi et al., 2005], resultados reportados por Villatoro et al. [2008] en manzanas cultivar ‘Pink Lady’ sugieren que la mayor producción de ésteres durante la maduración se debe principalmente al incremento en la disponibilidad de sustratos para la acción de la enzima.

De igual manera, la amplia preferencia de sustrato reportada para AATs, no está necesariamente reflejada en la composición del perfil de ésteres volátiles en frutas, sugiriendo que los ésteres específicos emitidos dependen en gran medida de los precursores disponibles. Ello ha sido confirmado por numerosos experimentos en los cuales la adición de intermediarios aumenta la producción de compuestos volátiles específicos. Por ejemplo, tratamientos de manzana o cortes de fruta con vapores de alcoholes, aldehídos o ácidos carboxílicos incrementan significativamente la concentración de los correspondientes ésteres volátiles [Berger & Drawert, 1984; Bartley et al., 1985; Kollmannsberger & Berger, 1992; Harb et al., 1994].

## 1.2. Importancia de compuestos volátiles en el aroma de frutos

### 1.2.1. Umbral odorífico (“odor threshold”)

El impacto de un compuesto volátil en el aroma de un fruto está determinado por su concentración y el umbral de percepción humana para dicho compuesto. El umbral odorífico OT (por sus siglas en inglés), es la concentración mínima de un compuesto para ser detectado por el olfato, y está determinado por el umbral de detección (concentración a la cual se puede sentir un aroma) o el umbral de reconocimiento (concentración a la cual se puede reconocer el aroma) [Parker et al., 2015]. Debido a que los umbrales odoríferos pueden variar en varios órdenes de magnitud de un evaluador a otro, los OTs son determinados por panelistas entrenados en reconocimiento de olores y técnicas de evaluación sensorial, y el valor obtenido

es la concentración a la cual el promedio de los evaluadores pueden percibir el aroma. Si bien, los valores de umbral odorífico están disponibles en la literatura, varían dependiendo de la matriz de la muestra y la metodología de determinación. Por lo tanto, se debe considerar si los OTs fueron obtenidos en aceite, agua o aire, para determinar la contribución de un determinado compuesto al aroma.

### 1.2.2. Índice odorífico o valor de actividad odorífica

Para estimar la contribución de un compuesto particular sobre el perfil aromático se utiliza el índice odorífico o valor de actividad odorífica (“odor value”) OV, el cual se obtiene al calcular la razón entre la concentración real del compuesto en el fruto y la concentración mínima capaz de ser detectada por el sistema olfativo humano (OT). La evaluación del impacto aromático en términos del OV, es una aproximación ampliamente utilizada en la determinación de compuestos con potencial aromático, de importancia para el aroma de frutos. Compuestos volátiles con OVs iguales o superiores a 1, indica que los compuestos presentan concentraciones sobre sus OTs y contribuyen significativamente al olor característico del fruto [Rizzolo et al., 1997]. Por lo tanto, sólo un pequeño grupo de compuestos volátiles del total reportado para una fruta poseen un impacto en el aroma que percibe el ser humano. Algunos volátiles poseen valores umbrales extremadamente bajos y concentraciones mínimas en la fruta, sin embargo son potentes odorantes [Takeoka et al., 1995].

En este capítulo se estudia la dinámica de producción de compuestos volátiles durante la maduración de frutos de *P. peruviana*. También se evalúa el efecto de la adición exógena de diversos alcoholes sobre el perfil aromático de los frutos.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Material vegetal

Frutos de *P. peruviana* ecotipo Colombia o genotipo Sylvania fueron colectados en diferentes estados de maduración desde un campo comercial localizado en Huaquén, Región

del Maule, Chile (35° 05' S; 71° 41' O; 87 msnm). Los frutos sin cáliz, uniformes y sin daños fueron clasificados en cuatro estados de maduración de acuerdo a Valdenegro et al. [2012]: VI, estado verde inmaduro; VM, estado verde maduro; AAM, estado amarillo-anaranjado maduro; y AM, estado anaranjado maduro (**Figura 5**). Se prepararon tres replicas de 5 ó 10 frutos cada una para las determinaciones de madurez, calidad y los análisis bioquímicos. Después de las determinaciones no destructivas de madurez y calidad, la fruta fue trozada e inmediatamente congelada en nitrógeno líquido y mantenida a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

## 2.2. Parámetros de madurez y calidad

### 2.2.1. Determinación del color del fruto

El color de goldenberry durante la maduración, fue medido con un colorímetro CR-300 (Konica Minolta, Sensaki, Japón) en la escala CIE- $L^*a^*b^*$ . Los valores de color,  $a^*$  que representa la variación del color de verde a rojo y  $b^*$  la variación de azul a amarillo, fueron usados para calcular el ángulo Hue o ángulo del color mediante la fórmula  $H^{\circ} = \text{tg}^{-1}(b^*/a^*)$ , para evaluar los cambios en el color de la piel desde verde a naranja durante la maduración [McGuire, 1992]. Dos mediciones se realizaron en el área ecuatorial de cada fruto, y los resultados representan el promedio  $\pm$  el error estándar de la media (ES) de tres replicas de 5 frutos por cada estado.

### 2.2.2. Producción de etileno y tasa respiratoria

Para determinar la producción de etileno, frutos individuales de cada estado de maduración fueron introducidos en cámaras de respiración de 400 mL. Después de incubación a  $20^{\circ}\text{C}$  durante 60 min, una muestra (1 mL de gas) fue tomada desde la atmósfera de la cámara y se cuantificó en un cromatógrafo de gases Clarus<sup>®</sup> 500 (PerkinElmer Inc., Wellesley, MA, USA) equipado con detector de ionización de llama (FID) y una columna Elite-Q Plot (30 m  $\times$  0,32 mm i.d.) a  $80^{\circ}\text{C}$ , usando helio como gas portador ( $50,3 \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$ ). Las temperaturas del inyector y detector fueron  $120$  y  $155^{\circ}\text{C}$  respectivamente. Tres muestras de etileno

independientes se tomaron por cámara y los resultados fueron expresados como el promedio en  $(\text{nL g}^{-1} \text{h}^{-1}) \pm \text{ES}$ . La atmósfera libre de cada cámara se estimó por sustracción del volumen del fruto al volumen total de la cámara. Para ello, el peso fresco y volumen de cada fruto (estimado como desplazamiento de agua) fueron medidos antes de ser introducidos en las cámaras. La tasa respiratoria fue determinada usando un analizador portátil de gases “Modified Atmosphere Packaging (MAP) Analyzer” (Bridge Analyzers Inc., Bedford Heights, OH, USA), y expresada como  $\text{mg CO}_2 \text{ Kg}^{-1} \text{ h}^{-1} \pm \text{ES}$ .

### 2.2.3. Medición de firmeza del fruto

La determinación de la firmeza de los frutos, se realizó con el equipo FirmTech II System (BioWorks Inc., Wamego, KS, USA), utilizando una sonda plana de 2 cm y registrando la fuerza de deformación del fruto en gramos-fuerza (gf). Dos mediciones en cada lado ecuatorial fueron realizadas para cada fruto. El promedio de cada muestra (3 replicas de 10 frutos por estadio) fue calculado y expresado en Newton (N)  $\pm \text{ES}$ . Después de la medición de firmeza los frutos fueron cortados en trozos e inmediatamente congelados en nitrógeno líquido y almacenados a  $-80^\circ\text{C}$ .

### 2.2.4. Concentración de sólidos solubles, acidez titulable y pH

De cada replica, 2 g de fruta congelada fueron homogenizados y ajustados a un volumen final de 25 mL. La mezcla obtenida fue filtrada y del jugo se analizó la concentración de sólidos solubles (SSC), el pH y la acidez titulable (TA). La SSC se determinó a  $20^\circ\text{C}$  usando un refractómetro Pocket PAL-1 (Atago Co., Tokio, Japón), y se expresó en g de azúcar por 100 g de peso fresco (PF). El pH del jugo se registró con pH-metro. La TA fue determinada por titulación de 5 mL del jugo de goldenberries con NaOH 20 mM hasta alcanzar un pH 8,2 usando un pH-metro (pH-Burette 24 S1, Crison Instruments, Barcelona, España). Los valores se expresaron como miliequivalentes (mEq) de ácido cítrico por 100 g PF. Los resultados representan el promedio  $\pm \text{ES}$  de tres replicas.



**Figura 5.** Frutos de *P. peruviana* ecotipo Colombia o genotipo Silvania en diferentes estados de maduración. Las bayas del ecotipo Colombia fueron colectados y segregados desde un campo comercial localizado en Huaquén, Región del Maule, Chile ( $35^{\circ} 05' S$ ;  $71^{\circ} 41' O$ ; 87 msnm). Los frutos en diferentes estados de maduración sin cáliz, uniformes y sin daños fueron clasificados en cuatro estados de maduración: VI, estado verde inmaduro; VM, estado verde maduro; AAM, estado amarillo-anaranjado maduro; y AM, estado anaranjado maduro.

### 2.3. Análisis de compuestos volátiles por “headspace-SPME”

La extracción de compuestos volátiles se realizó de acuerdo al método “headspace-SPME”. El muestreo de volátiles se realizó como se describe en Moya-León et al. [2006] y Balbontín et al. [2007]. Tres replicas de 5 frutos intactos por estado de maduración (aproximadamente 6 g de fruta para el estado VI, 11 g para el estado VM, 16 g para el estado AAM y 22 g para el estado AM) fueron utilizadas.

Cada replica fue introducida en contenedores de vidrio herméticos (400 mL) equipados con un septum de goma e incubados a 20°C durante 4 h antes de la toma de muestras. Para colectar los volátiles se usaron fibras StableFlex™ SPME (Microextracción de Fase Sólida) portátiles de Polidimetilsiloxano/Divinilbenceno (PDMS/DVB, 65 µm de grosor) (Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA) las cuales fueron insertadas a través del septum en las cámaras, y expuestas a la atmósfera “headspace” durante 30 min.

Los compuestos volátiles adsorbidos por partición en las fibras SPME fueron desorbidos térmicamente en el inyector del cromatógrafo de gases Clarus® 600 (PerkinElmer, Autosystem XL/Turbo Mass 5.3) equipado con columna MDN-5 (Supelco, 30 m × 0,25 mm i.d., 0,25 µm). El programa de temperaturas durante las determinaciones fue el siguiente: temperatura del inyector 200°C; línea de transferencia 300°C; y helio como gas portador (40,2 cm s<sup>-1</sup>). La temperatura del horno fue mantenida a 50°C por 2 min, y posteriormente elevada a 220°C a una velocidad de 10°C min<sup>-1</sup>, y finalmente mantenida durante 2 min. Los espectros de masa fueron obtenidos por ionización de electrones a 70 eV con un rango de espectro de 40–250 m z<sup>-1</sup>.

La identificación de los compuestos se realizó comparando los espectros de masa obtenidos, con aquellos de estándares de referencia autenticados almacenados en la biblioteca de espectros de masa del “National Institute for Standards and Technology” (NIST), y siempre que fue posible los compuestos identificados fueron confirmados por comparación

de sus tiempos de retención ( $t_R$ ) con compuestos de referencia obtenidos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) o Fluka (Buchs, Suiza).

La cuantificación de los diferentes compuestos fue en base a los datos de integración de los picos obtenidos por GC y curvas de calibración con estándares. Se agregó 1,2-diclorobenceno (0,5  $\mu$ L) a las cámaras como estándar interno para comprobar la capacidad de adsorción de cada fibra, y los resultados fueron expresados en  $\mu$ g por g PF. Después de la determinación de volátiles, la fruta de cada replica fue cortada, trozada e inmediatamente congelada en nitrógeno líquido y almacenada a  $-80^\circ\text{C}$ .

### 2.3.1. Determinación del valor de actividad odorífica (OV)

Los valores de OVs fueron calculados según la siguiente fórmula:  $OV_i = C_i/OT_i$ , donde  $C_i$  es la concentración del compuesto  $i$  en frutos de *P. peruviana* y  $OT_i$  es la concentración mínima del compuesto  $i$  capaz de ser detectada por el sistema olfativo humano medida en agua. Para el cálculo de los OVs se emplearon valores de OT descritos en literatura. Los valores fueron expresados como  $\text{Log}_{10} OV_i$  [Baldwin et al., 2000].

### 2.4. Ensayos de actividad AAT

La actividad AAT se determinó como describe Balbontín et al. [2010]. Frutos congelados (10 g) fueron homogenizados con 0,2 g de PVPP y 20 mL de tampón 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0) conteniendo 1 M KCl y 0,1% (v/v) Triton X-100. La mezcla fue incubada a  $4^\circ\text{C}$  durante 20 min con agitación, y posteriormente centrifugada ( $10000\times g$  por 20 min). El sobrenadante fue desalado a través de columnas de filtración Sephadex G-25 (PD-10, GE Healthcare Bio-Sciences Corp., NJ, USA) en presencia de tampón 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) conteniendo 10% (v/v) glicerol y 0,5 mM ditioneitol (DTT).

La actividad AAT fue cuantificada por su capacidad de convertir hexanol y acetyl-CoA en acetato de hexilo [Fellman et al., 1993]. La reacción fue realizada en un volumen total de 500  $\mu$ L en presencia de 2 mM hexanol, 250  $\mu$ M acetyl-CoA en tampón 50 mM Tris-HCl (pH

7,5) conteniendo 10% (v/v) glicerol. La reacción fue iniciada por la adición de 200  $\mu$ L de extracto de proteínas y la mezcla fue incubada a 30°C durante 2,5 h. La reacción fue detenida por la adición de 50 mg de ácido cítrico y 185 mg de KCl, y el sobrenadante transferido a un vial de vidrio el cual fue sellado después de incorporar el estándar interno 1,2-diclorobenceno (10  $\mu$ L de una dilución en pentano 1:5000). Los volátiles producidos durante la reacción enzimática fueron liberados a la atmósfera por agitación durante 15 min y luego adsorbidos en fibras SPME de (PDMS/DVB). La separación y cuantificación de acetato de hexilo fue realizada en un GC-MS (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA; GC 7890A, MSD 5975C) equipado con una columna HP-5MS (30 m  $\times$  0,25 mm i.d., 0,25  $\mu$ m) usando las mismas condiciones descritas para el análisis de volátiles. Para la cuantificación se preparó una curva de calibración con acetato de hexilo. La actividad de la enzima AAT se expresó en  $\mu$ katales ( $\mu$ moles of acetato de hexilo producidos por segundo) por mg de proteína total. El contenido de proteínas se determinó por el método de Bradford [1976] usando BSA como estándar. Las determinaciones fueron realizadas en triplicado y expresadas como promedios  $\pm$  ES.

## 2.5. Suministro exógeno de sustratos

El efecto del suministro exógeno de sustratos sobre la producción de compuestos volátiles en frutos de *P. peruviana*, fue evaluado mediante la obtención del perfil de volátiles generados por frutos de goldenberry incubados con diferentes alcoholes. La cuantificación de los compuestos volátiles generados se realizó de acuerdo al método “headspace-SPME” descrito previamente, considerando en el análisis solamente aquellos volátiles relacionados con el alcohol suministrado.

Frutos de *P. peruviana* (~12 g) en estado de maduración AM fueron incubados con 1 mM de etanol, 1-butanol, 1-hexanol, 1-octanol o agua (control) durante 10 min. Después del tratamiento, la fruta fue mantenida a 20°C hasta la determinación de volátiles. Se determinó la producción de compuestos volátiles capturados con fibras SPME a las 12, 24 y 48 h después del tratamiento por GC-MS.

## 2.6. Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Las determinaciones de madurez y calidad se realizaron con tres réplicas. El análisis estadístico se realizó con el programa computacional SPSS v17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

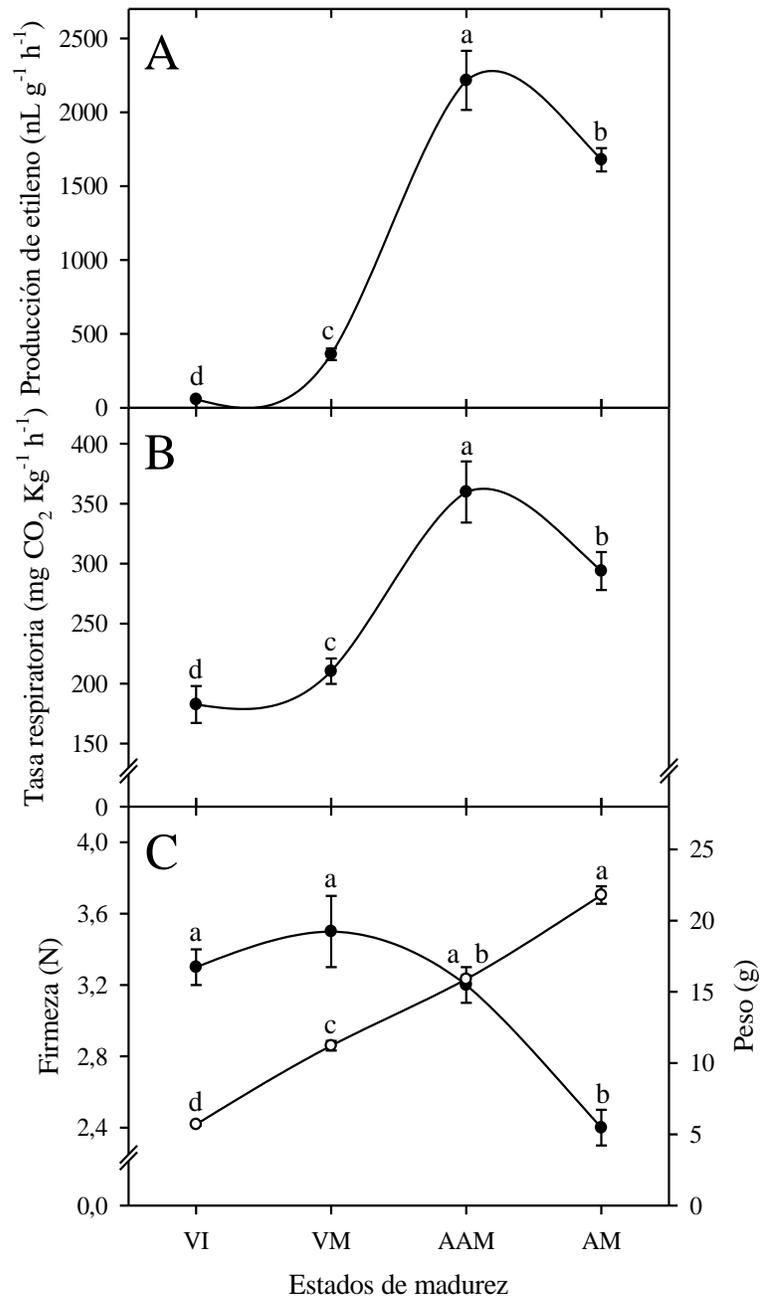
Los datos experimentales fueron tratados mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y las diferencias significativas entre los promedios se determinaron por la prueba HSD (Diferencia Honestamente Significativa) de Tukey con un nivel de significancia  $\alpha = 0,05$  y un intervalo de confianza del 95% ( $P \leq 0,05$ ) [Sokal & Rohlf, 1995] para evaluar los parámetros de madurez, las mediciones de volátiles de aroma, y la actividad AAT. Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con los compuestos volátiles, para tener una visión general de los cambios durante la maduración.

## 3. RESULTADOS

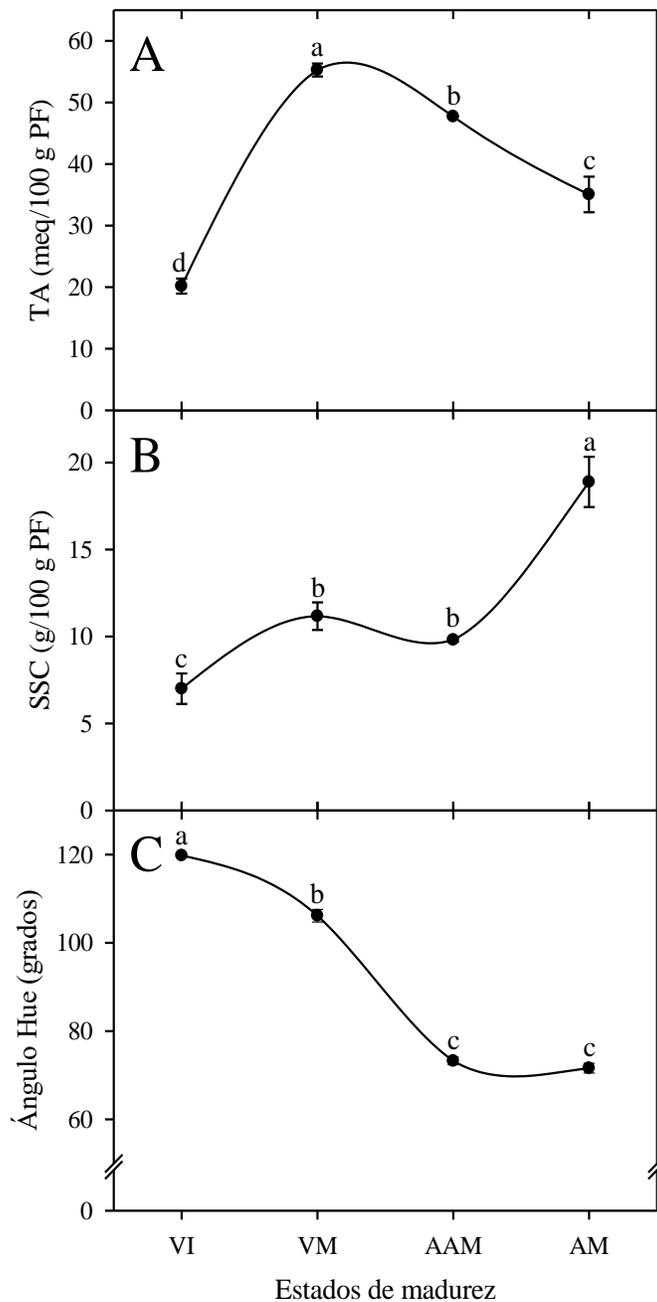
### 3.1. Cambios en los índices de madurez en frutos de goldenberry

A frutos de *P. peruviana* segregados en cuatro estados de desarrollo siguiendo la clasificación propuesta por Baumann & Meier [1993], se les determinó una serie de índices de madurez. Los datos obtenidos (**Figura 6**) evidenciaron que los estados VI y VM corresponden a frutos en desarrollo, mientras que los estados AAM y AM corresponden a frutos madurando y frutos maduros, respectivamente.

La producción de etileno mostró un pronunciado incremento durante la maduración de goldenberry (**Figura 6A**). Un incremento significativo se evidenció desde el estado VM al AAM, alcanzando el máximo valor en el estado AAM ( $2216,1 \text{ nL g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) (**Figura 6A**). La producción de etileno mostró una leve caída entre los estados AAM y AM.



**Figura 6.** Cambios en la producción de etileno (A), tasa respiratoria (B), firmeza y peso (C), durante el desarrollo de goldenberry. Los estados de madurez corresponden a: VI, verde inmaduro; VM, verde maduro; AAM, amarillo-anaranjado maduro; y AM, anaranjado maduro. Los valores corresponden a promedios  $\pm$  ES. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los estados de maduración (Tukey HSD,  $P \leq 0,05$ ).



**Figura 7.** Cambios en la acidez titulable (TA) (A), contenido de sólidos solubles (SSC) (B), y ángulo Hue (C), durante el desarrollo de goldenberry. Los estados de madurez corresponden a: VI, verde inmaduro; VM, verde maduro; AAM, amarillo-anaranjado maduro; y AM, anaranjado maduro. Los valores corresponden a promedios  $\pm$  ES. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los estados de maduración (Tukey HSD,  $P \leq 0,05$ ).

La maduración de goldenberry se asoció con un marcado incremento en la tasa respiratoria, desde el estado VM hasta alcanzar el estado AM (210,4 y 359,8 mg CO<sub>2</sub> Kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente) (**Figura 6B**), incremento que presentó un patrón similar a la producción de etileno.

Durante el desarrollo del fruto, el tamaño de goldenberry incrementó desde el estado VI al AM (5,7 g y 21,8 g, respectivamente) (**Figura 6C**). Una reducción en los valores de firmeza del fruto y la acidez titulable (TA) se observó durante el avance en maduración (**Figura 6C y 7A**). La firmeza presentó una marcada reducción entre los estados AAM y AM ( $P \leq 0,05$ ), mientras que el contenido de sólidos solubles totales (SSC) incrementó durante la maduración, presentando el valor más alto en el estado AM (18,9 g/100 g PF) (**Figura 7B**).

El color de la piel de goldenberry cambió desde verde a amarillo anaranjado a medida que transcurre la maduración. El color del fruto fue expresado como ángulo Hue ( $H^\circ$ ), y los valores del ángulo del color  $H^\circ$  decrecieron durante la maduración, con una marcada reducción desde el estado VI al AAM (**Figura 7C**).

### 3.2. Producción de volátiles durante la maduración de goldenberry

Más de 30 diferentes compuestos volátiles emitidos por frutos de *P. peruviana*, fueron identificados por el método “headspace-SPME” y 16 de ellos fueron cuantificados. Los principales compuestos encontrados fueron ésteres, aunque algunos alcoholes también fueron identificados (**Tabla 1**). Otros compuestos volátiles fueron identificados (mediante sus espectros de masa), sin embargo como los estándares no estaban disponibles, estos no fueron cuantificados en este estudio.

Se han descrito y utilizado diversos métodos para el aislamiento e identificación de compuestos volátiles, tales como extracción líquido-líquido, extracción-destilación simultánea (SDE) y Headspace (HS) estático o dinámico, basados en la volatilidad o solubilidad de los compuestos [Zhang et al., 2016; Cannon & Ho, 2018]. La extracción con solventes y la

destilación presentan los mejores resultados con respecto a la calidad (número de compuestos extraídos) y la cantidad (altas tasas de recuperación) debido a la capacidad de extracción de los solventes. Sin embargo, presentan pasos de concentración exhaustivos (para eliminar el disolvente), altas temperaturas o presiones reducidas, condiciones que pueden destruir o alterar algunos compuestos volátiles y/o producir artefactos, así como introducir impurezas químicas, componentes no volátiles y solventes [Ulrich et al., 2018]. La técnica HS también genera una mayor cantidad y más compuestos en la fase gaseosa, aumentando la sensibilidad y detección de volátiles. Sin embargo, la liberación y muestreo de volátiles en la HS es a una temperatura elevada, lo cual produce vapor de agua que puede dañar la fuente de iones de detector SM [Zhang et al., 2016].

Ahora bien, la determinación de compuestos volátiles de aroma en frutos intactos presenta dificultades principalmente asociadas a la baja concentración y diversidad de los compuestos. La microextracción en fase sólida (SPME) es un buen procedimiento para el análisis de volátiles, considerando las limitaciones en las tasas de recuperación o identificación de compuestos. Las principales desventajas de la técnica en el aislamiento y determinación están relacionadas con la capacidad de adsorción y afinidad diferencial de las fibras, obteniendo muy baja extracción de compuestos polares como ácidos y furanonas [Ulrich et al., 2018]. Como la capacidad de adsorción del revestimiento de las fibras SPME varía según el peso molecular y la polaridad de los compuestos volátiles, la elección del revestimiento de la fibra es crucial y depende de la clase de compuestos que se analizarán. Por lo tanto, la determinación e identificación de los compuestos volátiles está limitada a la capacidad de adsorción de las fibras SPME, y en la práctica ello exige la confección de curvas de calibración con estándares.

Los ésteres más abundantes, presentes en frutos completamente maduros fueron butanoato de etilo, acetato de etilo, butanoato de hexilo, butanoato de butilo, acetato de hexilo, y acetato de butilo (**Tabla 1**). Todos estos compuestos tienen propiedades aromáticas con notas ‘frutas’. Entre los ésteres, los butanoatos fueron los más abundantes seguidos por acetatos y hexanoatos. El contenido total de butanoatos y hexanoatos incrementó durante la maduración del goldenberry, con la máxima tasa de producción en el estado AM (**Tabla 1**).

2-Metil 1-butanol fue el principal alcohol emitido por goldenberry encontrado e identificado por el método “headspace-SPME”, seguido por 1-hexanol. La concentración de 2-metil 1-butanol permaneció constante durante los primeros estados de maduración, con una reducción en el estado AAM y un incremento de la concentración en el estado AM (**Tabla 1**). 1-Hexanol presentó un patrón de producción irregular durante el desarrollo y maduración de goldenberry.

Para obtener una visión general de los volátiles, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) (**Figura 8**). Los volátiles producidos por goldenberry fueron clasificados en cinco grupos, y los dos primeros componentes fueron capaces de explicar el 89,4% de la varianza. El CP1 explicó el 63,1% de la variabilidad, mientras que el 26,3% fue explicado por el CP2. La proximidad de los grupos en el gráfico de PCA indicó una buena correlación entre ellos y la proximidad de los compuestos volátiles está asociada a un perfil aromático similar. Los perfiles de producción para los volátiles seleccionados que pertenecen a los diferentes grupos se muestran en la **Figura 9**.

El Grupo 1 fue conformado por compuestos que incrementaron su concentración a medida que avanzó el proceso de maduración del goldenberry, con niveles máximos en los frutos completamente maduros (estado AM), e incluyó compuestos tales como acetato de hexilo, benzoato de metilo, hexanoato de etilo, butanoato de hexilo y acetato de butilo (**Figura 9A**). El Grupo 2 incluyó los compuestos que incrementaron su concentración durante la maduración, alcanzando sus máximos niveles en el estado AAM, después del cual disminuyeron su concentración: butanoato de propilo, acetato de 2-metilbutilo, butanoato de butilo, hexanoato de butilo y butanoato de metilo (**Figura 9B**). El Grupo 3 se formó por compuestos como 2-metil 1-butanol, octanoato de etilo y butanoato de etilo; volátiles que mostraron un bajo nivel de producción en los estados VM y AAM, pero aumentaron considerablemente su concentración en el estado AM (**Figura 9C**). Los volátiles restantes, hexanoato de metilo y 1-hexanol (Grupo 4) presentaron una disminución en su concentración desde el estado VI hasta un nivel bajo en el estado VM, aumentando desde el siguiente estado

(AAM) hasta el (AM) (**Figura 9D**). Por último, acetato de etilo mostró una disminución constante durante el transcurso de la maduración de frutos de *P. peruviana* (**Figura 9E**).

Luego de analizar los volátiles emitidos por frutos de *P. peruviana* en términos de abundancia relativa ( $\mu\text{g g PF}^{-1}$ ), se determinó el impacto de los compuestos en el perfil aromático de goldenberry, mediante el cálculo del OV (**Tabla 2**). Todos los compuestos identificados presentaron niveles superiores a sus respectivas concentraciones umbrales, y por tanto, valores de  $\text{Log}_{10} OV > 1$ . Los volátiles benzoato de metilo, butanoato de etilo, hexanoato de etilo, acetato de hexilo y acetato de 2-metilbutilo presentan los valores de OT más bajos,  $\text{mbz} \ll \text{eb} = \text{eh} < \text{ha} < \text{mba}$  (**Tabla 2**).

Entre los compuestos volátiles determinados en frutos de *P. peruviana*, acetato de butilo, hexanoato de etilo y benzoato de metilo presentaron un incremento en los valores de  $\text{Log}_{10} OV$  durante la maduración de goldenberry, mostrando la máxima actividad odorífica en el estado AM (**Tabla 2**). En fruto maduro, los ésteres con mayor valor odorífico corresponden a butanoato de etilo, acetato de hexilo y hexanoato de etilo, seguidos de butanoato de butilo y benzoato de metilo, correspondiendo entonces a los compuestos de mayor impacto en el aroma de goldenberry.

### 3.3. Actividad AAT durante la maduración de goldenberry

La actividad *in vitro* de AAT fue evaluada en extractos de fruto por la capacidad de producir acetato de hexilo, uno de los principales ésteres producidos por goldenberry, cuando hexanol y acetyl-CoA son agregados al ensayo enzimático. La actividad total mostró un incremento durante el progreso de la maduración de goldenberry, alcanzando los máximos niveles en los estados de maduración AM y AAM (**Figura 10**). El mayor nivel de actividad AAT fue encontrado en el estado AM ( $3,68 \mu\text{kat mg}^{-1}$  de proteínas).

### 3.4. Ensayo de suministro exógeno de alcoholes

Para determinar si los diferentes compuestos volátiles producidos por goldenberry dependen de la disponibilidad de sustratos precursores, frutos de *P. peruviana* en estadio AM fueron incubados con diversos alcoholes (etanol, butanol, hexanol, octanol) y posteriormente se determinó el contenido de volátiles generados por la fruta (**Tabla S1**), considerando solamente los compuestos volátiles relacionados con el alcohol suministrado (**Tabla 3**). Los frutos incubados presentaron cambios en la concentración de los diferentes volátiles en comparación al tratamiento control. Los frutos incubados con etanol mostraron un incremento en la producción de butanoato de etilo a las 12 y 24 h de tratamiento (**Tabla 3**). El suministro de butanol mostró un incremento significativo ( $P \leq 0,05$ ) en la producción de 2-metil 1-butanol a las 12 y 48 h, además de, butanoato de propilo, butanoato de butilo y butanoato de hexilo en goldenberry a las 48 h comparado con los frutos del tratamiento control (**Tabla 3**).

Frutos de *P. peruviana* tratados con 1-hexanol evidenciaron un incremento en la producción de hexanoato de metilo y hexanoato de butilo a las 12 y 48 h después del tratamiento exógeno, mientras que butanoato de hexilo mostró su mayor incremento ( $P \leq 0,05$ ) luego de 48 h de tratamiento (**Tabla 3**). El suministro de octanol mostró un incremento significativo ( $P \leq 0,05$ ) en la producción de octanoato de etilo en goldenberry a las 12 y 48 h de tratamiento (**Tabla 3**). En suma, la incubación de frutos de *P. peruviana* con alcoholes resultó en el incremento en la emisión de volátiles totales de aroma a las 12 y 24 h post-tratamiento. Este incremento en compuestos volátiles se asoció al aumento en los OV para butanoato de butilo y hexanoato de butilo en frutos incubados con butanol a las 48 h de tratamiento (**Tabla 4**). El suministro de hexanol mostró un incremento el OV para hexanoato de butilo a las 48 h, mientras que el suministro de octanol mostró un aumento del OV para octanoato de etilo a las 24 y 48 h comparado con los frutos del tratamiento control (**Tabla 4**). Esto nos permite indicar que el incremento de volátiles se asocia a un mayor impacto odorífero. Es por tanto, posible concluir que es factible incrementar el perfil aromático del fruto mediante la adición de alcoholes en el medio. Por otro lado, esto indica que la producción de ciertos volátiles está siendo restringida por la baja disponibilidad de sustratos en la fruta.

**Tabla 1.** Concentración ( $\mu\text{g g PF}^{-1}$ ) de los principales compuestos volátiles producidos por frutos de *Physalis peruviana* L., en diferentes estados de maduración determinada por HS-SPME/GC-MS.

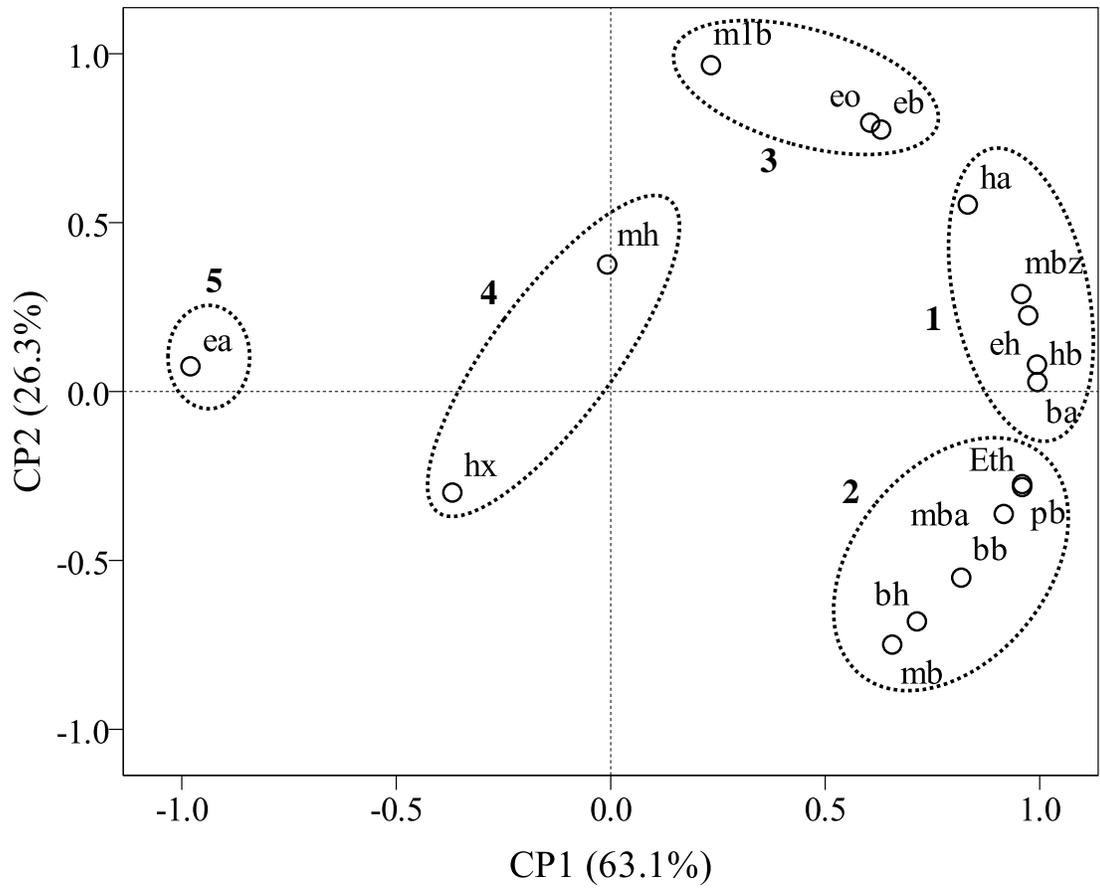
Compuestos	$t_R$ (min)	PM (g mol <sup>-1</sup> )	Estados de maduración								
			VI		VM		AAM		AM		
Acetato de etilo	ea	1,33	88,11	2.264.391 ±	194.157a	1.719.622 ±	146.370a	757.907 ±	54.367b	719.460 ±	47.210b
Butanoato de metilo*	mb	1,88	102,13	6.015 ±	1.225c	38.306 ±	10.158b	126.409 ±	21.807a	40.262 ±	3.564b
2-Metil 1-butanol* <sup>‡</sup>	m1b	2,02	88,11	298.596 ±	95.408b	180.661 ±	77.152b	46.632 ±	4.738b	579.654 ±	8.376a
Butanoato de etilo*	eb	2,73	116,16	14.154 ±	1.682b	543 ±	183c	438 ±	102c	3.480.265 ±	746.401a
Acetato de butilo* <sup>‡</sup>	ba	2,95	116,16	17.147 ±	2.274c	19.682 ±	4.599c	129.865 ±	5.977b	154.968 ±	7.111a
1-Hexanol* <sup>‡</sup>	hx	3,81	102,13	161.653 ±	20.569a	27.993 ±	7.424b	100.880 ±	26.449ab	34.115 ±	7.550b
Acetato de 2-metilbutilo <sup>‡</sup>	mba	3,96	130,19	3.269 ±	539bc	2.802 ±	785c	17.723 ±	3.851a	12.166 ±	1.154ab
Butanoato de propilo	pb	4,27	130,19	761 ±	73c	3.412 ±	1.308b	12.071 ±	397a	9.591 ±	861a
Hexanoato de metilo*	mh	4,90	130,19	2.351 ±	626a	550 ±	70b	1.308 ±	171ab	1.786 ±	136ab
Butanoato de butilo <sup>‡</sup>	bb	5,99	144,21	24.756 ±	5.321c	10.343 ±	2.127d	1.188.758 ±	20.710a	500.945 ±	99.443b
Hexanoato de etilo*	eh	6,04	144,21	1.175 ±	126d	3.157 ±	88c	42.850 ±	6.515b	64.852 ±	13.669a
Acetato de hexilo <sup>‡</sup>	ha	6,27	144,21	6.051 ±	843b	3.401 ±	1.041b	52.254 ±	11.489b	162.606 ±	24.336a
Benzoato de metilo* <sup>‡</sup>	mbz	7,70	136,15	48 ±	3c	266 ±	120c	1.469 ±	34b	2.449 ±	353a
Hexanoato de butilo	bh	9,27	172,27	5 ±	0c	5 ±	0c	2.272 ±	224a	586 ±	41b
Butanoato de hexilo	hb	9,34	172,27	48 ±	10b	19 ±	0c	479.490 ±	90.916a	543.285 ±	143.859a
Octanoato de etilo* <sup>‡</sup>	eo	9,51	172,27	6 ±	1b	4 ±	1b	1 ±	0b	117 ±	3a
<b>Acetatos totales</b>				2.290.858		1.745.507		957.749		1.049.200	
<b>Butanoatos totales</b>				45.735		52.624		1.807.165		4.574.348	
<b>Hexanoatos totales</b>				3.530		3.712		46.430		67.224	
<b>Otros total</b>				54		270		1.470		2.566	
<b>Ésteres totales</b>				2.340.176		1.802.113		2.812.814		5.693.338	
<b>Alcoholes totales</b>				460.249		208.654		147.513		613.768	

Los valores corresponden a promedios de tres réplicas por estado de maduración  $\pm$  ES. Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey HSD,  $P \leq 0,05$ ) entre los estados de maduración VI, verde inmaduro; VM, verde maduro; AAM, amarillo-anaranjado maduro; y AM, anaranjado maduro para cada volátil. Tiempo de retención ( $t_R$ ), tiempo de separación cromatográfica. Los compuestos fueron identificados por GC-MS y confirmados con estándares comerciales. (\*) Indica compuestos descritos en *P. peruviana* por Berger et al. [1989] y (<sup>‡</sup>) compuestos descritos por Yilmaztekin [2014b].

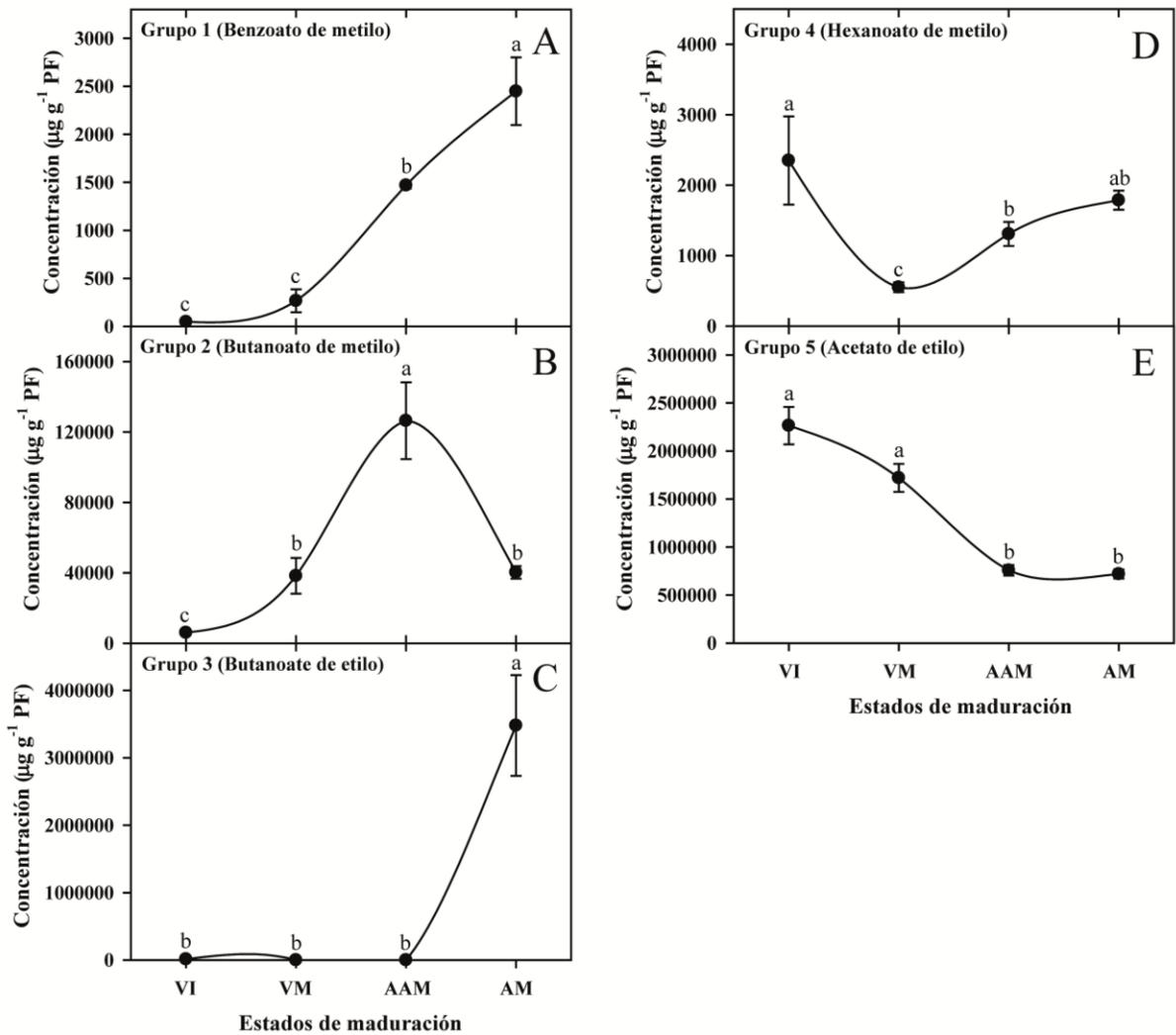
**Tabla 2.** Umbrales odoríficos, valores de actividad y descripción aromática de compuestos identificados en frutos de *Physalis peruviana* L., en diferentes estados de maduración.

Compuestos	OT (ppm)	$Log_{10} OV$				Descripción aromática
		VI	VM	AAM	AM	
<b>Acetato de etilo</b>	5	5,7	5,5	5,2	5,2	Afrutado, piña, anís
<b>Butanoato de metilo</b>	0,076	4,9	5,7	6,2	5,7	Afrutado, dulce
<b>2-Metil 1-butanol</b>	0,3	6,0	5,8	5,2	6,3	Dulce, floral, afrutado
<b>Butanoato de etilo</b>	0,001	7,2	5,7	5,6	9,5	Frutas maduras, piña, plátano
<b>Acetato de butilo</b>	0,066	5,4	5,5	6,3	6,4	Afrutado, dulce, floral, geranio
<b>1-Hexanol</b>	0,5	5,5	4,7	5,3	4,8	Notas verdes, floral, terroso
<b>Acetato de 2-metilbutilo</b>	0,005	5,8	5,7	6,5	6,4	Manzana, plátano
<b>Butanoato de propilo</b>	0,124	3,8	4,4	5,0	4,9	Piña, damasco
<b>Hexanoato de metilo</b>	0,084	4,4	3,8	4,2	4,3	Afrutado, piña
<b>Butanoato de butilo</b>	0,1	5,4	5,0	7,1	6,7	Manzana, pera, durazno, plátano
<b>Hexanoato de etilo</b>	0,001	6,1	6,5	7,6	7,8	Manzana, plátano, piña, etéreo
<b>Acetato de hexilo</b>	0,002	6,5	6,2	7,4	7,9	Afrutado, manzana, pera, cereza, dulce
<b>Benzoato de metilo</b>	0,00052	5,0	5,7	6,5	6,7	Afrutado, dulce
<b>Hexanoato de butilo</b>	0,7	0,9	0,9	3,5	2,9	Manzana roja, afrutado
<b>Butanoato de hexilo</b>	0,25	2,3	1,9	6,3	6,3	Manzana
<b>Octanoato de etilo</b>	0,092	1,8	1,6	1,0	3,1	Fruta madura, dulce, pera

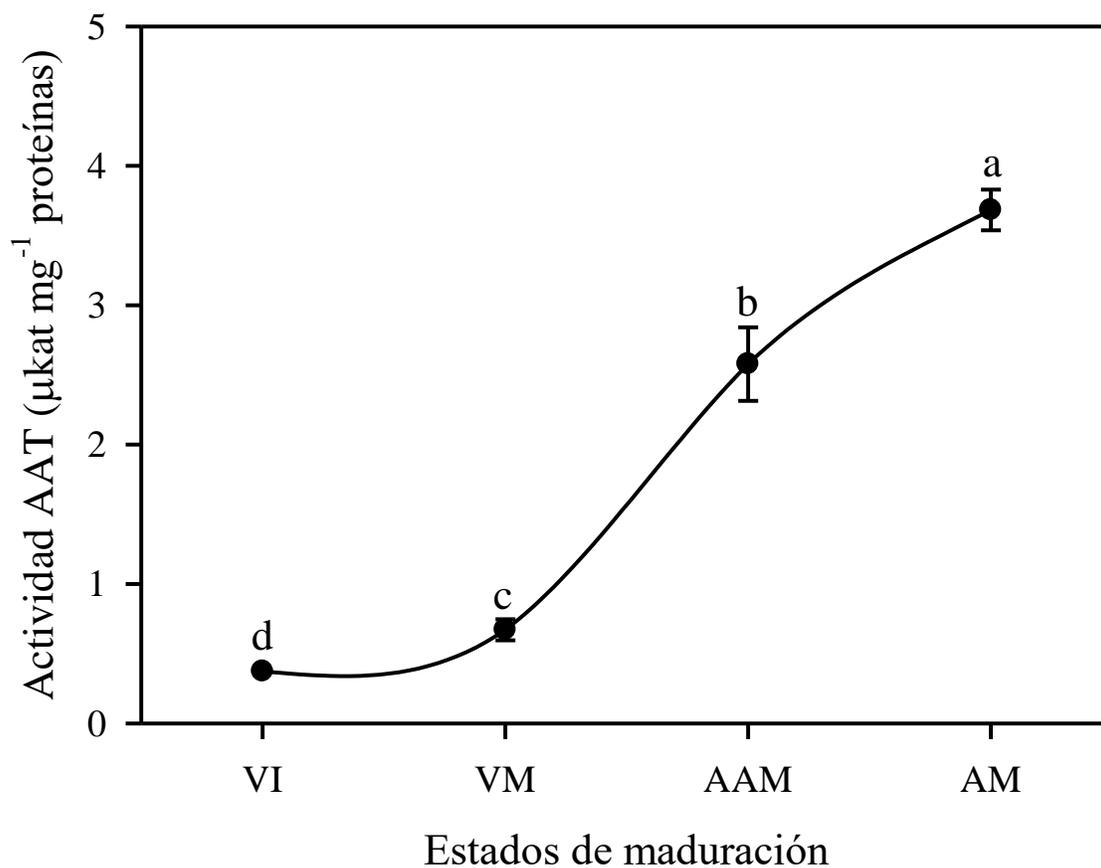
Los valores  $Log_{10} OV = Log_{10} C/OT$  fueron calculados con OTs determinados en agua, reportados en literatura [Flath et al., 1967; Takoeka et al., 1990; 1992; Pino & Mesa, 2006]. Descripción aromática obtenida de Balbontín et al. [2007].



**Figura 8.** Gráfico de carga de los primeros dos componentes del PCA para volátiles producidos durante la maduración de goldenberry. CP1 y CP2 explican el 89,4% de la varianza. Los códigos de los compuestos volátiles se indican en **Tabla 1**.



**Figura 9.** Perfiles de producción de ésteres durante la maduración de goldenberry. Los volátiles seleccionados pertenecen a los diferentes Grupos de acuerdo al PCA. La producción de los compuestos volátiles fue evaluada en tres réplicas para cada estado de maduración, y los datos corresponden al promedio ± ES. Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey HSD,  $P \leq 0,05$ ) entre los estados de maduración para cada volátil.



**Figura 10.** Cambios en la actividad AAT durante la maduración de goldenberry. La actividad AAT fue medida en frutos en los estados de maduración: VI, verde inmaduro; VM, verde maduro; AAM, amarillo-anaranjado maduro; y AM, anaranjado maduro. Los valores corresponden a promedios  $\pm$  ES de tres replicas. Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey HSD,  $P \leq 0,05$ ) entre los estados de maduración.

**Tabla 3.** Concentración ( $\mu\text{g g PF}^{-1}$ ) de compuestos volátiles producidos por frutos de *Physalis peruviana* L., después del tratamiento exógeno con alcoholes, relacionados con el alcohol suministrado.

Suministro	Compuestos	Tratamiento							
		Control		12 h		24 h		48 h	
<b>Etanol</b>	<b>Acetato de etilo</b>	3.167.825 ±	325.152a	2.119.100 ±	411.463b	2.155.461 ±	67.074b	3.988.244 ±	810.563a
	<b>Butanoato de etilo</b>	21.557.625 ±	4.820.752b	38.988.891 ±	3.559.840a	36.420.579 ±	1.932.422a	7.017.077 ±	1.225.922c
	<b>Hexanoato de etilo</b>	1.306.906 ±	298.643a	1.565.883 ±	621.867a	1.188.642 ±	12.360a	1.211.812 ±	214.036a
	<b>Octanoato de etilo</b>	3 ±	1a	1 ±	0c	1 ±	1c	2 ±	0b
	<b>TOTAL</b>	<b>26.032.359</b>		<b>42.673.875</b>		<b>39.764.683</b>		<b>12.217.135</b>	
<b>Butanol</b>	<b>Butanoato de metilo</b>	1.128.641 ±	43.248b	1.293.504 ±	41.184a	1.413.709 ±	352.409ab	248.350 ±	39.800c
	<b>2-Metil 1-butanol</b>	3.020.459 ±	111.080b	1.934.461 ±	414.946c	4.559.525 ±	202.760a	4.586.630 ±	152.491a
	<b>Butanoato de etilo</b>	21.557.625 ±	4.820.752a	24.640.649 ±	204.956a	24.733.217 ±	4.434.022a	7.802.806 ±	1.036.069b
	<b>Acetato de butilo</b>	305.997 ±	52.844a	212.203 ±	22.841b	353.209 ±	58.654a	241.071 ±	43.012b
	<b>Acetato de 2-metilbutilo</b>	61.412 ±	12.277a	32.798 ±	4.100b	54.631 ±	15.797a	77.835 ±	13.232a
	<b>Butanoato de propilo</b>	52.752 ±	7.332b	29.374 ±	3.053d	39.979 ±	901c	66.300 ±	1.276a
	<b>Butanoato de butilo</b>	3.699.975 ±	908.422b	2.324.090 ±	170.927c	4.407.108 ±	758.932b	9.879.306 ±	875.884a
	<b>Hexanoato de butilo</b>	53.886 ±	12.483a	8.697 ±	664c	24.672 ±	2.489b	64.251 ±	5.082a
	<b>Butanoato de hexilo</b>	5.621.420 ±	1.331.471b	2.774.566 ±	281.124c	6.750.186 ±	340.172b	13.219.567 ±	2.784.035a
<b>TOTAL</b>	<b>35.502.167</b>		<b>33.250.342</b>		<b>42.336.236</b>		<b>36.186.116</b>		
<b>Hexanol</b>	<b>1-Hexanol</b>	627.829 ±	19.921c	1.397.235 ±	198.511a	828.831 ±	107.750b	712.586 ±	87.252bc
	<b>Hexanoato de metilo</b>	2.578 ±	520d	4.075 ±	352c	6.860 ±	45b	7.148 ±	181a
	<b>Hexanoato de etilo</b>	1.025.796 ±	100.820a	670.982 ±	36.929b	762.343 ±	95.972b	1.067.248 ±	111.966a
	<b>Acetato de hexilo</b>	213.853 ±	25.153a	187.826 ±	15.908a	110.966 ±	24.255b	149.971 ±	40.857ab
	<b>Hexanoato de butilo</b>	53.886 ±	12.483ab	24.822 ±	2.866c	44.158 ±	7.640b	73.055 ±	15.697a
	<b>Butanoato de hexilo</b>	5.621.420 ±	1.331.471b	1.803.660 ±	31.169c	6.034.566 ±	538.150b	11.258.690 ±	2.072.001a
	<b>TOTAL</b>	<b>7.545.362</b>		<b>4.088.600</b>		<b>7.787.724</b>		<b>13.268.698</b>	
<b>Octanol</b>	<b>Octanoato de etilo</b>	3 ±	1c	1 ±	0c	1.689 ±	23b	2.083 ±	213a
	<b>TOTAL</b>	<b>3</b>		<b>1</b>		<b>1.689</b>		<b>2.083</b>	

Los valores corresponden a promedios de tres réplicas por tratamiento  $\pm$  ES. Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de una vía con Tukey HSD como prueba de comparación múltiple a posteriori;  $P \leq 0,05$ ) entre los tratamientos para cada volátil. Los compuestos fueron identificados por GC-MS y confirmados con estándares comerciales. Para cada alcohol suministrado se presentan sólo los compuestos volátiles relacionados con éste.

**Tabla 4.** Umbrales odoríficos, valores de actividad y descripción aromática de compuestos volátiles producidos por frutos de *Physalis peruviana* L., después del tratamiento exógeno con alcoholes.

Suministro	Compuestos	OT (ppm)	<i>Log<sub>10</sub> OV</i>				Descripción aromática	
			Control	12 h	24 h	48 h		
<b>Etanol</b>	<b>Acetato de etilo</b>	5	5,8	5,6	5,6	5,9	Afrutado, piña, anís	
	<b>Butanoato de etilo</b>	0,001	10,3	10,6	10,6	9,8	Frutas maduras, piña, plátano	
	<b>Hexanoato de etilo</b>	0,001	9,1	9,2	9,1	9,1	Manzana, plátano, piña, etéreo	
	<b>Octanoato de etilo</b>	0,092	1,5	1,0	1,0	1,3	Fruta madura, dulce, pera	
<b>Butanol</b>	<b>Butanoato de metilo</b>	0,076	7,2	7,2	7,3	6,5	Afrutado, dulce	
	<b>2-Metil 1-butanol</b>	0,3	7,0	6,8	7,2	7,2	Dulce, floral, afrutado	
	<b>Butanoato de etilo</b>	0,001	10,3	10,4	10,4	9,9	Frutas maduras, piña, plátano	
	<b>Acetato de butilo</b>	0,066	6,7	6,5	6,7	6,6	Afrutado, dulce, floral, geranio	
	<b>Acetato de 2-metilbutilo</b>	0,005	7,1	6,8	7,0	7,2	Manzana, plátano	
	<b>Butanoato de propilo</b>	0,124	5,6	5,4	5,5	5,7	Piña, damasco	
	<b>Butanoato de butilo</b>	0,1	7,6	7,4	7,6	8,0	Manzana, pera, durazno, plátano	
	<b>Hexanoato de butilo</b>	0,7	4,9	4,1	4,5	5,0	Manzana roja, afrutado	
	<b>Butanoato de hexilo</b>	0,25	7,4	7,0	7,4	7,7	Manzana	
	<b>Hexanol</b>	<b>1-Hexanol</b>	0,5	6,1	6,4	6,2	6,2	Notas verdes, floral, terroso
		<b>Hexanoato de metilo</b>	0,084	4,5	4,7	4,9	4,9	Afrutado, piña
<b>Hexanoato de etilo</b>		0,001	9,0	8,8	8,9	9,0	Manzana, plátano, piña, etéreo	
<b>Acetato de hexilo</b>		0,002	8,0	8,0	7,7	7,9	Afrutado, manzana, pera, cereza, dulce	
<b>Hexanoato de butilo</b>		0,7	4,9	4,5	4,8	5,0	Manzana roja, afrutado	
<b>Butanoato de hexilo</b>		0,25	7,4	6,9	7,4	7,7	Manzana	
<b>Octanol</b>	<b>Octanoato de etilo</b>	0,092	1,5	1,0	4,3	4,4	Fruta madura, dulce, pera	

Los valores  $Log_{10} OV = Log_{10} C/OT$  fueron calculados con OTs determinados en agua, reportados en literatura [Flath et al., 1967; Takoeka et al., 1990; 1992; Pino & Mesa, 2006]. Descripción aromática obtenida de Balbontín et al. [2007].

#### 4. DISCUSIÓN

Es posible distinguir cuatro estados de maduración bien diferenciados en frutos de *P. peruviana*: VI, VM, AAM y AM. A medida que el fruto de goldenberry se desarrolla y madura, se aprecia un cambio en la coloración, la que pasa de color verde a anaranjado, lo que va acompañado de un incremento en el peso del goldenberry.

Junto con los cambios evidenciados en frutos de *P. peruviana* durante el desarrollo y la maduración, el descenso de la firmeza del goldenberry se inicia luego del estado VM, y disminuye marcadamente entre los estados AAM y AM, coincidente con el inicio de la fase climatérica caracterizada por el incremento de la tasa respiratoria y en la producción de etileno.

El perfil de compuestos volátiles producido durante la maduración de frutos de *P. peruviana* fue analizado por el método “headspace-SPME”, lo que permitió determinar en goldenberry diferentes compuestos volátiles de aroma. Un total de 16 compuestos volátiles fueron cuantificados en frutos de *P. peruviana*. Dentro de ellos, 10 ésteres y 2 alcoholes ya habían sido reportados previamente empleando procedimientos de extracción líquido/líquido a partir de pulpa de frutos de *P. peruviana* maduros [Berger et al., 1989; Yilmaztekin, 2014b]. Por otro lado, los ésteres acetato de etilo, butanoato de propilo, hexanoato de butilo y butanoato de hexilo no habían sido reportados previamente en goldenberry, no obstante ellos han sido descritos en otros frutos como pera, damasco, manzana y kiwi [Takeoka et al, 1990, 1992; Argenta et al, 2003; Altisent et al, 2009; Günther et al., 2011]. Es probable que el bajo peso molecular y la elevada volatilidad del acetato de etilo expliquen su ausencia en las extracciones previas de aroma utilizando extracción líquido/líquido; en tanto, la baja concentración de los otros compuestos explicaría porque no fueron reportados previamente.

Los frutos de *P. peruviana* producen una diversidad de ésteres de diferente estructura química. Los ésteres principales determinados en goldenberry fueron butanoato de etilo, butanoato de hexilo, acetato de butilo, acetato de hexilo, hexanoato de etilo, benzoato de metilo y octanoato de etilo, los cuales incrementaron su concentración durante la maduración.

El aroma de goldenberry es proporcionado principalmente por ésteres. Los ésteres más importantes para el aroma de fruto maduro de *P. peruviana* corresponden a butanoato de etilo, acetato de hexilo y hexanoato de etilo, compuestos que presentaron valores de umbral odorífico (OT) entre los más bajos (0,001–0,002 ppm). Los ésteres alifáticos lineales son, en general, más abundantes que aquellos de cadena ramificada. Estos hallazgos están de acuerdo con los reportados por Berger et al. [1989] y Yilmaztekin [2014b] respecto a la naturaleza química de los principales componentes del aroma en goldenberry.

Debido a su importancia en la contribución al aroma de goldenberry, de los más de 30 compuestos volátiles identificados en frutos de *P. peruviana*, un total de 16 compuestos fueron cuantificados durante el proceso de desarrollo y maduración de éstos. Este grupo comprende a componentes que tienen alto impacto en el perfil aromático de goldenberry. Para los volátiles de aroma determinados, el análisis de componentes principales permitió clasificar los compuestos volátiles de acuerdo a su patrón de producción durante la maduración de goldenberry, agrupándolos en: aquellos que incrementan su concentración a medida que avanza la maduración (Grupos 1, 2 y 3) y compuestos producidos tempranamente los cuales disminuyen su concentración durante la maduración (Grupos 4 y 5). Considerando el análisis de componentes principales, se puede inferir que, el incremento en la concentración de algunos compuestos volátiles está estrechamente asociado al aumento del nivel de etileno, compuesto que agrupa con los volátiles del Grupo 2.

Los ésteres son sintetizados por acción de la enzima alcohol aciltransferasa (AAT). En frutos de *P. peruviana* la actividad AAT total presentó un incremento durante la maduración asociado con un aumento en la emisión de: butanoato de etilo, butanoato de hexilo, acetato de butilo, acetato de hexilo, hexanoato de etilo, benzoato de metilo y octanoato de etilo. El incremento en la actividad enzimática de AAT durante la maduración de goldenberry, explica el pronunciado incremento en la producción de estos volátiles de aroma.

El aumento en la emisión de los ésteres butanoato de etilo; butanoato de propilo, butanoato de butilo y butanoato de hexilo; hexanoato de metilo, hexanoato de butilo y butanoato

de hexilo; y octanoato de etilo, fue facilitado por la disponibilidad de los alcoholes precursores (etanol, butanol, hexanol y octanol, respectivamente) suministrados de forma exógena. Lo cual sugiere que el aumento de estos ésteres en frutos de *P. peruviana* también depende de la disponibilidad de sustrato.

Por otro lado, el incremento en la producción de butanoato de butilo después del suministro exógeno de butanol, además del aumento de hexanoato de metilo y hexanoato de butilo con hexanol, sugieren que el aumento de estos ésteres resultó de una mayor disponibilidad de sustrato en lugar de una actividad enzimática aumentada, ya que sus mayores concentraciones las presentaron frutos en estados AAM.

Los resultados sugieren que la formación de ésteres durante la maduración de goldenberry depende de la actividad AAT y de la disponibilidad de sustratos. Ello nos permite señalar que la producción de ciertos volátiles está siendo restringida por la baja disponibilidad de sustratos en la fruta y predecir que es factible incrementar el perfil aromático del fruto mediante el suministro exógeno de alcoholes.

Considerando los resultados, el tratamiento con alcoholes exógenos puede ser una opción para mejorar la calidad organoléptica de goldenberry, o aplicar estrategias similares a otros frutos. Ello permitiría incrementar la producción de volátiles de aroma en fruta bajo condiciones de amacenaje u otros tratamientos que retrasan o detienen el avance de madurez con el fin de extender la vida de post-cosecha. El uso de alcoholes exógenos podría aumentar la emisión de compuestos relacionados al aroma de un fruto, de tal forma de potenciar las propiedades organolépticas consiguiendo así un fruto de mejor calidad de consumo.

## **CAPÍTULO III**

### **Aislamiento y actividad transcripcional del gen alcohol aciltransferasa (*PhpAAT1*) de *Physalis peruviana***

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Genes involucrados en la generación de ésteres en goldenberry

La concentración de un determinado compuesto volátil depende de la actividad de las enzimas encargadas de su biosíntesis, de la especificidad de sustrato de ellas y de la disponibilidad de sustratos [Fellman et al., 1993; Rizzolo et al., 2006]. En goldenberry los ésteres son los compuestos volátiles mayoritariamente producidos durante la maduración del fruto, compuestos que poseen un elevado impacto sensorial y son generados por acción de las enzimas aciltransferasas (ATs). Las aciltransferasas son miembros de la superfamilia BAHD [Shalit et al., 2003; Gang, 2005; Souleyre et al., 2005; D'Auria, 2006] dentro de las cuales hay dos subfamilias que presentan actividad alcohol aciltransferasa (AAT) [Schaffer et al., 2007]. Estas enzimas catalizan la transferencia de un grupo acil desde un donador acil-CoA al grupo hidroxilo de un alcohol, amino o tiol de una molécula aceptora, produciendo un derivado acil éster (**Figura 4**).

Las enzimas aciltransferasas dependientes de acil-CoA encontradas en plantas son en general monoméricas, catalizan reacciones de transferencia de grupos acil, malonil, benzoil e hidroxicinamoil, y poseen masas moleculares entre 48 y 55 kDa [D'Auria, 2006]. Variados estudios han demostrado que la temperatura óptima de actividad enzimática es  $\sim 30^{\circ}\text{C}$  y el rango de pH está entre 7,0–8,5 [D'Auria, 2006]. Estas enzimas tienen localización citoplasmática y no se han detectado péptidos de tránsito u otras secuencias de destinación a organelos celulares o vías de secreción en sus secuencias. Con respecto a su actividad, se ha demostrado estar fuertemente asociada a la presencia de residuos de histidina en motivos conservados de su secuencia aminoacídica [De Luca et al., 1985; St Pierre et al., 1998; Walker & Croteau, 2000]. La actividad AAT es responsable de la producción de ésteres volátiles observada en tejidos vegetales tales como flores y frutos [Ueda et al., 1997; Dudareva et al., 1998; Aharoni et al., 2000]. La producción de ésteres en frutas es el resultado de la esterificación de alcoholes y acil-CoAs en una reacción dependiente de oxígeno catalizada por AAT, la cual en manzanas es más activa en la epidermis [Li et al., 2006].

## 1.2. Superfamilia BAHD de aciltransferasas

Las AATs pertenecen a la gran familia de aciltransferasas llamada BAHD, cuyo nombre fue proporcionado por las siglas de las primeras cuatro enzimas de esta familia en ser caracterizadas (BEAT, AHCT, HCBT y DAT). Enzimas que incluyen dos acetiltransferasas, Bencilalcohol *O*-acetiltransferasa (BEAT), aislada desde *Clarkia breweri* y responsable de la producción de bencil acetato [Dudareva et al., 1998], y Deacetilvindolina 4-*O*-acetiltransferasa (DAT) de *Catharanthus roseus* que participa en la síntesis del alcaloide vindolina [St. Pierre et al., 1998]. Las otras enzimas son benzoil/hidroxicinamoil CoA aciltransferasas, Antranilato *N*-hidroxicinamoil/benzoiltransferasa (HCBT), aislada desde *Dianthus caryophyllus*, la cual produce un grupo de fitoalexinas conocidas como antramidas [Yang et al., 1997], y Antocianina *O*-hidroxicinamoiltransferasa (AHCT) aislada de la especie *Genciana trifolia* [Fujiwara et al., 1998].

La superfamilia BADH es una familia muy amplia y divergente, cuyos miembros presentan bajos niveles de identidad de secuencia, entre 25–34%, a pesar de que sus estructuras secundarias son altamente conservadas. Los miembros de la familia BAHD presentan dos dominios altamente conservados, el dominio HxxxD que se encuentra en la región central de la secuencia polipeptídica y que ha demostrado tener una importante función en el mecanismo de catálisis, específicamente en la transferencia de grupos acil-CoA y alcohol en las enzimas [Shaw, 1992]. El otro dominio importante es el motivo DFGWG, que se encuentra cercano al extremo carboxilo terminal de la enzima y que tendría una función estructural. La obtención de la estructura cristalográfica de la enzima Vinorina sintasa, una acetiltransferasa aislada desde la planta *Rauvolfia serpentine*, ha permitido dilucidar el mecanismo de catálisis y la función de los motivos conservados en la actividad y estructura de las enzimas pertenecientes a esta familia [Ma et al., 2005].

### 1.3. Análisis filogénico y predicción de actividad de aciltransferasas BAHD

Las enzimas de la familia BAHD pueden ser agrupadas en cinco clados, considerando su cercanía filogenética. Esta agrupación, además, coincide con el tipo de sustrato utilizado por las enzimas y las condiciones bajo las cuales los genes y enzimas que ellos codifican son activados [D'Auria, 2006]. El primer grupo está constituido principalmente por genes que codifican enzimas involucradas en la modificación de glucósidos fenólicos, predominantemente antocianinas. Muchas de las enzimas de este clado comparten el motivo [Tyr-Phe-Gly-Asn-Cys], además de los dos motivos previamente mencionados de las aciltransferasas BAHD. En el segundo grupo se ubican los genes *Glossy2* aislado desde *Zea mays* y *CER2* aislado desde *Arabidopsis thaliana*, genes que codifican enzimas involucradas en la formación y extensión de ceras epicuticulares de cadena larga [Xia et al., 1996].

La mayoría de los miembros BAHD agrupados en el tercer clado aceptan diversos alcoholes como sustrato y acetyl-CoA como el principal donador de acilos. Una subdivisión de este clado incluye aciltransferasas involucradas en la modificación de alcaloides, y una segunda subfamilia constituida de aciltransferasas que participan en la biosíntesis de ésteres en flores y durante la maduración de frutos. El cuarto grupo está representado solo por el gen de la enzima Agmatina cumaroiltransferasa (ACT), la cual acila nitrógeno formando la amida correspondiente. ACT presenta una ligera modificación en el motivo DFGWG, en el cual una glicina ha sido reemplazada por triptófano [Burhenne et al., 2003]. El quinto clado está dividido en varios subgrupos, uno de los cuales está constituido por enzimas relacionadas con la síntesis de ésteres volátiles del tipo benzenoides en flores y frutos. El segundo subgrupo presenta enzimas que participan en la síntesis de paclitaxol, caracterizadas en gimnospermas [Walker & Croteau, 2000]. El último subgrupo del quinto clado incluye enzimas que utilizan hidroxicinamoil/benzoil CoA como donador de acilos, tales como enzimas responsables de la formación de ésteres de hidroxicinamoil quinato y shikimato para la síntesis de lignina en *Nicotiana* y *A. thaliana* [Hoffmann et al., 2003; 2005].

Debido a que frutos de goldenberry producen niveles elevados de ésteres y con capacidad odorífica, se plantea aislar y caracterizar el/los genes que participan de la biosíntesis de ésteres en goldenberry.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Material vegetal

A partir de frutos de *P. peruviana* ecotipo Colombia, colectados y clasificados en los diferentes estados de maduración, se prepararon replicas de 10 frutos cada una, para cada estado de maduración. La fruta fue trozada e inmediatamente congelada en nitrógeno líquido y mantenida a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Hojas y flores también fueron colectadas, congeladas en nitrógeno líquido y mantenidas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### 2.2. Extracción y purificación de ácidos nucleicos

#### 2.2.1. Extracción de RNA

La extracción de RNA total se realizó de acuerdo al método CTAB, siguiendo la metodología descrita por Chang et al. [1993]. El RNA total (1  $\mu\text{g}$ ) fue extraído desde frutos de cada uno de los cuatro estados de maduración. Además, se obtuvo RNA total de tejidos vegetativos de *P. peruviana* correspondientes a flores y hojas. Para la extracción de RNA total, se pulverizaron 4 g de tejido congelado con nitrógeno líquido en mortero. El material pulverizado se incubó en 15 mL de tampón de extracción (2% (p/v) CTAB; 2,5% (p/v) PVP40; 100 mM Tris-HCl (pH 8,0); 25 mM EDTA; 2 M NaCl, más 2% (v/v)  $\beta$ -mercaptoetanol) a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 15 min mezclando por inversión. Posteriormente, se agregaron 15 mL de una solución de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y centrifugó a 10000 rpm por 25 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se recuperó el sobrenadante, se adicionó igual volumen de solución cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), y se centrifugó nuevamente a 10000 rpm por 25 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Al sobrenadante obtenido, se agregó 10 M LiCl ( $\frac{1}{4}$  del volumen recuperado), se

mezcló suavemente por inversión y dejó precipitar durante toda la noche a 4°C. Después de centrifugar a 10000 rpm por 25 min y 4°C, el pellet se resuspendió con 500 µL del tampón SSTE (1 M NaCl; 0,5% (p/v) SDS; 10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM EDTA (pH 8,0)) a 65°C con agitación suave. La mezcla se traspasó a tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, se agregó 1 volumen de solución cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y centrifugó a 15000 rpm por 20 min a 4°C. Al sobrenadante recuperado, se agregaron 2,5 volúmenes de etanol absoluto e incubó durante 30 min a -80°C. Finalmente, se centrifugó a 15000 rpm por 20 min a 4°C, y el pellet resultante fue resuspendido con 30 µL de H<sub>2</sub>O-DEPC (1% DEPC) a 65°C. La integridad del RNA se verificó a través de electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en tampón TAE 1x (40 mM Tris-HCl; 20 mM ácido acético; 2 mM EDTA pH 8,0), de una muestra de 1 µL, antes de realizar la síntesis de cDNA.

### 2.2.2. Síntesis de cDNA

Para sintetizar cDNA a partir de mRNA, el RNA total fue tratado con DNAsa I grado amplificación (Invitrogen™, Thermo Fisher Cientific Inc., Waltham, MA, USA). Se trataron 30 µL de muestra con 2 µL de DNAsa I (1 U/µL), de acuerdo al siguiente protocolo de incubación: 15 min a 25°C y 10 min a 65°C para la inactivación de la enzima. La purificación del RNA se realizó de acuerdo al protocolo “RNA Clean-up” (RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN, Hilden, Alemania). El volumen de la muestra se ajustó a 100 µL con agua libre de RNAsa y se procedió siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la elución del RNA, la mini columna se dispuso sobre un tubo de colecta (1,5 mL), se adicionaron 30 µL de H<sub>2</sub>O-DEPC a 65°C directamente sobre la membrana de sílica gel y se centrifugó por 1 min a 14000 rpm. La concentración del RNA purificado se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm en espectrofotómetro, NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA), y se expresó como µg/µL.

El RNA recuperado se conservó a -80°C. A partir de 1 µg de RNA total se sintetizó cDNA, utilizando el kit “First Strand cDNA Synthesis” (Fermentas GmbH, Ontario, Canadá) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En un microtubo de 0,6 mL se agregó al RNA 1

$\mu\text{L}$  del partidor Oligo  $(\text{dT})_{18}$ , 4  $\mu\text{L}$  de tampón de reacción 5x, 2  $\mu\text{L}$  de inhibidor de RNasa RiboLock (20 U/ $\mu\text{L}$ ), 2  $\mu\text{L}$  de transcriptasa reversa M-MuLV (20 U/ $\mu\text{L}$ ), 2  $\mu\text{L}$  de la mezcla de dNTPs 10 mM, y agua libre de nucleasas hasta un volumen total de 20  $\mu\text{L}$ , y se realizó el siguiente protocolo de incubación: 60 min a 37°C, 5 min a 70°C y mantención a 4°C. El cDNA sintetizado se conservó a -20°C.

### 2.2.3. Síntesis de RACE cDNA

Previo a la síntesis de cDNA para las reacciones de RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends), se verificó la integridad del RNA total. Integridad evaluada mediante la estimación de la relación 28S:18S en gel de agarosa. Razón cuyo valor teórico para RNAs eucarióticos es aproximadamente 2:1. Para la síntesis de RACE cDNA con el kit “SMARTer™ RACE cDNA Amplification” (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA, USA) la pureza e integridad del RNA es un factor importante para la obtención del cDNA, descartando por lo tanto, RNAs con relaciones 28S:18S inferiores a 1.

Posteriormente, a partir de 1  $\mu\text{g}$  de RNA total se realizó la síntesis de RACE cDNA de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para la síntesis de 5'-RACE cDNA, en tubos de microcentrífuga se mezclaron 2,75  $\mu\text{L}$  de RNA y 1  $\mu\text{L}$  del 5'-CDS Primer A (5'-(T)<sub>25</sub>VN-3', donde N = A, C, G, o T; V = A, G, o C). Para sintetizar el 3'-RACE cDNA se mezclaron 3,75  $\mu\text{L}$  de RNA y 1  $\mu\text{L}$  del 3'-CDS Primer A (5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA C(T)<sub>30</sub>VN-3', donde N = A, C, G, o T; V = A, G, o C), y se realizó el siguiente protocolo de incubación: 3 min a 72°C, 2 min a 42°C y mantención a 4°C. Después de centrifugar a 14000 $\times g$  por 10 s, se adicionó 1  $\mu\text{L}$  del Oligo SMARTer II A (5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CXX XXX-3', donde X = base no revelada) solo al tubo para la síntesis del 5'-RACE cDNA.

La síntesis del 5'- y 3'-RACE cDNA se completó agregando a cada tubo 2  $\mu\text{L}$  del tampón 5x First-Strand, 1  $\mu\text{L}$  de DTT 20 mM, 1  $\mu\text{L}$  de la mezcla de dNTPs 10 mM, 0,25  $\mu\text{L}$  de inhibidor de RNasa (40 U/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de transcriptasa reversa SMARTScribe™ (100 U/ $\mu\text{L}$ ),

y se realizó el siguiente ciclo térmico: 90 min a 42°C, 10 min a 70°C y mantención a 4°C. Los 5'- y 3'-RACE cDNAs fueron diluidos con 100 µL de tampón Tricina-EDTA (10 mM Tricina-KOH (pH 8,5); 1 mM EDTA) y conservados a -20°C.

### 2.3. Aislamiento de la secuencia completa de AAT de *P. peruviana*

Para la obtención de la secuencia de AAT de *P. peruviana*, primero se diseñó una pareja de partidores degenerados PAAT1-F = 5'-TAY TAY CCH YTN GCH GGA MG-3' y PAAT1-R = 5'-YCC CCA TCC AAA RTY NCC-3', donde Y = C, T; H = A, C, T; N = A, T, C o G; M = A, C; y R = A, G. Partidores diseñados a partir de regiones conservadas de genes AATs reportados previamente en otras especies [Arenas, 2007].

Mediante reacciones de PCR, utilizando cDNA de frutos de *P. peruviana* se realizó la amplificación con los partidores PAAT1-F y PAAT1-R de acuerdo al siguiente protocolo: denaturación inicial a 94°C durante 3 min; 35 ciclos de denaturación a 94°C por 1 min; annealing de partidores a 55°C por 1 min; extensión a 72°C por 1 min; y un paso de extensión final a 72°C durante 20 min. De la secuencia generada, se diseñaron los partidores (Forward AAT Phys = 5'-GGG TTT CTC ACA AGT TGT CTG-3', Reverse AAT Phys = 5'-GGC AAG TCA TTG TTG TCT CTC-3', Forward RACE-AAT Phys = 5'-TTC TTG TTT GAT GGG CCT AGC ATC GCG A-3' y Reverse RACE-AAT Phys = 5'-TCG CGA TGC TAG GCC CAT CAA ACA AGA A-3') para completar la secuencia. Como resultados de las reacciones de PCR se generó un producto de amplificación de 500 pb (PhpAAT1p) el cual fue clonado al vector pSC-A-amp/kan utilizando el kit "StrataClone PCR Cloning" (Agilent) y posteriormente secuenciado (**Figura 11**).

Se realizó una búsqueda de similitud de la secuencia PhpAAT1p con la herramienta de alineamiento local (BLAST, National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA) [Altschul et al., 1990], la cual presentó alineamientos con diferentes AATs de frutos. Presentando una identidad del 42,9% y 43,6% con los genes de *Malus domestica* y *P. communis*, respectivamente [Arenas, 2007].

La extensión hacia los extremos 5' y 3', para obtener el cDNA de largo completo del gen AAT de *P. peruviana*, se realizó con el kit “SMARTer™ RACE cDNA Amplification” (Clontech) siguiendo las recomendaciones del fabricante con ligeras modificaciones. Para amplificar los extremos 5' y 3' se diseñaron partidores específicos para reacciones de RACE-PCR. Partidores que fueron diseñados en base a la secuencia PhpAAT1p con una zona de solapamiento entre ellos de aproximadamente 295 pares de bases, para confirmar las secuencias generadas. Los partidores utilizados en las reacciones de RACE-PCR-5' y -3' fueron: partidores gen específicos PhpAAT1\_RACE1\_5' = 5'-GGT CCC ATT AGG AAA GGA AGG TAC AAG C-3', PhpAAT1\_RACE1\_3' = 5'-AAA CGG GGG TCA AAG TCT TTC CAC CA-3' y el Universal Primer A Mix (UPM-L = 5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAA GCA GTG GTA TCA ACG CAG AGT-3', UPM-S = 5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GG GC-3') incluido en el kit de RACE.

Las reacciones de RACE-PCR se realizaron con el siguiente protocolo: 5 ciclos de denaturación a 94°C por 30 s; annealing de partidores a 58°C por 30 s; extensión a 72°C por 1 min; 35 ciclos de denaturación a 94°C por 30 s; annealing de partidores a 55°C por 30 s; extensión a 72°C por 1 min; y un paso de extensión final a 72°C durante 7 min. Posteriormente, todos los productos de amplificación resultantes de la extensión en sentido 5' y 3' fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa (**Figura 12**). Los fragmentos amplificados fueron purificados desde el gel usando el kit “UltraClean® 15 DNA Purification” (MO BIO Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA) y clonados mediante la estrategia de clonación TA en el vector pGEM®-T Easy (Promega, Madison, WI, USA) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Tres clones positivos por fragmento, confirmados por reacciones de PCR fueron secuenciados (Macrogen Inc., Seúl, Corea). Las secuencias obtenidas fueron ensambladas con el programa Vector NTI Advance™ 10 (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA) y el alineamiento de la secuencia generada para AAT de *P. peruviana* (PhpAAT1) contra el fragmento parcial obtenido con los partidores degenerados (PhpAAT1p) se realizó con el programa Bioedit Sequence Alignment Editor v7.0 (**Figura 13**).

De la secuencia generada por ensamble de los productos de RACE-PCR, se diseñaron los partidores PhpAAT1-FI = 5'-ATG GGG GAG GAA AAT AGA TCT CTA GC-3' y PhpAAT1-RT2 = 5'-TTA TAT AAT GGC GGC AAA AGC TAA TA-3'. Oligonucleótidos diseñados específicamente para la zona de inicio y término de la traducción, con el fin de clonar el cDNA de largo completo para AAT de *P. peruviana* (*PhpAAT1*). El cDNA de largo completo fue obtenido desde frutos de *P. peruviana* mediante reacciones de PCR de acuerdo al siguiente protocolo: denaturación inicial a 95°C por 3 min; 35 ciclos de denaturación a 95°C por 30 s; annealing de partidores a 55°C por 45 s; extensión a 72°C por 1 min 45 s; y un paso de extensión final a 72°C durante 15 min. El producto de PCR fue purificado desde el gel, clonado en el vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy y secuenciado.

#### 2.4. Análisis de la secuencia *PhpAAT1*

La secuencia de nucleótidos fue analizada utilizando el programa Vector NTI Advance<sup>™</sup> 10 y la secuencia de aminoácidos deducida fue obtenida con la herramienta Translate de ExPASy. La búsqueda de similitud y la predicción de localización subcelular de la proteína se realizó con la herramienta de alineamiento local (BLAST, National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA) [Altschul et al., 1990] y la web basada en la herramienta WoLF PSORT [Horton et al., 2007] disponible en [wolfpsort.org](http://wolfpsort.org), respectivamente. El alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos se realizó utilizando el programa Bioedit Sequence Alignment Editor v7.0 [Hall, 1999]. El árbol filogenético fue construido usando el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis MEGA (versión 5; <http://www.megasoftware.net>) [Tamura et al., 2011] usando el método de Neighbor-Joining [Saitou & Nei, 1987] y análisis Bootstrap (1000 réplicas).

#### 2.5. Análisis de expresión por PCR en tiempo real (RT-qPCR)

La expresión relativa del gen AAT de *P. peruviana*, se determinó mediante PCR en tiempo real. Para ello, RNA total fue extraído desde frutos de cada estado de maduración (VI, VM, AAM y AM) y desde tejidos vegetativos de acuerdo a Chang et al. [1993], usando tres replicas biológicas de cada muestra. El RNA total fue tratado con DNase I (Fermentas) y

purificado utilizando el kit “RNeasy Plant Mini” (QIAGEN). La síntesis de cDNA de hebra simple se realizó con el kit “First Strand cDNA Synthesis” (Fermentas) siguiendo las instrucciones del fabricante. Partidores específicos para la región 3'-UTR de los genes *PhpAAT1* y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH1*; como control interno) fueron diseñados utilizando Vector NTI Advance™ 10, con alta rigurosidad para evitar la amplificación de productos de PCR inespecíficos y estructuras secundarias. Todos los partidores fueron probados por RT-PCR y los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. Los partidores gen específico utilizados fueron qPhpAAT1\_F (5'-GCT TGG GTT TGT TTG GAG GCA AA-3') y qPhpAAT1\_R (5'-GCG CCC ATT TTT AAC CAT TTC TGA A-3'), los que generaron un producto de amplificación de 153 pb para el gen *PhpAAT1*. Los partidores para el gen utilizado como control interno fueron GAPDH1-F (5'-TCC ATC ACT GCC ACC CAG AAG ACT G-3') y GAPDH1-R (5'-AGC AGG CAG AAC CTT TCC GAC AG-3'), los que produjeron un fragmento de 96 pb para *GAPDH1*.

Las reacciones de amplificación se realizaron con Brilliant® SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, en el termociclador de tiempo real Stratagene Mx3000P y analizadas con el software MxPro qPCR (Agilent Technologies). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: un ciclo de 95°C durante 10 min; seguido por 40 ciclos a 95°C por 15 s, 60°C por 15 s, 72°C por 20 s, un ciclo final de 95°C durante 1 min, y una curva de “melting” desde 55°C a 95°C con incrementos de 0,5°C/s. Para estimar la eficiencia de amplificación se prepararon diluciones seriadas, a partir de una mezcla de cDNAs de frutos de todos los estados de maduración, usando la mezcla de cDNAs como templado. Cada reacción se realizó en triplicado, usando agua como control negativo en cada corrida y la fluorescencia fue registrada al final de cada paso de “annealing”. La eficiencia de amplificación se estimó mediante una curva de “melting”, y los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa. Los niveles de expresión relativa primero fueron normalizados con el gene *GAPDH1*, y se usó la muestra de cDNA de frutos en el estado de maduración VI como calibrador (expresión relativa = 1). Los cálculos se realizaron de acuerdo al método descrito por Pfaffl [2001].

## 2.6. Expresión heteróloga de *PhpAAT1*

Para proceder con el clonamiento del gen, la secuencia de cDNA de largo completo para AAT de *P. peruviana* (*PhpAAT1*) se amplificó por PCR utilizando oligonucleótidos diseñados para la zona de inicio y término de la traducción del gen, en los cuales se incluyó además un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *EcoRI* y *XbaI*, respectivamente. Los partidores empleados fueron: *PhpAAT1-IF\_Erp* = 5'-GAA TTC ATG GGG GAG GAA AAT AGA TC-3' y *PhpAAT1-RT2r1* = 5'-TCT AGA TTA TAT AAT GGC GGC AAA AGC TAA TAA T-3'.

El producto amplificado fue clonado entre los sitios de restricción *EcoRI* y *XbaI* del vector pPICZ $\alpha$ B (Invitrogen) para la expresión regulada de la proteína en levaduras. El vector pPICZ $\alpha$ B utilizado, contiene el promotor AOX1 que regula la expresión inducida por metanol; el factor- $\alpha$  para secretar la proteína recombinante; el gen de resistencia a Zeocina™ (*Sh ble*) para la selección en *Escherichia coli* y *Pichia pastoris*; y un péptido en el extremo C-terminal que contiene el epítipo *c-myc* y una etiqueta de polihistidina (6xHis) para la detección y purificación de la proteína recombinante.

El constructo fue transformado en *E. coli* DH5 $\alpha$ ™ y los transformantes fueron seleccionados en placas Luria-Bertani (LB) agar bajo en sodio (< 90 mM NaCl) conteniendo Zeocina (25  $\mu$ g/mL). Posteriormente, la verificación del inserto se realizó en diez clones positivos mediante reacciones de PCR con partidores específicos para la secuencia *PhpAAT1* (*PhpAAT1-IF\_Erp* y *PhpAAT1-RT2r1*) combinados con partidores del vector (5'AOX1 *Pichia* Primer = 5'-GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC-3' y 3'AOX1 *Pichia* Primer = 5'-GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC-3') de acuerdo al siguiente protocolo: denaturación inicial a 95°C por 3 min; 35 ciclos de denaturación a 95°C por 30 s; annealing de partidores a 55°C por 45 s; extensión a 72°C por 1 min 45 s; y un paso de extensión final a 72°C durante 7 min.

### 2.6.1. Transformación de *Pichia pastoris*

Los plasmidios recombinantes verificados fueron amplificados y linearizados con la enzima de restricción *SacI*. La cepa de *Pichia pastoris* X-33 fue transformada por electroporación con los constructos linearizados, de acuerdo a los protocolos descritos por el proveedor. Posteriormente, las levaduras transformadas fueron seleccionadas en placas agar YPDS (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium with Sorbitol: 1% (p/v) extracto de levadura; 2% (p/v) peptona; 2% (v/v) dextrosa (glucosa); 1 M sorbitol; 2% (p/v) agar) más Zeocina (100 µg/mL) incubadas a 28°C durante 3 días hasta la formación de colonias. Las colonias de *Pichia* que crecieron en el medio selectivo fueron seleccionadas en 50 µL de Liticasa (Sigma) 50 U/mL en tampón TE (Tris-EDTA) pH 7,5, lisadas mediante incubaciones a 37°C durante 30 min y 95°C por 10 min. Del tratamiento con liticasa, 5 µL de las células se usaron como templado para las reacciones de PCR con los partidores PhpAAT1-IF\_Erp y PhpAAT1-RT2r1 combinados con partidores 5'AOX1 *Pichia* Primer y 3'AOX1 *Pichia* Primer siguiendo el protocolo descrito previamente, para confirmar los clones recombinantes de *Pichia* antes de proceder a la etapa de inducción.

### 2.6.2. Expresión y purificación de PhpAAT1 recombinante

Las colonias recombinantes seleccionadas fueron crecidas en 25 mL de medio BMGY (Buffered complex Medium containing Glycerol: 1% (p/v) extracto de levadura; 2% (p/v) peptona; 100 mM tampón fosfato de potasio (pH 6,0); 1,34% (v/v) YNB (yeast nitrogen base with ammonium sulfate and without amino acids); 4x10<sup>-5</sup>% (v/v) biotina; 1% (v/v) glicerol) durante 16–18 horas a 28°C con agitación (250 rpm) hasta obtener una OD<sub>600</sub> = 2–6. Las células fueron centrifugadas (2000×g por 5 min) y el pellet resuspendido en 150 mL de medio BMMY (Buffered complex Medium containing Methanol: 1% (p/p) extracto de levadura; 2% (p/v) peptona; 100 mM tampón fosfato de potasio (pH 6,0); 1,34% (v/v) YNB; 4x10<sup>-5</sup>% (v/v) biotina; 0,5% (v/v) metanol) e incubado durante 3 días a 28°C con agitación. Metanol fue adicionado al medio cada 24 h a una concentración final del 0,5% (v/v). Las células colectadas fueron centrifugadas a 3000×g por 5 min, el sobrenadante recuperado fue filtrado (filtro para jeringa de 0,45 µm), precipitado con sulfato de amonio sólido hasta 80% de saturación a 4°C,

y posteriormente centrifugado a 12000×g durante 30 min. El pellet obtenido fue resuspendido en tampón 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0) y desalado en columnas Sephadex G-25.

La purificación de proteína se realizó con la resina BD Talon Metal Affinity (BD Biosciences) de afinidad por la cola de polihistidina (6xHis). Las proteínas fueron mezcladas con la resina en presencia del tampón A (50 mM fosfato de sodio (pH 7,5); 10% (v/v) glicerol, 0,3 M NaCl y 2 mM β-mercaptoetanol), para permitir la fijación de la proteína recombinante. Luego de remover las proteínas no adheridas, las proteínas fueron eluidas con tampón A conteniendo 150 mM imidazol. Las proteínas purificadas fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%, con tinción azul de Coomassie. La concentración de proteínas fue determinada por el método Bradford [1976].

## 2.7. Análisis estadístico

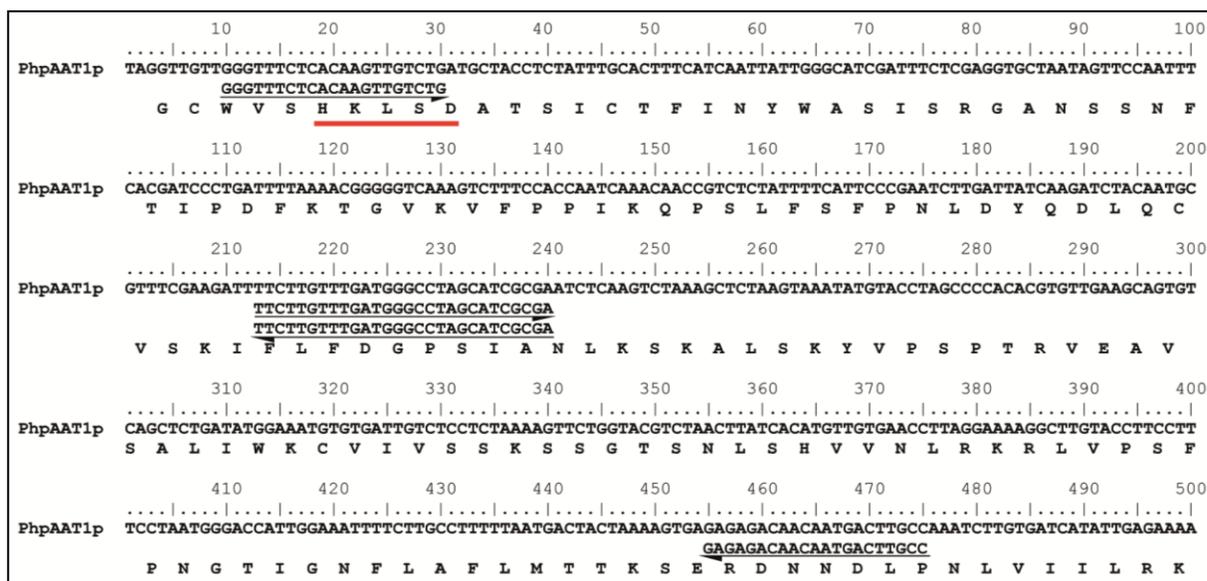
Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, utilizando grupos de frutos en diferentes estados de maduración, hojas y flores de *P. peruviana*. Las determinaciones se realizaron con tres réplicas, y el análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa computacional SPSS v17.0. Los datos experimentales fueron tratados mediante un ANOVA de una vía y las diferencias significativas entre los promedios se determinaron por la prueba de Scheirer-Ray-Hare, una extensión de la prueba Kruskal-Wallis, y la prueba de Mínima Diferencia Significativa de Fischer (LSD) para evaluar la expresión de *PhpAAT1* con un nivel de significancia  $\alpha = 0,05$  y un intervalo de confianza del 95%  $P \leq 0,05$  [Sokal & Rohlf, 1995].

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Aislamiento del gen *PhpAAT1* desde goldenberry

Se aisló un putativo gen AAT desde frutos maduros de *P. peruviana* usando como primera aproximación, partidores degenerados diseñados desde regiones conservadas de las

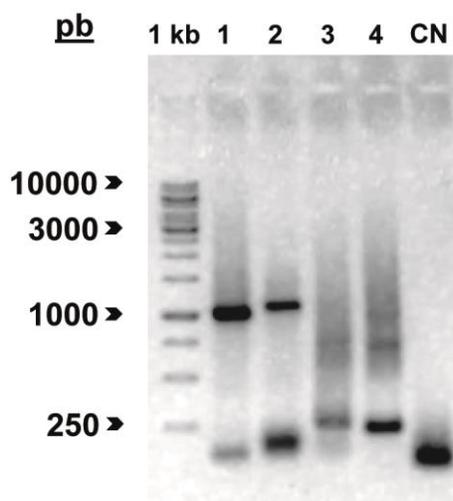
secuencias de genes de la superfamilia BAHD. Un fragmento de 500 pb (PhpAAT1p) con homología a secuencias AAT fue inicialmente obtenido mediante reacciones de PCR, el cual fue usado como templado para diseñar partidores de RACE-PCR-5' y -3' (**Figura 11**).



**Figura 11.** Secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida para PhpAAT1p. El motivo del sitio activo HxxxD característico de las AATs se muestra subrayado en color rojo. Los partidores Forward AAT Phys, Forward RACE-AAT Phys, Reverse RACE-AAT Phys y Reverse AAT Phys usados para la obtención del fragmento PhpAAT1p se muestran posicionados. Los partidores fueron diseñados utilizando la secuencia amplificada con partidores degenerados (PAAT1-F y PAAT1-R) como templado. La secuencia de aminoácidos fue obtenida con la herramienta Translate de ExPASy: SIB Bioinformatics Resource Portal (<http://www.expasy.org>) [Artimo et al., 2012].

De las reacciones de RACE-PCR-5' se obtuvo un fragmento de 1051 pb con el partidior PhpAAT1\_RACE1\_5' (con 412 pb sobrelapadas con PhpAAT1p) (**Figura 12**). Posteriormente, utilizando esta secuencia como templado se diseñó el partidior PhpAAT1\_RACE2\_5' = 5'-GGA CAA GGA ACT TTC TAG TCG TAA GGA TTT-3', para confirmar la amplificación hacia el extremo 5', obteniendo un fragmento de 414 pb. Ambas

secuencias fueron ensambladas con el programa Vector NTI v10, generando un fragmento de 1051 pb (con 412 pb sobrelapadas con el fragmento parcial). La amplificación mediante RACE-PCR-3' generó un fragmento de 1043 pb con el partidor PhpAAT1\_RACE1\_3' (con 382 pb sobrelapadas a PhpAAT1p) (**Figura 12**).



**Figura 12.** Electroforesis de productos obtenidos por RACE-PCR. Fragmentos amplificados por reacciones de RACE-PCR-5' y -3' para el putativo gen AAT de *P. peruviana*. Gel de agarosa al 1,5%. 1 Kb, marcador de peso molecular; carril 1, amplificación 3' (1043 pb); carril 2, amplificación 5' (1051 pb); carril 3, amplificación con cDNA de hojas; carril 4, amplificación con cDNA de flores; CN, control negativo.

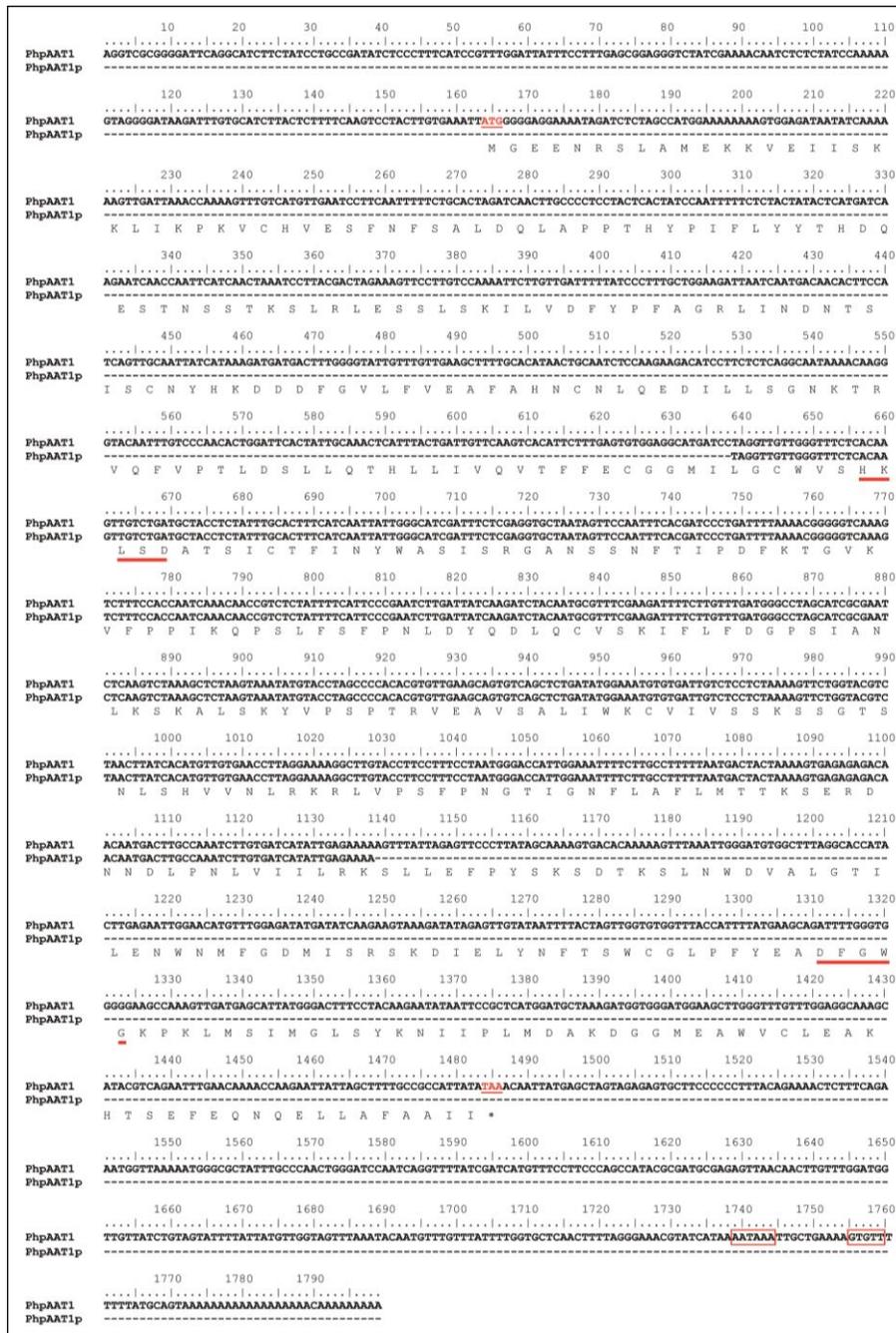
Una secuencia de cDNA compuesta de 1799 pb nombrada *PhpAAT1* (GeneBank accession number **JQ771938**) fue generada a partir de todos los fragmentos, la cual presentó una región de sobrelapamiento con la secuencia PhpAAT1p entre los 639–1138 pb (**Figura 13**). El análisis de la secuencia *PhpAAT1* reveló un marco de lectura abierto (ORF) de 1320 pb, que codifica una secuencia polipeptídica deducida de 440 aminoácidos. La AAT1 deducida para *P. peruviana*, presentó una masa molecular calculada de 49,5 kDa y un punto isoeléctrico teórico de 6,51, parámetros obtenidos con la herramienta ProtParam de ExPASy.

El cDNA contiene una región 5'-UTR de 163 nucleótidos y una región 3'-UTR de 316 nucleótidos que incluye el codón de termino (TAA), las putativas señales consenso de poliadenilación (AATAA) y (GTGTT), y la cola de poli(A) (**Figura 13**). La secuencia aminoacídica de *PhpAAT1* presentó los dos motivos característicos de la superfamilia BAHD de aciltransferasas de plantas: el motivo del sitio activo HxxxD (aminoácidos 165–169) y el motivo altamente conservado localizado hacia el C-terminal DFGWG (aminoácidos 383–387) (**Figura 13**). Un alineamiento múltiple de *PhpAAT1* con otras secuencias AATs de flores o frutos de diferentes especies de plantas mostró un bajo nivel de conservación de aminoácidos, con un nivel de conservación aminoacídica restringido, principalmente a los motivos funcionales y estructurales importantes de la enzima.

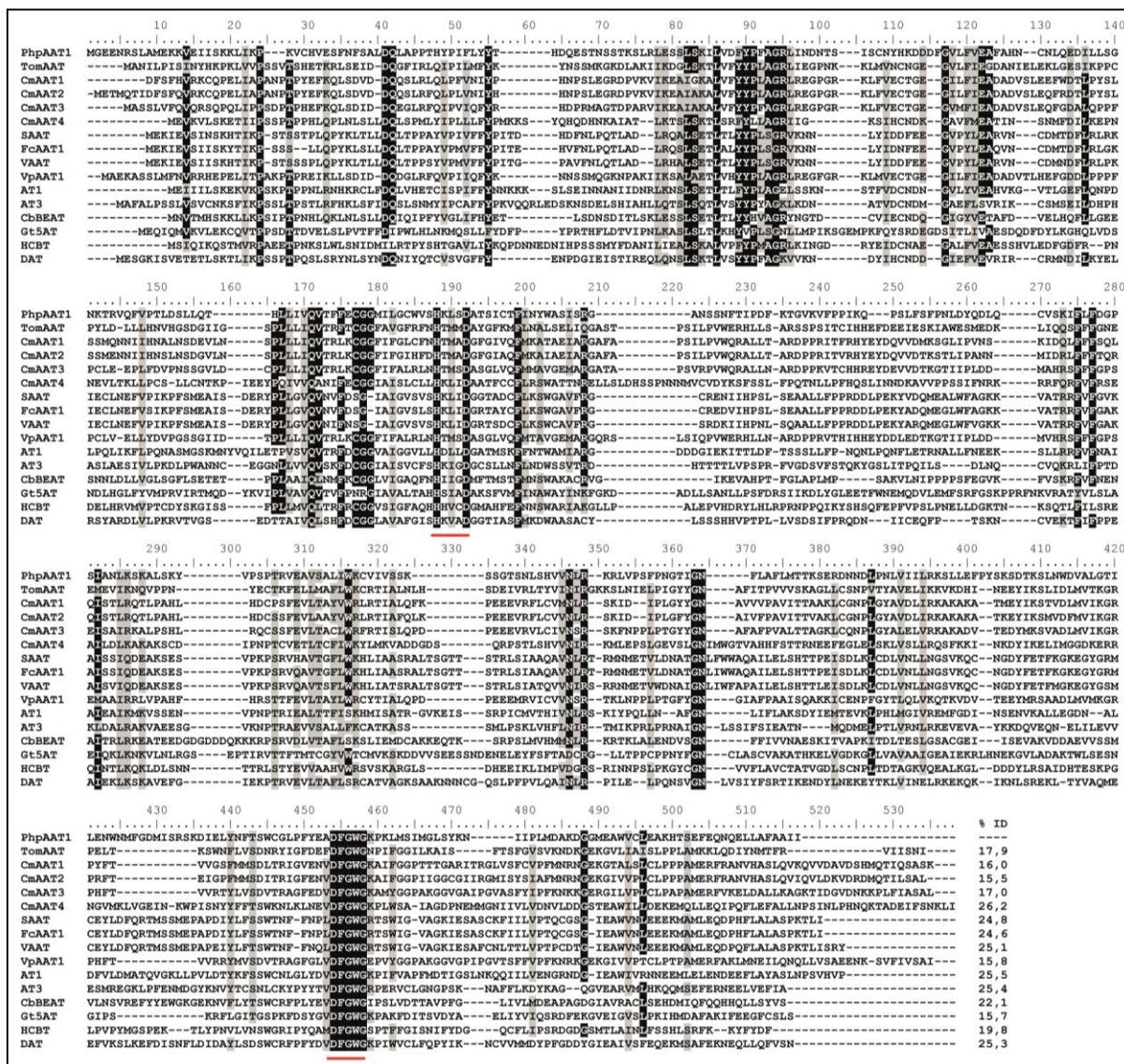
### 3.2. Comparación de secuencia y análisis de *PhpAAT1*

La secuencia aminoacídica deducida de *PhpAAT1* fue alineada y comparada con otras secuencias de aciltransferasas (**Figura 14**). La mayor similitud se encontró entre *PhpAAT1* y *CmAAT4* aislada desde *C. melo*, *AT1* desde *Capsicum chinense*, *AT3* de *C. annuum*, *DAT* (deacetilvindolina 4-*O*-acetiltransferasa) desde *Catharanthus roseus* y *VAAT* de *Fragaria vesca* con 26,2; 25,5; 25,4; 25,3 y 25,1% de identidad a nivel de aminoácidos, respectivamente. El árbol filogénico fue construido a partir de los alineamientos múltiples anteriores, incorporando 27 secuencias de aciltransferasa, y el patrón de agrupamiento proporcionó tres subgrupos principales (**Figura 15**). *PhpAAT1* se agrupó dentro del clado III de acuerdo a D'Auria [2006], junto con otras AATs relacionadas con la síntesis de ésteres en frutos tales como melón (*CmAAT4*), y diferentes especies de frutillas: *F. vesca* (*VAAT*), *F. × ananassa* (*SAAT*), y *F. chiloensis* (*FcAAT1*).

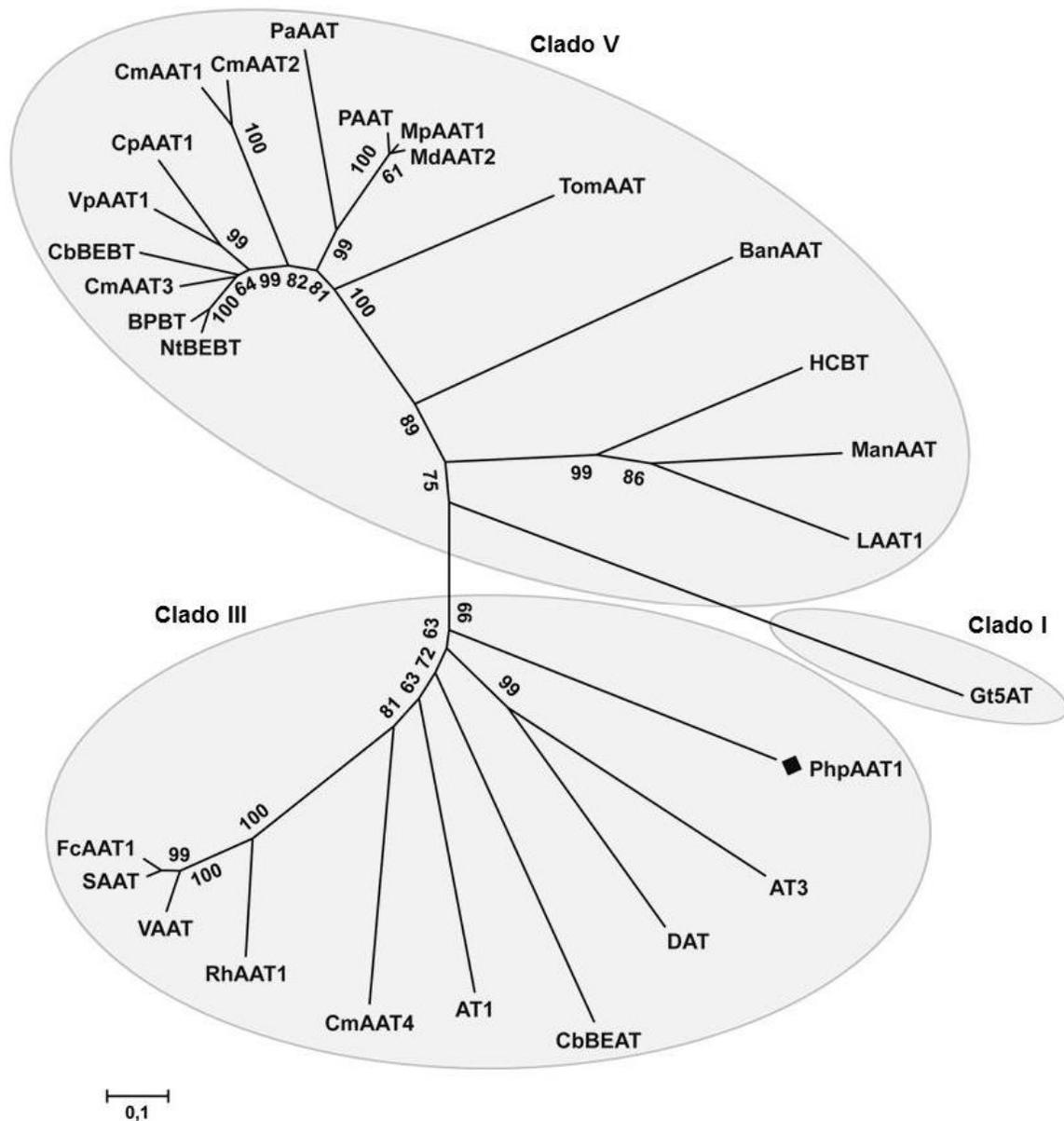
El mismo grupo, clado III, también incorpora AATs aisladas desde *C. annuum* (*AT3*) y *C. chinense* (*AT1*) (**Figura 15**), especies que pertenecen a la familia *Solanaceae*. El patrón de agrupamiento incorpora a *PhpAAT1* en una posición divergente respecto a algunas AATs relacionadas con maduración de otras especies de frutas (subgrupo V) (**Figura 15**) como melón (*CmAAT1*, *CmAAT2* y *CmAAT3*), papaya, damasco, manzana, plátano, mango, limón e interesantemente tomate, otra especie de la familia *Solanaceae*, relacionado con goldenberry.



**Figura 13.** Secuencia nucleotídica y de aminoácidos deducida para AAT de *P. peruviana*. Letras rojas subrayadas indican el codón de inicio (ATG) y el codón de termino (TAA) de la traducción. Señales consenso de poliadenilación se muestran en recuadros rojos. El motivo del sitio activo HxxxD y el motivo altamente conservado DFGWG, característicos de las AATs se muestran subrayados en rojo. Las secuencias fueron alineadas usando Bioedit Sequence Alignment Editor versión 7.0.



**Figura 14.** Alineamiento de la secuencia aminoacídica de PhpAAT1 con otras 15 AATs de flores y frutos de diferentes especies. Letras con fondo negro son aminoácidos idénticos, y letras con fondo gris aminoácidos similares. Los dos motivos característicos de las AATs están subrayados de color rojo: HxxxD (relacionado con la actividad catalítica y conservado en la familia de aciltransferasas BAHD) y DFGWG (altamente conservado en la superfamilia de proteínas BAHD). Las secuencias fueron alineadas usando Bioedit Sequence Alignment Editor versión 7.0, en la **Tabla 5** se presenta información de cada una de ellas.



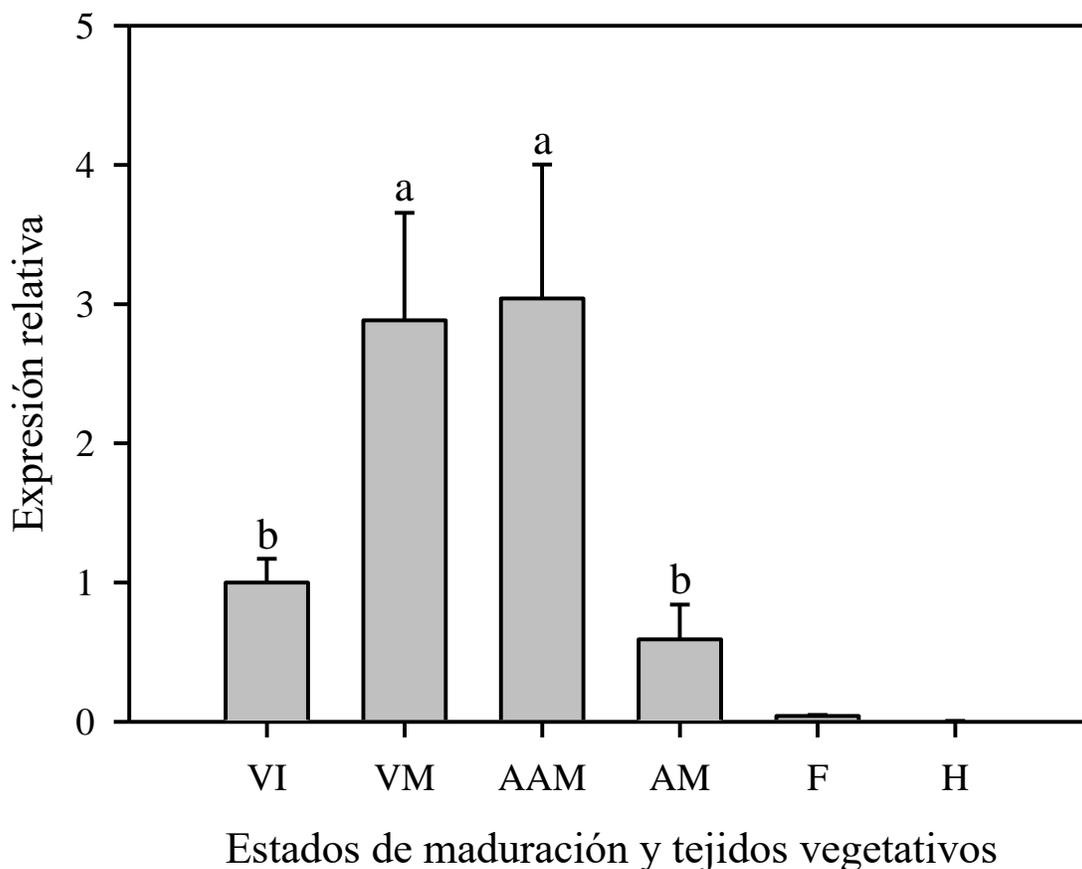
**Figura 15.** Análisis filogenético de PhpAAT1. El árbol filogenético fue construido usando el programa MEGA (version 5; <http://www.megasoftware.net>), el método Neighbor-Joining y análisis Bootstrap (1000 réplicas). La longitud de las líneas indica las distancias relativas entre los nodos y la escala se muestra bajo el árbol. Los números en las ramas indican valores de bootstrap (porcentaje); valores < 50% no están indicados. PhpAAT1 está representada por un rombo. Se utilizaron 27 secuencias de AATs para construir el árbol, las cuales se detallan en **Tabla 5**.

**Tabla 5.** Secuencias utilizadas en el alineamiento múltiple y análisis filogenético de las AATs de diferentes especies.

<b>Secuencia</b>	<b>Especie</b>	<b>Accesión GenBank</b>
TomAAT	<i>Solanum lycopersicum</i>	AAS48091
PAAT	<i>Pyrus communis</i>	AAS48090
CmAAT1	<i>Cucumis melo</i>	CAA94432
CmAAT2	<i>Cucumis melo</i>	AAL77060
CmAAT3	<i>Cucumis melo</i>	AAW51125
CmAAT4	<i>Cucumis melo</i>	AAW51126
PaAAT	<i>Prunus armeniaca</i>	ACF07921
MpAAT1	<i>Malus x domestica</i>	AAU14879
MdAAT2	<i>Malus x domestica</i>	AAS79797
SAAT	<i>Fragaria x ananassa</i>	AAG13130
FcAAT1	<i>Fragaria chiloensis</i>	FJ548610
VAAT	<i>Fragaria vesca</i>	AAN07090
ManAAT	<i>Mangifera indica</i>	CAC09378
VpAAT1	<i>Vasconcellea pubescens</i>	FJ548611
CpAAT	<i>Carica papaya</i>	EX256817
BanAAT	<i>Musa sapientum</i>	CAC09063
LAAT1	<i>Citrus limon</i>	CAC09049
AT1	<i>Capsicum chinense</i>	AAN85435
AT3	<i>Capsicum annuum</i>	AAV66311
RhAAT1	<i>Rosa hybrid cultivar</i>	AAW31948
CbBEAT	<i>Clarkia breweri</i>	AAC18062
CbBEBT	<i>Clarkia breweri</i>	AAN09796
Gt5AT	<i>Gentiana triflora</i>	BAA74428
HCBT	<i>Dianthus caryophyllus</i>	CAB06427
DAT	<i>Catharanthus roseus</i>	AAC99311
NtBEBT	<i>Nicotiana tabacum</i>	AAN09798
BPBT	<i>Petunia x hybrida</i>	AAU06226

### 3.3. Análisis de expresión de *PhpAATI* durante la maduración

La expresión de *PhpAATI* durante la maduración de goldenberry fue analizada por RT-qPCR en muestras de frutos en diferentes estados de maduración, como también en tejidos vegetativos tales como flores y hojas (**Figura 16**). Un incremento en el nivel de transcritos de *PhpAATI* fue observado durante el progreso de la maduración, mostrando el nivel más alto en los estados VM y AAM. Una significativa reducción en la acumulación de transcritos de *PhpAATI* se observó en el estado AM ( $P \leq 0,05$ ). En los tejidos vegetativos analizados, una muy baja acumulación de transcritos fue observada en flores comparada con frutos, en tanto que en hojas los transcritos fueron indetectables.



**Figura 16.** Análisis de expresión de *PhpAAT1* en frutos en diferentes estados de maduración y tejidos vegetativos. Los cambios en la abundancia del mRNA de *PhpAAT1* durante la maduración de goldenberry y en tejidos vegetativos fueron determinados por RT-qPCR en fruta verde inmadura (VI), fruta verde madura (VM), fruta amarilla-anaranjada madura (AAM), fruta anaranjado maduro (AM), flores (F), y hojas (H). Los datos de expresión corresponden a promedios de tres réplicas, normalizadas contra *GAPDH*, usando el estado VI como calibrador, y expresada en unidades arbitrarias  $\pm$  SE. Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Fischer LSD,  $P \leq 0,05$ ) entre los estados de maduración.

#### 4. DISCUSIÓN

Goldenberry es un fruto que se caracteriza por su sabor e intenso aroma. A partir de frutos de *P. peruviana* se aisló un cDNA de largo completo (*PhpAAT1*) de 1799 pb, que presentó un marco de lectura abierto de 1320 pb y una secuencia polipeptídica deducida de 440 aminoácidos.

La secuencia aminoacídica de *PhpAAT1* presentó los dos motivos característicos de la superfamilia BAHD de aciltransferasas de plantas. Al igual que en todas las secuencias de AATs, *PhpAAT1* contiene los residuos de histidina y ácido aspártico del motivo del sitio activo HxxxD (aminoácidos 165–169) y el motivo localizado hacia el C-terminal DFGWG (aminoácidos 383–387), que están altamente conservados.

Los resultados generados a través del alineamiento múltiple y el análisis filogenético mostraron que la mayor similitud se presentó entre *PhpAAT1* y *CmAAT4* aislada desde *C. melo* y *AT1* desde *C. chinense*, con 26,2 y 25,5% de identidad a nivel de aminoácidos, respectivamente. Aunque estas aciltransferasas muestran una baja similitud de secuencia (~26% de identidad) entre ellas, comparten los motivos altamente conservados reportados en miembros de la superfamilia BAHD de aciltransferasas de plantas, los cuales están involucrados en la reacción de esterificación catalizada por esta enzima y función estructural. Una característica de los miembros de la superfamilia BAHD es que poseen una diversidad muy elevada, lo que lleva a un bajo porcentaje de identidad de secuencia aminoacídica entre ellas (25–34% de identidad) [D’Auria, 2006], e incluso entre enzimas de un mismo fruto (*CmAAT1* y *CmAAT4* con solo un 22% [El Sharkawy et al., 2005]). Sin embargo, las estructuras secundarias que presentan estas proteínas son altamente conservadas, con una composición y distribución similar de  $\alpha$ -hélices y hojas- $\beta$  [Galaz et al., 2013]. Las diferentes enzimas conservan la conformación de sus dominios catalíticos y las estructuras terciarias favoreciendo las reacciones de esterificación.

La clasificación filogenética de diferentes secuencias relacionadas con la familia BAHD de aciltransferasas permitió agruparlas en tres subgrupos principales, lo que coincide con lo reportado por El Sharkawy et al. [2005], Souleyre et al. [2005] y D'Auria [2006]. PhpAAT1 fue agrupada en el clado III de acuerdo a D'Auria [2006] junto con otras AATs que participan en la síntesis de ésteres en frutos como melón (CmAAT4), y diferentes especies de frutillas: *Fragaria vesca* (VAAT), *F. × ananassa* (SAAT), y *F. chiloensis* (FcAAT1). El clado III también agrupa AATs aisladas desde *Capsicum annuum* (AT3) y *C. chinense* (AT1), especies que, al igual que goldenberry pertenecen a la familia *Solanaceae*. El patrón de agrupamiento incorpora a PhpAAT1 en una posición divergente con respecto a AATs relacionadas con maduración de otras especies de frutos (subgrupo V) como melón (CmAAT1, CmAAT2 y CmAAT3), papaya, damasco, manzana, pera, plátano, mango, limón, e interesantemente tomate, otra especie de la familia *Solanaceae*, relacionado con goldenberry. Este subgrupo comprende un gran número de AATs con baja similitud funcional entre ellas, sin embargo, CmAAT3 de melón y VpAAT1 de papaya presentan en común una alta preferencia para sintetizar acetato de benzilo [Balbontín et al., 2010].

Por otro lado, en las especies de frutilla comercial y silvestre (*F. × ananassa* y *F. vesca*), los ésteres más abundantes identificados incluyen: butanoato de metilo, butanoato de etilo, hexanoato de etilo, acetato de hexilo y acetato de *trans*-2-hexenilo [Aharoni et al., 2000; Olías et al., 2002]. En frutos completamente maduros de *F. chiloensis* los compuestos acetato de butilo, acetato de etilo, butanoato de etilo y hexanoato de etilo son los ésteres más abundantes [González et al., 2009]. En melón, los compuestos volátiles de alto impacto sensorial producidos por la enzima CmAAT4 son exclusivamente acetatos [El Sharkawy et al., 2005]. De estos volátiles de aroma, los compuestos butanoato de etilo, acetato de butilo, acetato de hexilo y hexanoato de etilo coinciden con los generados en goldenberry durante la maduración. Componentes que tienen alto impacto en el perfil aromático de goldenberry. Estos resultados sugieren que las enzimas CmAAT4, VAAT, SAAT y FcAAT1 comparten similar preferencia por los sustratos, y por ende, por los ésteres capaces de generar. Esta selectividad por sustratos podría ser compartida con PhpAAT1, dado que frutos de goldenberry generan ésteres similares a frutos de frutilla y melón, y porque sus genes se agrupan en el mismo clado filogenético.

El nivel de transcritos de *PhpAAT1* determinado por RT-qPCR, reveló que el gen se expresa mayoritariamente en frutos y existe un incremento significativo de transcritos a medida que se desarrolla la madurez. Existe una muy baja acumulación de transcritos en los tejidos vegetativos analizados. La mayor expresión de *PhpAAT1* en los estados VM y AAM sugiere fuertemente la participación en la formación de ésteres del perfil aromático de goldenberry. En melón y frutillas la expresión de los genes *CmAAT4*, *VAAT*, *SAAT* y *FcAAT1*, también fue específica de la fruta y fuertemente inducida durante la maduración [Nam et al., 1999; Aharoni et al., 2000; El Sharkawy et al., 2005; González et al., 2009].

Se consiguió aislar y caracterizar el gen *PhpAAT1*, el cual es altamente expresado en el fruto durante la maduración, y que podría ser responsable de la producción de ésteres relacionados con el aroma. En conjunto, los resultados han confirmado la relación entre la expresión del gen AAT de goldenberry, la actividad de la enzima y el perfil de compuestos aromáticos. Sin embargo, está pendiente el estudiar las propiedades cinéticas de la proteína *PhpAAT1* que podría dar mayores luces respecto de su preferencia por sustratos. Si bien fue posible expresar la proteína *PhpAAT1* en un sistema heterólogo, la proteína no presentó actividad demostrable.

Una de las posibles razones de la inactividad que presentó la proteína *PhpAAT1*, podría estar asociada al término prematuro de la transcripción, debido a regiones ricas en AT, lo cual se ha observado en *Pichia* y otros sistemas de expresión eucarióticos [Irniger et al., 1991; Scorer et al., 1993]. Por otro lado, diferentes estudios han reportado el procesamiento de forma incompleta del factor- $\alpha$ , obteniéndose proteínas con hasta 19 aminoácidos más [Igarashi et al., 2008; Koseki et al., 2008; Lindenmuth & McDonald, 2011]. La obtención de una proteína con aminoácidos extras de la señal de exportación, puede incluir sitios de glicosilación aumentando el tamaño de proteína e incidir de forma negativa en la exportación de la proteína. Posiblemente los aminoácidos extras en la enzima, producen un efecto inhibitorio sobre su actividad, como consecuencia de los resultados en el procesamiento, plegamiento y secreción extracelular, si ésta no es degradada.

La estabilidad de la proteína puede verse afectada cuando no es procesada correctamente durante la secreción, debido a que cualquier segmento de aminoácidos adicional a la secuencia madura incide sobre la estabilidad termodinámica de la proteína [Goda et al., 2000]. La presencia de segmentos adicionales al factor- $\alpha$  funcional, afecta notoriamente la eficiencia de la secreción y por tanto sobre el nivel de expresión [Murasugi & Tohma-Aiba, 2001]. Así como se ha observado que el factor- $\alpha$  presenta una estructura que facilita el reconocimiento y procesamiento en el sistema de secreción de *P. pastoris*, también se ha observado que el incremento en el número de residuos cargados negativamente, en el entorno al sitio de procesamiento del factor- $\alpha$  ó la adición de puntos de *N*-glicosilación adicionales, ha sido crucial para aumentar los niveles de secreción de algunas proteínas recombinantes [Kjeldsen et al., 1999].

## **CAPÍTULO IV**

### **Discusión general y conclusiones**

## 1. DISCUSIÓN GENERAL

Goldenberry es un cultivo nuevo en Chile, y el interés comercial en este fruto exótico ha crecido debido a sus propiedades nutricionales, alto contenido de vitaminas, minerales y antioxidantes, así como sus propiedades anti-inflamatorias, anticancerígenas y otras propiedades medicinales [Martínez et al., 2010; Yen et al., 2010; Ramadan, 2011a]. A pesar del creciente interés en goldenberry, existe escasa información relacionada con la fisiología de la maduración y aspectos relevantes para la calidad de la fruta, como la formación de aroma en este fruto.

Goldenberry es un fruto climatérico que presenta el característico aumento en la producción de etileno durante la maduración, acompañado por ablandamiento, cambios en el color de la piel desde verde a amarillo-anaranjado, y desarrollo del sabor característico e intenso aroma relacionados con cambios en la concentración de ácidos orgánicos y azúcares, y el incremento en la emisión de compuestos volátiles.

Aunque el aroma de frutos y vegetales es determinado por una combinación única de compuestos volátiles [Buttery et al., 1987; Pichersky & Gershenzon, 2002; Schwab et al., 2008], diferentes frutos comparten algunas características de aroma, y cada fruta tiene un aroma distintivo que está determinado por las proporciones de compuestos volátiles específicos, así como la presencia o ausencia de componentes únicos [Gonda et al., 2010]. En la literatura especializada se han descrito cientos de compuestos volátiles en frutos, pero sólo una pequeña parte de esta diversidad han sido reconocidos como compuestos característicos de aroma y tienen impacto en las propiedades organolépticas de la fruta [Baldwin et al., 2000]. Aunque el aroma de un fruto es una mezcla compleja de una amplia gama de compuestos químicos formados por diferentes vías bioquímicas, cada fruta tiene un aroma característico determinado por compuestos volátiles específicos.

Los ésteres son los volátiles que contribuyen de forma más significativa al aroma de diferentes frutos, tales como manzana, pera (*Pyrus communis*), plátano [Shiota, 1993], melón [Beaulieu & Grimm, 2001] y piña (*Ananas comosus*) [Elss et al., 2005]. En frutilla (*F. ×*

*ananassa*) por ejemplo, entre todos los compuestos que constituyen el perfil de volátiles, los ésteres butanoato de etilo, hexanoato de etilo, butanoato de metilo y butanoato de 2-metilo, son los compuestos que contribuyen de forma más importante al aroma del fruto [Zabetakis & Holden, 1997]. La mayoría de los ésteres tienen características aromáticas descritas con notas ‘frutasas’ asociados a frutos comestibles. Entre los volátiles reportados en extractos de goldenberry completamente maduros, los ésteres representan el grupo mayoritario de compuestos relacionados con el aroma. Por lo tanto, en la presente tesis se realizó el análisis del perfil de ésteres producidos en frutos intactos de *P. peruviana*, durante el crecimiento y desarrollo de goldenberry, específicamente durante la maduración, debido a su abundante e intenso aroma.

Mediante el uso de la metodología headspace-SPME seguido de análisis por CG y detección por MS se identificaron más de 30 diferentes compuestos volátiles en frutos de *P. peruviana*, 16 de los cuales fueron cuantificados. Los principales compuestos volátiles en goldenberry fueron ésteres, y los más abundantes fueron butanoato de etilo, acetato de etilo, butanoato de hexilo, butanoato de butilo, acetato de hexilo, y acetato de butilo. Entre los ésteres, los compuestos acetato de hexilo, benzoato de metilo, hexanoato de etilo, butanoato de hexilo y acetato de butilo incrementaron su concentración durante la maduración del goldenberry. Entre los volátiles cuantificados, diez ésteres y dos alcoholes han sido reportados previamente en extractos de goldenberry maduros [Berger et al., 1989; Yilmaztekin, 2014b]. El primer estudio que caracterizó constituyentes volátiles de aroma en goldenberry, realizado en extractos de frutos maduros reportó el éster 2-metilbutanoato de metilo, las cetonas 2,5-dimetil-4-hidroxi-3(2H)-furanona, su 4-metoxi derivado,  $\beta$ -ionona,  $\beta$ -damascenona, y las lactonas 4- y 5-octanolidos, como los componentes volátiles de impacto aromático en frutos de *P. peruviana*, además de los ésteres reportados previamente en extractos de goldenberries maduros (butanoato de metilo, butanoato de etilo, acetato de butilo, hexanoato de metilo, hexanoato de etilo, benzoato de metilo y octanoato de etilo) [Berger et al., 1989]. En el presente estudio, se identificaron por primera vez en frutos intactos de *P. peruviana* los ésteres acetato de etilo, butanoato de propilo, hexanoato de butilo y butanoato de hexilo, ésteres que han sido previamente identificados en el perfil de volátiles de aroma de frutos como pera Asiática (*Pyrus serotina*), pera d’Anjou (*P. communis*), damasco, y manzanas

‘Fuji’ (*Malus × domestica* Borkh.) [Takeoka et al., 1990, 1992; Argenta et al., 2003; Altisent et al., 2009].

La diferencia presentada, entre los constituyentes volátiles de aroma determinados en frutos intactos de *P. peruviana* y los reportados para goldenberry en literatura [Berger et al., 1989; Yilmaztekin, 2014b], puede atribuirse a las diferentes metodologías empleadas para determinar los compuestos de aroma. Los estudios de Berger et al. [1989] y Yilmaztekin [2014b] caracterizaron los volátiles de aroma en extractos orgánicos obtenidos por extracción líquido/líquido de homogenizados y pulpa de frutos de *P. peruviana* completamente maduros. Esta técnica se realiza generalmente a altas temperaturas o bajo presión reducida, con etapas exhaustivas de concentración (con el fin de eliminar los solventes), condiciones que pueden destruir o alterar algunos compuestos de aroma y/o producir artefactos [Beaulieu & Grimm, 2001]. En contraste, el método headspace-SPME seguido de análisis por CG y detección por MS permite la captura de los volátiles emitidos por el fruto en un soporte sin el empleo de solventes o altas temperaturas, siendo una determinación que no genera modificaciones de los volátiles de aroma en las muestras. Por lo tanto, el perfil de compuestos volátiles determinado por headspace-SPME-CG/MS, es altamente representativo del aroma natural de la fruta, en comparación con el perfil aromático generado por procesos de destilación y extracción con solventes [Carasek & Pawliszyn, 2006; Montero-Calderón et al., 2010]. Además, la ruptura mecánica de la fruta conduce a modificaciones enzimáticas de los compuestos primarios de aroma y la formación de compuestos “secundarios”, tales como aldehídos y alcoholes de seis carbonos, alcoholes alifáticos o hidrocarburos monoterpénicos oxidados, los cuales difieren de los emitidos por frutos intactos.

Durante la maduración de goldenberry hubo un claro aumento en el contenido de volátiles totales, principalmente ésteres. A medida que la producción de ésteres aumentó se observó un notorio incremento de la actividad AAT total desde el estado VI al AM. Se evidenció la directa relación entre la generación de ésteres volátiles y la actividad enzimática AAT, especialmente con butanoatos y hexanoatos. La actividad enzimática AAT aumentada durante la maduración de goldenberry explica el pronunciado incremento en la producción de volátiles de aroma. Es importante destacar que los ésteres hexanoato de etilo, acetato de hexilo

y benzoato de metilo, son ésteres producidos por goldenberry y que presentan un elevado impacto para el aroma del fruto. Estos tres compuestos volátiles fueron clasificados dentro del Grupo 1 de acuerdo al análisis de componentes principales, y comparten la misma dinámica de producción, esto es, un incremento significativo en la tasa de producción a medida que el fruto madura. Este perfil además coincide con el aumento de los niveles de transcritos de *PhpAAT1* y actividad AAT total en frutos de *P. peruviana* durante la maduración. Resultados similares han sido reportados en frutilla por Pérez et al. [1996] y Carbone et al. [2006], quienes observaron una alta correlación entre la actividad AAT y el perfil de aroma desarrollado durante la maduración en cultivares de *F. × ananassa*. Otros de los volátiles importantes para el aroma de goldenberry son los butanoatos de etilo (Grupo 3) y de butilo (Grupo 2), los que presentan niveles reducidos o medianos en fruto verde, y que luego de descender a medida que el fruto se desarrolla, presentan un significativo incremento cuando el fruto entra en proceso de maduración. Estas observaciones confirman que la enzima alcohol aciltransferasa estaría involucrada en la producción de ésteres de impacto aromático en goldenberry.

Debido a la alta correlación entre la producción de ésteres y la actividad AAT, se aisló un putativo gen AAT a partir de frutos de *P. peruviana* (*PhpAAT1*). Este gen presentó los diez residuos aminoacídicos que están absolutamente conservados en los dos motivos que caracterizan a la mayoría de las AATs aisladas de diferentes especies de frutos. El primer motivo (HxxxD), que es el más conservado entre los miembros de la familia BAHD de aciltransferasas, se encuentra en la zona central de la secuencia y está implicado en el mecanismo catalítico de las enzimas [Ma et al., 2005]. El segundo motivo (DFGWG) es también altamente conservado entre los miembros de la familia de proteínas BAHD y está situado en el extremo C-terminal. Aparentemente, este motivo desempeña una función estructural manteniendo la integridad conformacional de la enzima [El-Sharkawy et al., 2005]. El análisis filogenético reproduce tres de los cinco subgrupos descritos previamente para la familia BAHD [D'Auria, 2006] y del cual se concluye que *PhpAAT1* pertenece al subgrupo III, el cual comprende secuencias AAT de frutos (del género *Fragaria*, *C. melo*, *C. annuum* y *C. chinense*) y de flores (*R. hybrid*, *C. roseus* y *C. breweri*). Entre las AATs agrupadas en el clado III, las secuencias AT3 y AT1 pertenecen a especies de la familia *Solanaceae* al igual que *P. peruviana*. Sin embargo, el patrón de agrupamiento categoriza a *PhpAAT1* en una

posición divergente con respecto a la AAT de tomate (TomAAT, subgrupo V), otra especie de la familia *Solanaceae* relacionada con goldenberry.

En frutos de *P. peruviana*, se observó la acumulación de transcritos de *PhpAAT1* durante la maduración, presentando los máximos niveles de expresión en los estados de maduración VM y AAM. Este perfil de expresión concuerda con el reportado por Aharoni et al. [2000], quienes mostraron que la expresión del gen alcohol aciltransferasa de frutilla (*SAAT*) aumenta durante la maduración de *F. × ananassa*, alcanzando los máximos niveles de transcritos entre los estados de maduración “*turning*” y rojo. Las determinaciones por headspace-SPME-CG/MS y las aproximaciones moleculares aplicadas para estudiar la emisión de volátiles de aroma en frutos de *P. peruviana*, permiten confirmar una directa relación entre la expresión del gene *PhpAAT1*, la actividad enzimática y la emisión de ésteres volátiles.

El ensayo de suministro exógeno de alcoholes proporcionó información sobre la capacidad de generación de volátiles derivados del alcohol correspondiente por parte del fruto, es decir demuestra la capacidad enzimática de síntesis de los diversos ésteres. Cada alcohol suministrado a los frutos de *P. peruviana* permitió la generación de ésteres específicos derivados de ese sustrato, los cuales fueron sintetizados muy probablemente por la enzima AAT. El estudio permitió confirmar que frutos de *P. peruviana* presentan un sistema endógeno de producción de ésteres de amplia y diversa preferencia por sustratos. Esto concuerda con la amplia preferencia de sustratos que se ha reportado para enzimas AAT encontradas en frutilla, melón, plátano y manzanas [Aharoni et al., 2000; Yahyaoui et al., 2002; Beekwilder et al., 2004; Souleyre et al., 2005; Li et al., 2006].

Por otro lado, el ensayo de suministro refleja que la producción de ciertos ésteres en fruto intacto se ve limitada por la baja disponibilidad de los precursores. Esto indica que, la disponibilidad de sustratos puede controlar la formación de ésteres durante la maduración de goldenberry. De acuerdo con otros reportes, en manzanas cultivar ‘Pink Lady’ la mayor producción de ésteres durante la maduración se debe principalmente al incremento en la disponibilidad de sustratos para la acción de la enzima [Villatoro et al., 2008]. En plátano, la

disponibilidad de precursores o la selectividad de las enzimas encargadas de la síntesis han sido reportadas como factores limitantes para la generación de diferentes ésteres [Wyllie & Fellman, 2000].

La fruta de consumo en fresco es sometida a diferentes condiciones de amacénaje y tratamientos que retrasan o detienen el avance de madurez, empleados para preservar la calidad de la fruta, extender la vida de post-cosecha y optimizar la calidad comercial. Sin embargo, la extensión de la vida de post-cosecha, lleva a una fuerte reducción en la producción de volátiles aromáticos en la fruta. Además, la vida de post-cosecha basada en el sabor, aroma y calidad nutricional, es más corta que la basada en la apariencia y textura del fruto.

De esta manera, el tratamiento con alcoholes exógenos, puede ser una opción para mejorar la calidad organoléptica de goldenberry, o aplicar similar estrategia a otros frutos. Ello permitiría incrementar la producción de volátiles de aroma en fruta bajo condiciones de almacenamiento, y de esa forma conservar y/o potenciar las cualidades relacionadas con el aroma de la fruta. El uso de alcoholes exógenos mantendría el sabor, aroma y una calidad nutricional de frutas entre la cosecha y el consumo.

El aumento en la emisión de los ésteres butanoato de etilo; butanoato de butilo y butanoato de hexilo; hexanoato de metilo, hexanoato de butilo y butanoato de hexilo; y octanoato de etilo, fue facilitado por la disponibilidad de los alcoholes precursores (etanol, butanol, hexanol y octanol, respectivamente) suministrados de forma exógena. Ello sugiere que la capacidad de síntesis de estos ésteres en frutos de *P. peruviana* estaba siendo limitada por la falta de sustratos. Por otro lado, el incremento en la producción de butanoato de butilo después del suministro exógeno de butanol, además del aumento de hexanoato de metilo y hexanoato de butilo con hexanol, sugiere que los alcoholes están siendo metabolizados a sus correspondientes acil-CoAs y empleados para la síntesis de los ésteres. Durante el suministro de etanol y butanol de forma exógena se evidenció una reducción de la producción de los compuestos butanoato de etilo, octanoato de etilo y butanoato de metilo en frutos de *P. peruviana* respecto a los frutos control. En conjunto, los resultados obtenidos en este estudio, confirman que la formación de

ésteres durante la maduración de goldenberry depende tanto de la actividad AAT como de la disponibilidad de sustratos.

Si bien, la mayor producción de ésteres durante la maduración está asociada principalmente a una mayor disponibilidad de sustrato para la acción enzimática, los resultados del ensayo de suministro de precursores sugieren que la disponibilidad de sustratos es un factor importante para la producción de ésteres específicos por goldenberry. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Kollmannsberger et al. [1992] y Harb et al. [1994], quienes mostraron que la adición de compuestos intermediarios mejora la producción de compuestos volátiles específicos en manzana.

Aunque realizan la misma reacción, la especificidad de sustratos de AATs difiere de fruto a fruto, diferencias que determinan la concentración de ésteres específicos en los perfiles aromáticos de cada fruta. Por ejemplo, SAAT y CmAAT1 solo tienen un 22% de identidad, mientras que tienen preferencia similar por los sustratos [Aharoni et al., 2000; Yahyaoui et al., 2002]. A pesar de una alta identidad de secuencia, las proteínas SAAT y VAAT difieren en sus preferencias de sustrato [Beekwilder et al., 2004].

Las AATs presentan amplia preferencia por sustrato, preferencia que no siempre se ve reflejada en el perfil aromático de la fruta. Trabajando con secuencias génicas de AAT aisladas desde frutas como el melón [El Sharkawy et al., 2005] y papaya chilena (*V. pubescens*) [Balbontín et al, 2010] y al ser expresadas en levaduras se confirmó que las AAT tienen la capacidad de utilizar una amplia gama de sustratos, pero que los perfiles aromáticos de la fruta no siempre coinciden con ella. La incapacidad de producción de ciertos volátiles por parte de la fruta podría deberse a la baja disponibilidad de los sustratos precursores en la fruta.

De igual forma, la preferencia que presentan las enzimas AAT para la generación de volátiles de aroma, así como diferentes concentraciones de sustratos disponibles durante la maduración pueden ser factores importantes, los cuales permiten explicar, el cambio en el perfil de los compuestos volátiles producidos por la fruta a medida que se desarrollan y maduran.

## 2. CONCLUSIONES

- El carácter climatérico, así como los cambios fisiológicos y bioquímicos asociados al proceso de maduración, fueron confirmados en goldenberry. Evidenciados por el pronunciado incremento en la producción de etileno y la tasa respiratoria, y los cambios en: el color, desde verde a amarillo-anaranjado; la textura, reducción en los valores de firmeza; el sabor, reducción de la acidez titulable e incremento de los sólidos solubles totales; y el aroma de la fruta, generado por la emisión de volátiles de aroma, específicamente ésteres.
- Entre los principales ésteres determinados en goldenberry, butanoato de etilo, butanoato de hexilo, acetato de butilo, acetato de hexilo, hexanoato de etilo, benzoato de metilo y octanoato de etilo, los cuales incrementan su concentración durante la maduración. Los ésteres lineales butanoato de etilo y hexanoato de etilo proporcionan el aroma característico de goldenberry, lo cual es consistente con la mayor abundancia en frutos completamente maduros, la mayor intensidad aromática en base a los OV's estimados, y los valores de umbral odorífico más bajos de ambos compuestos.
- Los ésteres, los constituyentes más importantes del aroma de goldenberry, son sintetizados por acción de la enzima alcohol aciltransferasa (AAT), mediante la esterificación de alcoholes y acil-CoAs. En frutos de *P. peruviana*, la actividad AAT total incrementa durante la maduración.
- La síntesis y emisión de volátiles de aroma en goldenberry, depende de la disponibilidad de sustratos. Frutos incubados con alcoholes (etanol, butanol, hexanol y octanol) suministrados de forma exógena, incrementan los ésteres derivados de los respectivos alcoholes (butanoato de etilo; butanoato de butilo y butanoato de hexilo; hexanoato de metilo, hexanoato de butilo y butanoato de hexilo; y octanoato de etilo) después del tratamiento.

- El gen *PhpAAT1* aislado desde frutos de *P. peruviana* codifica para una proteína que comparte los motivos conservados reportados en miembros de la superfamilia BAHD de aciltransferasas de plantas, involucrados en la reacción de esterificación, y es confirmado por el análisis filogenético que relaciona a *PhpAAT1* con AATs que pertenecen a la subfamilia III, cuyos miembros participan en la síntesis de compuestos volátiles en frutos.
- La actividad transcripcional del gen *PhpAAT1* en los estadios VM y AAM de la maduración del fruto, es consistente con el aumento de la actividad de la enzima alcohol aciltransferasa y con el incremento en la biosíntesis de ésteres asociados al aroma del fruto, en las etapas finales de la maduración del fruto de goldenberry.

### 3. PROYECCIONES

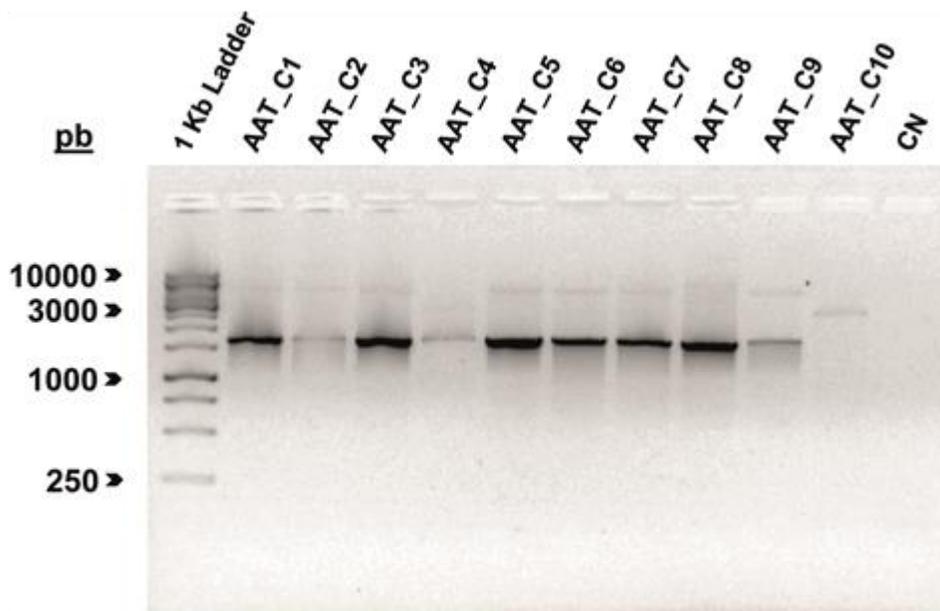
En este trabajo de tesis, se realizó la identificación y cuantificación de compuestos volátiles emitidos por frutos de goldenberry y que son responsables de su aroma. Se presenta por primera vez la dinámica de producción de ésteres durante el proceso de desarrollo y maduración en este interesante fruto.

Se trabajó con la enzima alcohol aciltransferasa, responsable de la síntesis de ésteres. En frutos de goldenberry el incremento en la actividad AAT total se correlaciona con el incremento en la producción de ésteres. Se consiguió aislar y caracterizar el gen *PhpAAT1*, el cual es altamente expresado en el fruto durante la maduración, y que podría ser responsable de la producción de ésteres relacionados con el aroma. En conjunto, estos resultados han confirmado la relación entre la expresión del gen AAT de goldenberry, la actividad de la enzima y el perfil de compuestos aromáticos. Sin embargo, está pendiente el estudiar las propiedades cinéticas de la proteína *PhpAAT1* que podría dar mayores luces respecto de su preferencia por sustratos. Si bien fue posible expresar la proteína *PhpAAT1* en un sistema heterólogo, la proteína no presentó actividad demostrable.

En relación al putativo gen AAT de *P. peruviana* (*PhpAAT1*) aislado desde frutos, éste codifica para una proteína que comparte los dominios funcionales conservados reportados en miembros de la superfamilia BAHD de aciltransferasas de plantas. Estos estarían involucrados en la reacción de esterificación que cataliza esta enzima y tendrían un rol estructural al favorecer la estructura terciaria requerida. Es importante señalar que el gen *PhpAAT1* fue clonado y que está pendiente conseguir la expresión de proteína activa en algún sistema heterólogo.

#### Trabajo adelantado

Expresión heteróloga del putativo gen *PhpAAT1*. El gen codificante para la proteína *PhpAAT1* de frutos de *P. peruviana* se expresó en el sistema heterólogo *P. pastoris*, sistema que integra el gen de interés en el genoma de la levadura por recombinación homóloga, y su expresión es dirigida bajo el control del promotor alcohol oxidasa (AOX1) que es inducible por metanol. Se obtuvo un producto ligado al vector de expresión pPICZ $\alpha$ B fusionado en el extremo N-terminal a la secuencia codificante del factor- $\alpha$  con el fin de secretar la proteína al medio extracelular. La detección de las colonias portadoras del inserto fue determinada por reacciones de PCR (**Figura 17**). Posteriormente, se realizó extracción de DNA genómico de las colonias transformantes para verificar la inserción del producto al genoma de la levadura.



**Figura 17.** Análisis de clones transformantes de *Pichia pastoris*. Electroforesis de productos obtenidos por reacciones de PCR para *PhpAAT1*. Gel de agarosa al 1,5%. 1 Kb, marcador de peso molecular; AAT\_C1, clon 1; AAT\_C2, clon 2; AAT\_C3, clon 3; AAT\_C4, clon 4; AAT\_C5, clon 5; AAT\_C6, clon 6; AAT\_C7, clon 7; AAT\_C8, clon 8; AAT\_C9, clon 9; AAT\_10, clon 10; CN, control negativo.

Como trabajo a futuro queda por realizar la caracterización enzimática de la proteína codificada por *PhpAAT1*. Evaluar la preferencia de sustratos específicos por la enzima, ya sea alcoholes (etanol, butanol, hexanol y octanol) o acil-CoAs (acetil-CoA, butanoil-CoA y hexanoil-CoA).

De los ensayos de suministro de alcoholes se concluye que la capacidad de síntesis de ésteres en fruto maduro es elevada y que mediante la adición de ciertos alcoholes es posible incrementar la síntesis de ciertos ésteres con gran impacto odorífero. Esto podría ser empleado para mejorar la calidad organoléptica de goldenberry, o aplicar similar estrategia a otros frutos.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Agronet. Balance del sector hortifructicultura. **2017**. <http://www.agronet.gov.co>
- Aharoni, A.; Keizer, L. C.; Bouwmeester, H. J.; Sun, Z.; Alvarez-Huerta, M.; Verhoeven, H. A.; Blaas, J.; van Houwelingen, A. M.; De Vos, R. C.; van der Voet, H.; Jansen, R. C.; Guis, M.; Mol, J.; Davis, R. W.; Schena, M.; van Tunen, A. J.; O'Connell, A. P. Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *Plant Cell*, **2000**, *12*, 647–662.
- Ahmad, S.; Malik, A.; Yasmin, R.; Ullah, N.; Gul, W.; Khan, P. M.; Nawaz, H. R.; Afza, N. Withanolides from *Physalis peruviana*. *Phytochemistry*, **1999**, *50*, 647–651.
- Akacha, N. B.; Boubaker, O.; Gargouri, M. Production of hexanol in a two-enzyme system: kinetic study and modelling. *Biotechnol. Lett.*, **2005**, *27*, 1875–1878.
- Altisent, R.; Echeverría, G.; Graell, J.; López, L.; Lara, I. Lipoxygenase activity is involved in the regeneration of volatile ester-synthesizing capacity after ultra-low oxygen storage of 'Fuji' apple. *J. Agric. Food Chem.*, **2009**, *57*, 4305–4312.
- Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **1990**, *215*, 403–410.
- Arenas, C. A. Identificación del gen AAT (alcohol acetyl transferasa) en *Physalis peruviana* L. y *Prunus cerasus* L. Memoria de pregrado, Escuela de Agronomía, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca, Chile, **2007**, 79p.
- Argenta, L. C.; Fan, X.; Mattheis, J. P. Influence of 1-methylcyclopropene on ripening, storage life, and volatile production by d'Anjou cv. pear fruit. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, *51*, 3858–3864.
- Artimo, P.; Jonnalagedda, M.; Arnold, K.; Baratin, D.; Csardi, G.; de Castro, E.; Duvaud, S.; Flegel, V.; Fortier, A.; Gasteiger, E.; Grosdidier, A.; Hernandez, C.; Ioannidis, V.; Kuznetsov, D.; Liechti, R.; Moretti, S.; Mostaguir, K.; Redaschi, N.; Rossier, G.; Xenarios, I.; Stockinger, H. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Res.*, **2012**, *40*, W597–W603.
- Axelius, B. The phylogenetic relationships of the physaloid genera (Solanaceae) based on morphological data. *Amer. J. Bot.*, **1996**, *83*, 118–124.
- Ayub, R.; Guis, M.; Ben Amor, M.; Gillot, L.; Roustan, J. P.; Latché, A.; Bouzayen, M.; Pech, J. C. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. *Nat. Biotechnol.*, **1996**, *14*, 862–866.

- Baker, A.; Graham, I. A.; Holdsworth, M.; Smith, S. M.; Theodoulou, F. L. Chewing the fat:  $\beta$ -oxidation in signalling and development. *Trends Plant Sci.*, **2006**, *11*, 124–132.
- Balaguera-López, H. E.; Espinal-Ruiz, M.; Zacarías, L.; Herrera, A. O. Effect of ethylene and 1-methylcyclopropene on the postharvest behavior of cape gooseberry fruits (*Physalis peruviana* L.) *Food Sci. Technol. Int.*, **2016**, *23*, 86–96.
- Balbontín, C.; Gaete-Eastman, C.; Fuentes, L.; Figueroa, C. R.; Herrera, R.; Manríquez, D.; Latché, A.; Pech, J.-C.; Moya-León, M. A. VpAAT1, a gene encoding an alcohol acyltransferase, is involved in ester biosynthesis during ripening of mountain papaya fruit. *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, *58*, 5114–5121.
- Balbontín, C.; Gaete-Eastman, C.; Vergara, M.; Herrera, R.; Moya-León, M. A. Treatment with 1-MCP and the role of ethylene in aroma development of mountain papaya fruit. *Postharvest Biol. Technol.*, **2007**, *43*, 67–77.
- Baldwin, E. A.; Scott, J. W.; Shewmaker, C. K.; Schuch, W. Flavor trivia and tomato aroma: biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. *HortScience*, **2000**, *35*, 1013–1022.
- Bangerth, F.; Streif, J.; Song, J.; Brackmann, A. Investigation into flavor physiology in apple fruit. *Acta Hort.*, **1998**, *464*, 189–194.
- Bartley, I. M.; Stoker, P. G.; Martin, A. D.; Hatfield, S. G.; Knee, M. Synthesis of aroma compounds by apples supplied with alcohols and methyl esters of fatty acids. *J. Sci. Food Agric.*, **1985**, *36*, 567–574.
- Bauchot, A. D.; Mottram, D. S.; Dodson, A. T.; John, P. Effect of aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase antisense gene on the formation of volatile esters in Cantaloupe Charentais melon (cv. Védrendais). *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, *46*, 4787–4792.
- Baumann, T. W.; Meier, C. M. Chemical defenses by withanolides during fruit development in *Physalis peruviana*. *Phytochemistry*, **1993**, *33*, 317–321.
- Beaulieu, J. C.; Grimm, C. C. Identification of volatile compounds in cantaloupe at various developmental stages using solid phase microextraction. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, *49*, 1345–1352.

- Beekwilder, J.; Alvarez-Huerta, M.; Neef, E.; Verstappen, F. W.; Bouwmeester, H. J.; Aharoni, A. Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana. *Plant Physiol.*, **2004**, *135*, 1865–1878.
- Benda, N. D.; Brownie, C.; Schal, C.; Gould, F. Fruit abscission by *Physalis* species as defense against frugivory. *Entomol. Exp. Appl.*, **2009**, *130*, 21–27.
- Berger, R. G.; Drawert, F. Changes in the composition of volatiles by post-harvest application of alcohols to Red Delicious apples. *J. Sci. Food Agric.*, **1984**, *35*, 1318–1325.
- Berger, R. G.; Drawert, F.; Kollmannsberger, H. The flavour of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **1989**, *188*, 122–126.
- Blée, E. Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci.*, **2002**, *7*, 315–322.
- Brackmann, A.; Streif, J.; Bangerth, F. Relationship between a reduced aroma production and lipid metabolism of apple after long-term controlled-atmosphere storage. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **1993**, *118*, 243–247.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **1976**, *72*, 248–254.
- Brash, A. R. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J. Biol. Chem.*, **1999**, *274*, 23679–23682.
- Bravo, K.; Sepulveda-Ortega, S.; Lara-Guzman, O.; Navas-Arboleda, A. A.; Osorio E. Influence of cultivar and ripening time on bioactive compounds and antioxidant properties in Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) *J. Sci. Food Agric.*, **2015**, *95*, 1562–1569.
- Burhenne, K.; Kristensen, B. K.; Rasmussen, S. K. A new class of *N*-hydroxycinnamoyltransferases. Purification, cloning, and expression of a barley agmatine coumaroyltransferase (EC 23. 1. 64). *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 13919–13927.
- Buttery, R. G.; Teranishi, R.; Ling, L. C. Fresh tomato aroma volatiles: a quantitative study. *J. Agric. Food Chem.*, **1987**, *35*, 540–544.
- Calderón, J. M.; Ruiz, N.; Castellanos, L. Within and between plant variation of 4 $\beta$ -hydroxiwithanolide E in cape gooseberry (*Physalis peruviana*; Solanaceae). *Biochem. Syst. Ecol.*, **2012**, *41*, 21–25.

- Cannon, R. J.; Ho, C.-T. Volatile sulfur compounds in tropical fruits. *J. Food Drug Anal.*, **2018**, *26*, 445–468.
- Carasek, E.; Pawliszyn, J. Screening of tropical fruit volatile compounds using solid-phase microextraction (SPME) fibers and internally cooled SPME fiber. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, *54*, 8688–8696.
- Carbone, F.; Mourgues, F.; Biasioli, F.; Gasperi, F.; Mark, T.; Rosati, C.; Perrotta, G. Development of molecular and biochemical tools to investigate fruit quality traits in strawberry elite genotypes. *Mol. Breeding*, **2006**, *18*, 127–142.
- Cardello, A. V. Food quality: Relativity, context and consumer expectations. *Food Qual. Pref.*, **1995**, *6*, 163–170.
- Cass, B. J.; Schade, F.; Robinson, C. W.; Thompson, J. E.; Legge, R. L. Production of tomato flavour volatiles from a crude enzyme preparation using a hollow-fiber reactor. *Biotechnol. Bioeng.*, **2000**, *67*, 372–377.
- Chang, S.; Puryear, J.; Cairney, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **1993**, *11*, 113–116.
- Contreras, C.; Schwab, W.; Mayershofer, M.; González-Agüero, M.; Defilippi, B. G. Volatile compound and gene expression analyses reveal temporal and spatial production of LOX-derived volatiles in pepino (*Solanum muricatum* Aiton) fruit and LOX specificity. *J. Agric. Food Chem.*, **2017**, *65*, 6049–6057.
- Contreras, C.; Tjellström, H.; Beaudry, R. M. Relationships between free and esterified fatty acids and LOX-derived volatiles during ripening in apple. *Postharvest Biol. Technol.*, **2016**, *112*, 105–113.
- Criollo, H.; Lagos, T. C.; Fischer, G.; Mora, L.; Zamudio, L. Comportamiento de tres genotipos de uchuva (*Physalis peruviana* L.) bajo diferentes sistemas de poda. *Rev. Colomb. Cienc. Hortic.*, **2014**, *8*, 34–43.
- Dandekar, A. M.; Teo, G.; Defilippi, B. G.; Uratsu, S. L.; Passey, A. J.; Kader, A. A.; Stow, J. R.; Colgan, R. J.; James, D. J. Effect of down-regulation of ethylene biosynthesis on fruit flavour complex in apple fruit. *Transgenic Res.*, **2004**, *13*, 373–384.
- D'Auria, J. C. Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **2006**, *9*, 331–340.

- Defilippi, B. G.; Dandekar, A. M.; Kader, A. A. Relationship of ethylene biosynthesis to volatile production, related enzymes, and precursor availability in apple peel and flesh tissues. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, *53*, 3133–3141.
- De Luca, V.; Balsevich, J.; Kurz, W. G. Acetyl CoenzymeA: deacetyl vindoline *O*-acetyltransferase, a novel enzyme from *Catharanthus*. *J. Plant Physiol.*, **1985**, *121*, 417–428.
- Dixon, J.; Hewett, E. W. Factors affecting apple aroma/flavour volatile concentration: a review. *New Zeal. J. Crop Hort. Sci.*, **2000**, *28*, 155–173.
- Dudareva, N.; D’Auria, J. C.; Nam, K. H.; Raguso, R. A.; Pichersky, E. Acetyl-CoA: benzylalcohol acetyltransferase – an enzyme involved in floral scent production in *Clarkia breweri*. *Plant J.*, **1998**, *14*, 297–304.
- Dymerski, T.; Namieśnik, J.; Vearasilp, K.; Arancibia-Avila, P.; Toledo, F.; Weisz, M.; Katrich, E., Gorinstein, S. Comprehensive two-dimensional gas chromatography and three-dimensional fluorometry for detection of volatile and bioactive substances in some berries. *Talanta*, **2015**, *134*, 460–467.
- Echeverría, G.; Graell, J.; López M. L.; Lara I. Volatile production, quality and aroma-related enzyme activities during maturation of ‘Fuji’ apples. *Postharvest Biol. Technol.*, **2004**, *31*, 217–227.
- El-Sharkawy, I.; Manríquez, D.; Flores, F. B.; Regad, F.; Bouzayen, M.; Latché, A.; Pech, J.-C. Functional characterization of a melon alcohol acyl-transferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role of a threonine residue for enzyme activity. *Plant Mol. Biol.*, **2005**, *59*, 345–362.
- Elss, S.; Preston, C.; Hertzog, C.; Heckel, F.; Richling, E.; Schreier, P. Aroma profiles of pineapple fruit (*Ananas comosus* L. Merr.) and pineapple products. *Lebensm. Wiss. Technol.*, **2005**, *38*, 263–274.
- Etzbach, L.; Pfeiffer, A.; Weber, F.; Schieber, A. Characterization of carotenoid profiles in goldenberry (*Physalis peruviana* L.) fruits at various ripening stages and in different plant tissues by HPLC-DAD-APCI-MS<sup>n</sup>. *Food Chem.*, **2018**, *245*, 508–517.
- Fan, X.; Blankenship, S. M.; Mattheis, J. P. 1-Methylcyclopropene inhibits apple ripening. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **1999**, *124*, 690–695.

- Fang, S.-T.; Li, B.; Liu, J.-K. Two new withanolides from *Physalis peruviana*. *Helv. Chim. Acta.*, **2009**, *92*, 1304–1308.
- Fang, S.-T.; Liu, J.-K.; Li, B. Ten new withanolides from *Physalis peruviana*. *Steroids*, **2012**, *77*, 36–44.
- Fatland, B. L.; Ke, J.; Anderson, M. D.; Mentzen, W. I.; Cui, L. W.; Allred, C. C.; Johnston, J. L.; Nikolau, B. J.; Wurtele, E. S. Molecular characterization of a heteromeric ATP-citrate lyase that generates cytosolic acetyl-coenzyme A in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **2002**, *130*, 740–756.
- Fatland, B. L.; Nikolau, B. J.; Wurtele, E. S. Reverse genetic characterization of cytosolic acetyl-CoA generation by ATP-citrate lyase in Arabidopsis. *Plant Cell*, **2005**, *17*, 182–203.
- Fellman, J. K.; Mattinson, D. S.; Bostick, B. C.; Mattheis, J. P.; Patterson, M. E. Ester biosynthesis in ‘Rome’ apples subjected to low-oxygen atmospheres. *Postharvest Biol. Technol.*, **1993**, *3*, 201–214.
- Fellman, J. K.; Miller, T. W.; Mattinson, D. S.; Mattheis, J. P. Factors that influence biosynthesis of volatile flavour compound in apple fruits. *HortScience*, **2000**, *35*, 1026–1033.
- Feussner, I.; Wasternack, C. The lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **2002**, *53*, 275–297.
- Fischer, A. M.; Dubbs, W. E.; Baker, R. A.; Fuller, M. A.; Stephenson, L. C.; Grimes, H. D. Protein dynamics, activity and cellular localization of soybean lipoxygenases indicate distinct functional roles for individual isoforms. *Plant J.*, **1999**, *19*, 543–554.
- Fischer, G.; Almanza-Merchán, P. J.; Miranda, D. Importancia y cultivo de la Uchuva (*Physalis peruviana* L.) *Rev. Bras. Frutic.*, **2014**, *36*, 1–15.
- Flath, R. A.; Black, D. R.; Guadagni, D. G.; McFadden, W. H.; Schultz, T. H. Identification and organoleptic evaluation of compounds in Delicious apple essence. *J. Agric. Food Chem.*, **1967**, *15*, 29–35.
- Flores, F.; El Yahyaoui, F.; de Billerbeck, G.; Romojaro, F.; Latché, A.; Bouzayen, M.; Pech, J.-C.; Ambid, C. Role of ethylene in the biosynthetic pathway of aliphatic ester aroma volatiles in Charentais Cantaloupe melons. *J. Exp. Bot.*, **2002**, *53*, 201–206.
- Faostat. Agricultural data, agricultural production, crop primary. **2013**. <http://faostat.fao.org>

- Franco, L. A.; Matiz, G. E.; Calle, J.; Pinzón, R.; Ospina, L. F. Antiinflammatory activity of extracts and fractions obtained from *Physalis peruviana* L. calyces. *Biomédica*, **2007**, *27*, 110–115.
- Freilich, S.; Lev, S.; Gonda, I.; Reuveni, E.; Portnoy, V.; Oren, E.; Lohse, M.; Galpaz, N.; Bar, E.; Tzuri, G.; Wissotsky, G.; Meir, A.; Burger, J.; Tadmor, Y.; Schaffer, A. A.; Fei, Z.; Giovannoni, J. J.; Lewinsohn, E.; Katzir, N. Systems approach for exploring the intricate associations between sweetness, color and aroma in melon fruits. *BMC Plant Biol.*, **2015**, *15*, 71.
- Fujiwara, H.; Tanaka, Y.; Yonekura-Sakakibara, K.; Fukuchi-Mizutani, M.; Nakao, M.; Fukui, Y.; Yamaguchi, M.; Ashikari, T.; Kusumi, T. cDNA cloning, gene expression and subcellular localization of anthocyanin 5-aromatic acyltransferase from *Gentiana triflora*. *Plant J.*, **1998**, *16*, 421–431.
- Galaz, S.; Morales-Quintana, L.; Moya-León, M. A.; Herrera, R. Structural analysis of the alcohol acyltransferase protein family from *Cucumis melo* shows that enzyme activity depends on an essential solvent channel. *FEBS J.*, **2013**, *280*, 1344–1357.
- Gang, D. R. Evolution of flavors and scents. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **2005**, *56*, 301–325.
- García-Arias, F. L.; Osorio-Guarín, J. A.; Núñez, V. M. Association study reveals novel genes related to yield and quality of fruit in cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) *Front. Plant Sci.*, **2018**, *9*, 362.
- Gardner, H. W. Biological roles and biochemistry of the lipoxygenase pathway. *HortScience*, **1995**, *30*, 197–204.
- Giovannoni, J. J. Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell*, **2004**, *16*, S170–S180.
- Glatter, E. Withanolides and related ergostane-type steroids. *Nat. Prod. Rep.*, **1991**, *8*, 415–40.
- Goda, S.; Takano, K.; Yamagata, Y.; Katakura, Y.; Yutani, K. Effect of N-terminal residues on the stability and folding of human lysozyme expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Eng.*, **2000**, *13*, 299–307.
- Goepfert, S.; Poirier, Y.  $\beta$ -Oxidation in fatty acid degradation and beyond. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **2007**, *10*, 245–251.

- Gomi, K.; Yamasaki, Y.; Yamamoto, H.; Akimitsu, K. Characterization of a hydroperoxide lyase gene and effect of C6-volatiles on expression of genes of the oxylipin metabolism in *Citrus*. *J. Plant Physiol.*, **2003**, *160*, 1219–1231.
- Gonda, I.; Bar, E.; Portnoy, V.; Lev, S.; Burger, J.; Schaffer, A. A.; Tadmor, Y.; Gepstein, S.; Giovannoni, J. J.; Katzir, N.; Lewinsohn, E. Branched-chain and aromatic amino acid catabolism into aroma volatiles in *Cucumis melo* L. fruit. *J. Exp. Bot.*, **2010**, *61*, 1111–1123.
- Gonda, I.; Davidovich-Rikanati, R.; Bar, E.; Lev, S.; Jhirad, P.; Meshulam, Y.; Wissotsky, G.; Portnoy, V.; Burger, J.; Schaffer, A. A.; Tadmor, Y.; Giovannoni, J. J.; Fei, Z.; Fait, A.; Katzir, N.; Lewinsohn, E. Differential metabolism of L-phenylalanine in the formation of aromatic volatiles in melon (*Cucumis melo* L.) fruit. *Phytochemistry*, **2018**, *148*, 122–131.
- Gonda, I.; Lev, S.; Bar, E.; Sikron, N.; Portnoy, V.; Davidovich-Rikanati, R.; Burger, J.; Schaffer, A. A.; Tadmor, Y.; Giovannoni, J. J.; Huang, M.; Fei, Z.; Katzir, N.; Fait, A.; Lewinsohn, E. Catabolism of L-methionine in the formation of sulfur and other volatiles in melon (*Cucumis melo* L.) fruit. *Plant J.*, **2013**, *74*, 458–472.
- González, M.; Gaete-Eastman, C.; Valdenegro, M.; Figueroa, C. R.; Fuentes, L.; Herrera, R.; Moya-León, M. A. Aroma development during ripening of *F. chiloensis* fruit and participation of an alcohol acyltransferase (FcAAT1) gene. *J. Agric. Food Chem.*, **2009**, *57*, 9123–9132.
- Graham, I. A.; Eastmond, P. J. Pathways of straight and branched chain fatty acid catabolism in higher plants. *Prog. Lipid Res.*, **2002**, *41*, 156–181.
- Günther, C.S.; Chervin, C.; Marsh, K. B.; Newcomb, R. D.; Souleyre, E. J. Characterisation of two alcohol acyltransferases from kiwifruit (*Actinidia* spp.) reveals distinct substrate preferences. *Phytochemistry*, **2011**, *72*, 700–710.
- Gupta, S. K.; Roy, S. K. The floral biology of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L. Solanaceae, India). *Indian J. Agric. Sci.*, **1981**, *51*, 353–355.
- Gutiérrez, M. S.; Trincherro, G. D.; Cerri, A. M.; Vilella, F.; Sozzi, G. O. Different responses of goldenberry fruit treated at four maturity stages with the ethylene antagonist 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biol. Technol.*, **2008**, *48*, 199–205.

- Hall, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **1999**, *41*, 95–98.
- Hansen, K.; Poll, L. Conversion of L-isoleucine into 2-methylbut-2-enyl esters in apples. *Lebensm. Wiss. Technol.*, **1993**, *26*, 178–180.
- Harada, M.; Ueda, Y.; Iwata, T. Purification and some properties of alcohol acyltransferase from banana fruit. *Plant Cell Physiol.*, **1985**, *26*, 1067–1074.
- Harb, J.; Streif, J.; Bangerth, F. Synthesis of aroma compounds by controlled atmosphere (CA) stored apples supplied with aroma precursors: alcohols, acids and esters. *Acta Hort.*, **1994**, *368*, 142–149.
- Hatanaka, A. The biogenesis of green odour by green leaves. *Phytochemistry*, **1993**, *34*, 1201–1208.
- Hause, B.; Weichert, H.; Hohne, M.; Kindl, H.; Feussner, I. Expression of cucumber lipid-body lipooxygenase in transgenic tobacco: lipid-body lipooxygenase is correctly targeted to seed lipid bodies. *Planta*, **2000**, *210*, 708–714.
- He, C. Y.; Münster, T.; Saedler, H. On the origin of floral morphological novelties. *FEBS Lett.*, **2004**, *567*, 147–151.
- He, C. Y.; Saedler, H. Heterotopic expression of *MPF2* is the key to the evolution of the Chinese lantern of *Physalis*, a morphological novelty in Solanaceae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2005**, *102*, 5779–5784.
- Hoffmann, L.; Besseau, S.; Geoffroy, P.; Ritzenthaler, C.; Meyer, D.; Lapierre, C.; Pollet, B.; Legrand, M. Acyltransferase-catalysed *r*-coumarate ester formation is a committed step of lignin biosynthesis. *Plant Biosyst.*, **2005**, *139*, 50–53.
- Hoffmann, L.; Maury, S.; Martz, F.; Geoffroy, P.; Legrand, M. Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 95–103.
- Hooks, M. A.; Bode, K.; Couée, I. Regulation of acyl-CoA oxidases in maize seedlings. *Phytochemistry*, **1995**, *40*, 657–660.
- Horton, P.; Park, K.-J.; Obayashi, T.; Fujita, N.; Harada, H.; Adams-Collier, C. J.; Nakai, K. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res.*, **2007**, *35*, W585–W587.

- Igarashi, K.; Ishida, T.; Hori, C.; Samejima, M. Characterization of an endoglucanase belonging to a new subfamily of glycoside hydrolase family 45 of the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2008**, *74*, 5628–5634.
- Irniger, S.; Egli, C. M.; Braus, G. H. Different classes of polyadenylation sites in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **1991**, *11*, 3060–3069.
- Jayanty, S.; Song, J.; Rubinstein, N. M.; Chong, A.; Beaudry, R. M. Temporal relationship between ester biosynthesis and ripening events in bananas. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **2002**, *127*, 998–1005.
- Kausch, K. D.; Handa, A. K. Molecular cloning of a ripeningspecific lipoxygenase and its expression during wild-type and mutant tomato fruit development. *Plant Physiol.*, **1997**, *113*, 1041–1050.
- Kjeldsen, T.; Pettersson, A. F.; Hach, M. Secretory expression and characterization of insulin in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. App. Biochem.*, **1999**, *29*, 79–86.
- Kleiter, A. E.; Gerhardt, B. Glyoxysomal  $\beta$ -oxidation of long-chain fatty acids: completeness of degradation. *Planta*, **1998**, *206*, 125–130.
- Kollmannsberger, H.; Berger, R. G. Precursor atmosphere storage induced flavour changes in apples cv. Red Delicious. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.*, **1992**, *14*, 81–86.
- Koseki, T.; Mese, Y.; Fushinobu, S.; Masaki, K.; Fujii, T.; Ito, K.; Shiono, Y.; Murayama, T.; Iefuji, H. Biochemical characterization of a glycoside hydrolase family 61 endoglucanase from *Aspergillus kawachii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2008**, *77*, 1279–1285.
- Kupska, M.; Jeleń, H. H. In-tube extraction for the determination of the main volatile compounds in *Physalis peruviana* L. *J. Sep. Sci.*, **2017**, *40*, 532–541.
- Kupska, M.; Wasilewski, T.; Jędrkiewicz, R.; Gromadzka, J.; Namieśnik, J. Determination of terpene profiles in potential superfruits. *Int. J. Food Prop.*, **2016**, *19*, 2726–2738.
- Lara, I.; Echeverría, G.; Graell, J.; López, M. L. Volatile emission after controlled atmosphere storage of ‘Mondial Gala’ apples (*Malus × domestica*): relationship to some involved enzyme activities. *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, *55*, 6087–6095.

- Lara, I.; Graell, J.; López, M. L.; Echeverría, G. Multivariate analysis of modifications in biosynthesis of volatile compounds after CA storage of 'Fuji' apples. *Postharvest Biol. Technol.*, **2006**, *39*, 19–28.
- Lara, I.; Miró, R. M.; Fuentes, T.; Sayez, G.; Graell, J.; López, M. L. Biosynthesis of volatile aroma compounds in pear fruit stored under long-term controlled-atmosphere conditions. *Postharvest Biol. Technol.*, **2003**, *29*, 29–39.
- Latza, S.; Ganßer, D.; Berger, R. G. Carbohydrate esters of cinnamic acid from fruits of *Physalis peruviana*, *Psidium guajava* and *Vaccinium vitis-idaea*. *Phytochemistry*, **1996**, *43*, 481–485.
- Leone, A.; Bleve-Zacheo, T.; Gerardi, C.; Melillo, M. T.; Leo, L.; Zacheo, G. Lipoxygenase involvement in ripening strawberry. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, *54*, 6835–6844.
- Leone, A.; Gerardi, C.; Leo, L.; Laddomada, B.; Conti, A.; Bisson, C.; Valentini, S.; Zacheo, G. Analysis of protein expression and the production of aroma compounds during strawberry ripening. *Acta Hort.*, **2003**, *626*, 367–373.
- Li, D.; Xu, Y.; Xu, G.; Gu, L.; Li, D.; Shu, H. Molecular cloning and expression of a gene encoding alcohol acyltransferase (MdAAT2) from apple (cv. Golden Delicious). *Phytochemistry*, **2006**, *67*, 658–667.
- Liberato, S.; Sánchez-Betancourt, E.; Argüelles, J.; González, C.; Núñez, V.; Barrero, L. S. Cytogenetic of *Physalis peruviana* L., and *Physalis floridana* Rydb. Genotypes with differential response to *Fusarium oxysporum*. *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu.*, **2014**, *15*, 51–61.
- Lindenmuth, B.; McDonald, K. Production and characterization of *Acidothermus cellulolyticus* endoglucanase in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, **2011**, *77*, 153–158.
- Ma, X.; Koepke, J.; Panjekar, S.; Fritsch, G.; Stöckigt, J. Crystal structure of vinorine synthase, the first representative of the BAHD superfamily. *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 13576–13583.
- Majumder, K.; Mazumdar, B. C. Changes of pectic substances in developing fruits of cape-gooseberry (*Physalis peruviana* L.) in relation to the enzyme activity and evolution of ethylene. *Sci. Hort.*, **2002**, *96*, 91–101.

- Martínez, M. Revision of *Physalis* section *Epeteiorhiza* (Solanaceae). *Ann. Ins. Biol. Bot.*, **1998**, *69*, 71–117.
- Martínez, W.; Ospina, L. F.; Granados, D.; Delgado, G. *In vitro* studies on the relationship between the anti-inflammatory activity of *Physalis peruviana* extracts and the phagocytic process. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, **2010**, *32*, 63–73.
- Matsui, K. Properties and structures of fatty acid hydroperoxide lyase. *Belg. J. Bot.*, **1998**, *131*, 50–62.
- Matsui, K.; Shibata, Y.; Tateba, H.; Hatanaka, A.; Kajiwara, T. Changes of lipoxygenase and fatty acid hydroperoxide lyase activities in bell pepper fruits during maturation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **1997**, *6*, 199–201.
- Matsui, K.; Shibutani, M.; Hase, T.; Kajiwara, T. Bell pepper fruit fatty acid hydroperoxide lyase is a cytochrome p450 (cyp74b). *FEBS Lett.*, **1996**, *394*, 21–24.
- Mayorga, H.; Duque, C.; Knapp, H.; Winterhalter, P. Hydroxyester disaccharides from fruits of cape gooseberry (*Physalis peruviana*). *Phytochemistry*, **2002**, *59*, 439–445.
- Mayorga, H.; Knapp, H.; Winterhalter, P.; Duque, C. Glycosidically bound flavor compounds of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, *49*, 1904–1908.
- Mazorra, M. F.; Quintana, A. P.; Miranda, D.; Fischer, G.; Chaparro, M. Anatomic aspects of formation and growth of the cape gooseberry fruit *Physalis peruviana* (Solanaceae). *Acta Biol. Colomb.*, **2006**, *11*, 69–81.
- McCain, R. Goldenberry, passionfruit, & white sapote: Potential fruits for cool subtropical areas, In *New Crops*; Janick, J., Simon, J. E., Eds.; John Wiley & Sons Inc.: New York, **1993**; pp 479–486.
- McGuire, R. G. Reporting of objective color measurements. *HortScience*, **1992**, *27*, 1254–1255.
- Menzel, M. Y. The cytotaxonomy and genetics of *Physalis*. *Proc. Am. Philos. Soc.*, **1951**, *95*, 132–183.
- Mir, N. A.; Pérez, R.; Schwallier, P.; Beaudry, R. Relationship between ethylene response manipulation and volatile production in Jonagold variety apples. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, *47*, 2653–2659.

- Montero-Calderón, M.; Rojas-Graü, M. A.; Martín-Belloso, O. Aroma profile and volatiles odor activity along Gold cultivar pineapple flesh. *J. Food Sci.* **2010**, *75*, S506–S512.
- Moya-León, M. A.; Vergara, M.; Bravo, C.; Montes, M. E.; Moggia, C. 1-MCP treatment preserves aroma quality of ‘Packham’s Triumph’ pears during long-term storage. *Postharvest Biol. Technol.*, **2006**, *42*, 185–197.
- Muñoz, J. E.; Morillo, A. C.; Morillo, Y. Random amplified microsatellites (RAMs) in plant genetic diversity studies. *Acta Agron.*, **2008**, *57*, 219–226.
- Murasugi, A.; Tohma-Aiba, Y. Comparison of three signals for secretory expresión of recombinant human midkine in *Pichia pastoris*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2001**, *65*, 2291–2293.
- Myung, K.; Hamilton-Kemp, T. R.; Archibold, D. D. Biosynthesis of *trans*-2-hexanal in response to wounding in strawberry fruit. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, *54*, 1442–1448.
- Nam, Y.-W.; Tichit, L.; Leperlier, M.; Cuerq, B.; Marty, I.; Lelièvre, J.-M. Isolation and characterization of mRNAs differentially expressed during ripening of wild strawberry (*Fragaria vesca* L.) fruits. *Plant Mol. Biol.*, **1999**, *39*, 629–636.
- Noordermeer, M. A.; Veldink, G. A.; Vliegthart, J. F. Fatty acid hydroperoxide lyase: a plant cytochrome P450 enzyme involved in wound healing and pest resistance. *Chembiochem*, **2001**, *2*, 494–504.
- Novoa, R. H.; Bojacá, M.; Galvis, J. A.; Fischer, G. Fruit maturity and calyx drying influence post-harvest behavior of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) stored at 12 °C. *Agron. Colomb.*, **2006**, *24*, 77–86.
- Ohlrogge, J. B.; Jaworski, J. G. Regulation of fatty acid synthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **1997**, *48*, 109–136.
- Olías, J. M.; Sanz, C.; Ríos, J. J.; Pérez, A. G. Substrate specificity of alcohol acyltransferase from strawberry and banana fruits. *ACS Symp. Ser.*, **1995**, *596*, 134–141.
- Olías, R.; Pérez, A. G.; Sanz, C. Catalytic properties of alcohol acyltransferase in different strawberry species and cultivars. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, *50*, 4031–4036.
- Osorio-Guarín, J. A.; Enciso-Rodríguez, F. E.; González, C.; Fernández-Pozo, N.; Mueller, L. A.; Barrero, L. S. Association analysis for disease resistance to *Fusarium oxysporum* in cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). *BMC Genomics*, **2016**, *17*, 248.

- Pang, X.; Guo, X.; Qin, Z.; Yao, Y.; Hu, X.; Wu, J. Identification of aroma-active compounds in Jiashi muskmelon juice by GC-O-MS and OAV calculation. *J. Agric. Food Chem.*, **2012**, *60*, 4179–4185.
- Parker, J. K. Introduction to aroma compounds in foods. In *Flavour development, analysis and perception in food and beverages*; Parker, J. K., Elmore, J. S., Methven, L., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, **2015**; pp 3–30.
- Pérez, A. G.; Olías, R.; Luaces, P.; Sanz, C. Biosynthesis of strawberry aroma compounds through amino acid metabolism. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, *50*, 4037–4042.
- Pérez, A. G.; Ríos, J. J.; Sanz, C.; Olías, J. M. Aroma components and free amino acids in strawberry variety Chandler during ripening. *J. Agric. Food Chem.*, **1992**, *40*, 2232–2235.
- Pérez, A. G.; Sanz, C.; Olías, J. M. Partial purification and some properties of alcohol acyltransferase from strawberry fruits. *J. Agric. Food Chem.*, **1993**, *41*, 1462–1466.
- Pérez, A. G.; Sanz, C.; Olías, R.; Olías, J. M. Lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities in ripening strawberry fruits. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, *47*, 249–253.
- Pérez, A. G.; Sanz, C.; Olías, R.; Ríos, J. J.; Olías, J. M. Evolution of strawberry alcohol acyltransferase activity during fruit development and storage. *J. Agric. Food Chem.*, **1996**, *44*, 3286–3290.
- Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, **2001**, *29*, e45–e50.
- Phillips, D. R.; Matthew, J. A.; Reynolds, J.; Fenwick, G. R. Partial purification and properties of a *cis*-3:*trans*-2-enal isomerase from cucumber fruit. *Phytochemistry*, **1979**, *18*, 401–404.
- Pichersky, E.; Gershenzon, J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **2002**, *5*, 237–243.
- Pichersky, E.; Noel, J. P.; Dudareva, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science*, **2006**, *311*, 808–811.
- Pino, J. A.; Mesa, J. Contribution of volatile compounds to mango (*Mangifera indica* L.) aroma. *Flavour Fragr. J.*, **2006**, *21*, 207–213.

- Poirier, Y.; Antonenkov, V. D.; Glumoff, T.; Hiltunen, J. K. Peroxisomal  $\beta$ -oxidation—a metabolic pathway with multiple functions. *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, *1763*, 1413–1426.
- Pracharoenwattana, I.; Cornah, J. E.; Smith, S. M. Arabidopsis peroxisomal citrate synthase is required for fatty acid respiration and seed germination. *Plant Cell*, **2005**, *17*, 2037–2048.
- Pracharoenwattana, I.; Smith, S. M. When is a peroxisome not a peroxisome? *Trends Plant Sci.*, **2008**, *13*, 522–525.
- Prochile. Cultivo de goldenberry (*Physalis peruviana* L.) en la zona central de Chile. **2011**. <http://www.prochile.gob.cl>
- Puente, L. A.; Pinto-Muñoz, C. A.; Castro, E. S.; Cortés, M. *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: a review. *Food Res. Int.*, **2011**, *44*, 1733–1740.
- Ramadan, M. F. *Physalis peruviana*: a rich source of bioactive phytochemicals for functional foods and pharmaceuticals. *Food Rev. Int.*, **2011a**, *27*, 259–273.
- Ramadan, M. F. Bioactive phytochemicals, nutritional value, and functional properties of cape gooseberry (*Physalis peruviana*): an overview. *Food Res. Int.*, **2011b**, *44*, 1830–1836.
- Ramadan, M. F.; Mörsel, J.-T. Oil Goldenberry (*Physalis peruviana* L.) *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, *51*, 969–974.
- Ramadan, M. M.; El-Ghorab, A. H.; Ghanem, K. Z. Volatile compounds, antioxidants, and anticancer activities of Cape gooseberry fruit (*Physalis peruviana* L.): an *in-vitro* study. *J. Arab. Soc. Med. Res.*, **2015**, *10*, 56–64.
- Rangel, M.; Machado, O. L.; da Cunha, M.; Jacinto, T. Accumulation of chloroplast-targeted lipoxygenase in passion fruit leaves in response to methyl jasmonate. *Phytochemistry*, **2002**, *60*, 619–625.
- Raymond, P.; Spiteri, A.; Dieuaide, M.; Gerhardt, B.; Pradet, A. Peroxisomal  $\beta$ -oxidation of fatty acids and citrate formation by a particulate fraction from early germinating sunflower seeds. *Plant Physiol. Biochem.*, **1992**, *30*, 153–161.

- Rizzolo, A.; Grassi, M.; Zerbini, P. E. Influence of harvest date on ripening and volatile compounds in the scab-resistant apple cultivar 'Golden Orange'. *J. Hortic. Sci. Biotech.*, **2006**, *81*, 681–690.
- Rodríguez, N.; Bueno, M. Study of the cytogenetic diversity of *Physalis peruviana* L. (*Solanaceae*). *Acta Biol. Colomb.*, **2006**, *11*, 75–85.
- Rowan, D. D.; Allen, J. M.; Fielder, S.; Hunt, M. B. Biosynthesis of straight-chain ester volatiles in Red Delicious and Granny Smith apples using deuterium-labeled precursors. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, *47*, 2553–2562.
- Rowan, D. D.; Lane, H. P.; Allen, J. M.; Fielder, S.; Hunt, M. B. Biosynthesis of 2-methylbutyl, 2-methyl-2-butenyl and 2-methylbutanoate esters in Red Delicious and Granny Smith apples using deuterium-labeled substrates. *J. Agric. Food Chem.*, **1996**, *44*, 3276–3285.
- Saitou, N.; Nei, M. The Neighbor-Joining method—a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, **1987**, *4*, 406–425.
- Salas, J. J.; Sánchez, J.; Ramli, U. S.; Manaf, A. M.; Williams, M.; Harwood, J. L. Biochemistry of lipid metabolism in olive and other oil fruits. *Prog. Lipid Res.*, **2000**, *39*, 151–180.
- Salazar, M. R.; Jones, J. W.; Chaves, B.; Cooman, A. A model for the potential production and dry matter distribution of Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) *Scientia Hortic.*, **2008**, *115*, 142–148.
- Sarkar, T. K.; Chattopadhyay, T. K. Correlation studies on cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) *Ann. Agric. Res.*, **1993**, *14*, 211–214.
- Schaffer, R. J.; Friel, E. N.; Souleyre, E. J.; Bolitho, K.; Thodey, K.; Ledger, S.; Bowen, J. H.; Ma, J.-H.; Nain, B.; Cohen, D.; Gleave, A. P.; Crowhurst, R. N.; Janssen, B. J.; Yao, J.-L.; Newcomb, R. D. A genomics approach reveals that aroma production in apple is controlled by ethylene predominantly at the final step in each biosynthetic pathway. *Plant Physiol.*, **2007**, *144*, 1899–1912.
- Schwab, W.; Davidovich-Rikanati, R.; Lewinsohn, E. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *Plant J.*, **2008**, *54*, 712–732.

- Scorer, C. A.; Buckholz, R. G.; Clare, J. J.; Romanos, M. A. The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, **1993**, *136*, 111–119.
- Shalit, M.; Guterman, I.; Volpin, H.; Bar, E.; Tamari, T.; Menda, N.; Adam, Z.; Zamir, D.; Vainstein, A.; Weiss, D.; Pichersky, E.; Lewinsohn, E. Volatile ester formation in roses. Identification of an acetyl-coenzyme A. Geraniol/citronellol acetyltransferase in developing rose petals. *Plant Physiol.*, **2003**, *131*, 1868–1876.
- Shalit, M.; Katzir, N.; Tadmor, Y.; Larkov, O.; Burger, Y.; Shalekhet, F.; Lastochkin, E.; Ravid, U.; Amar, O.; Edelstein, M.; Karchi, Z.; Lewinsohn, E. Acetyl-CoA: alcohol acetyltransferase activity and aroma formation in ripening melon fruits. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, *49*, 794–799.
- Shaw, W. V. Chemical anatomy of antibiotic resistance: chloramphenicol acetyltransferase. *Sci. Prog.*, **1992**, *76*, 565–580.
- Shi, F.; Zhou, X.; Zhou, Q.; Tan, Z.; Yao, M.-M.; Wei, B.-D.; Ji, S.-J. Membrane lipid metabolism changes and aroma ester loss in low-temperature stored Nanguo pears. *Food Chem.*, **2018**, *245*, 446–453.
- Shiota, H. New esteric components in the volatiles of banana fruit (*Musa sapientum* L.). *J. Agric. Food Chem.*, **1993**, *41*, 2056–2062.
- Siedow, J. N. Plant lipoxygenase: structure and function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **1991**, *42*, 145–188.
- Simbaqueba, J.; Sánchez, P.; Sánchez, E.; Núñez, V. M.; Chacón, M. I.; Barrero, L. S.; Mariño-Ramírez, L. Development and characterization of microsatellite markers for the cape gooseberry *Physalis peruviana*. *PLoS ONE*, **2011**, *6*, e26719.
- Sokal, R. R.; Rohlf, F. J. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*, 3rd edition; Freeman, W. H., and Co., New York, **1995**; pp 887.
- Song, J.; Bangerth, F. The production and changes of volatile compounds from apple fruits of different maturities. *Acta Hort.*, **1994**, *368*, 150–159.
- Song, J.; Bangerth, F. Fatty acids as precursors for aroma volatile biosynthesis in pre-climacteric and climacteric apple fruit. *Postharvest Biol. Technol.*, **2003**, *30*, 113–121.

- Song, J.; Leepipattanawit, R.; Deng, W.; Beaudry, R. M. Hexanal vapor is a natural, metabolizable fungicide: inhibition of fungal activity and enhancement of aroma biosynthesis in apple slices. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **1996**, *121*, 937–942.
- Souleyre, E. J.; Greenwood, D. R.; Friel, E. N.; Karunairetnam, S.; Newcomb, R. An alcohol acyltransferase from apple (cv. Royal Gala), MpAAT1, produces esters involved in apple fruit flavour. *FEBS J.*, **2005**, *272*, 3132–3144.
- St Pierre, B.; Laflamme, P.; Alarco, A. M.; De Luca, V. The terminal *O*-acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new class of proteins responsible for coenzyme A-dependent acyl transfer. *Plant J.*, **1998**, *14*, 703–713.
- Sullivan, J. R. The genus *Physalis* (Solanaceae) in the southeastern United States. *Rhodora*, **2004**, *106*, 305–326.
- Takeoka, G. R.; Buttery, R. G.; Flath, R. A. Volatile constituents of Asian pear (*Pyrus serotina*). *J. Agric. Food chem.*, **1992**, *40*, 1925–1929.
- Takeoka, G. R.; Buttery, R. G.; Turnbaugh, J. G.; Benson, M. Odour thresholds of various branched esters. *LWT - Food Sci. Technol.*, **1995**, *28*, 153–156.
- Takeoka, G. R.; Flath, R. A.; Mon, T. R.; Teranishi, R.; Guentert, M. Volatile constituents of apricot (*Prunus armeniaca*). *J. Agric. Food Chem.*, **1990**, *38*, 471–477.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, N.; Kumar, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, **2011**, *28*, 2731–2739.
- Tranbarger, T. J.; Franceschi, V. R.; Hildebrand, D. F.; Grimes, H. D. The soybean 94-kilodalton vegetative storage protein is a lipoxygenase that is localized in paraveinal mesophyll cell vacuoles. *Plant Cell*, **1991**, *3*, 973–987.
- Tressl, R.; Drawert, F. Biogenesis of banana volatiles. *J. Agric. Food Chem.*, **1973**, *21*, 560–565.
- Trillos, O.; Cotes, J. M.; Medina, C. I.; Lobo, M.; Navas, A. A. Morphologic characterization of forty six accessions of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.), in Antioquia (Colombia). *Rev. Bras. Frutic.*, **2008**, *30*, 708–715.
- Trincherro, G.; Sozzi, G.; Cerri, A. M.; Vilella, F.; Fraschina, A. Ripening-related changes in ethylene production, respiration rate and cell-wall enzyme activity in goldenberry

- (*Physalis peruviana* L.), a solanaceous species. *Postharvest Biol. Technol.*, **1999**, *16*, 139–145.
- Ueda, Y.; Fujishita, N.; Chachin, K.; Presence of alcohol acetyltransferase in melons (*Cucumis melo* L.) *Postharvest Biol. Technol.*, **1997**, *10*, 121–126.
- Ulrich, D.; Kecke, S.; Olbricht, K. What do we know about the chemistry of strawberry aroma? *J. Agric. Food Chem.*, **2018**, *66*, 3291–3301.
- Valdenegro, M.; Fuentes, L.; Herrera, R.; Moya-León, M. A. Changes in antioxidant capacity during development and ripening of goldenberry (*Physalis peruviana* L.) fruit and in response to 1-methylcyclopropene treatment. *Postharvest Biol. Technol.*, **2012**, *67*, 110–117.
- Vancanneyt, G.; Sanz, C.; Farmaki, T.; Paneque, M.; Ortego, F.; Castanera, P.; Sánchez-Serrano, J. J. Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, *98*, 8139–8144.
- Vargas-Ponce, O.; Pérez-Álvarez, L. F.; Zamora-Tavares, P.; Rodríguez, A. Assessing genetic diversity in Mexican husk tomato species. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **2011**, *29*, 733–738.
- Veronico, P.; Giannino, D.; Melillo, M. T.; Leone, A.; Reyes, A.; Kennedy, M.; Blev-Zacheo, T. A novel lipoxygenase in pea roots: its function in wounding and biotic stress. *Plant Physiol.*, **2006**, *141*, 1045–1055.
- Vianello, A.; Braidot, E.; Bassi, G.; Macri, F. Lipoxygenase activity on the plasmalemma of sunflower protoplasts and its modulation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1995**, *1255*, 57–62.
- Villatoro, C.; Altisent, R.; Echeverría, G.; Graell, J.; López, M. L.; Lara, I. Changes in biosynthesis of aroma volatile compounds during on-tree maturation of ‘Pink Lady®’ apples. *Postharvest Biol. Technol.*, **2008**, *47*, 286–295.
- Waiss, A. C.; Elliger, C. A.; Haddon, W. F.; Benson, M. Insect inhibitory steroidal saccharide esters from *Physalis peruviana*. *J. Nat. Prod.*, **1993**, *56*, 1365–1372.
- Walker, K.; Croteau, R. Molecular cloning of a 10-deacetylbaccatin III-10-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **2000**, *97*, 583–587.
- Wang, C.; Croft, K. P.; Jarlfors, U.; Hildebrand, D. F. Subcellular localization studies indicate that lipoxygenases 1 to 6 are not involved in lipid mobilization during soybean germination. *Plant Physiol.*, **1999**, *120*, 227–236.

- Wang, K. L.; Li, H.; Ecker, J. R. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell*, **2002**, *14*, S131–S151.
- Wasternack, C.; Parthier, B. Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends Plant Sci.*, **1997**, *2*, 302–307.
- Watkins, C. B.; Miller, W. B. 1-Methylcyclopropene (1-MCP) based technologies for storage and shelf-life extension. *Acta Hort.*, **2005**, *687*, 201–208.
- Wu, S.-J.; Ng, L.-T.; Lin, D.-L.; Huang, S.-N.; Wang, S.-S.; Lin, C.-C. *Physalis peruviana* extract induces apoptosis in human Hep G2 cells through CD95/CD95L system and the mitochondrial signaling transduction pathway. *Cancer Lett.*, **2004**, *215*, 199–208.
- Wyllie, S. G.; Fellman, J. K. Formation of volatile branched chain esters in bananas (*Musa sapientum* L.) *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, *48*, 3493–3496.
- Xia, Y.; Nikolau, B. J.; Schnable, P. S. Cloning and characterization of *CER2*, an *Arabidopsis* gene that affects cuticular wax accumulation. *Plant Cell*, **1996**, *8*, 1291–1304.
- Yahyaoui, F. E.; Wongs-Aree, C.; Latché, A.; Hackett, R.; Grierson, D.; Pech, J.-C. Molecular and biochemical characteristics of a gene encoding an alcohol acyl-transferase involved in the generation of aroma volatile esters during melon ripening. *Eur. J. Biochem.*, **2002**, *269*, 2359–2366.
- Yang, Q.; Reinhard, K.; Schiltz, E.; Matern, U. Characterization and heterologous expression of hydroxycinnamoyl benzoyl-CoA anthranilate *N*-hydroxycinnamoyl benzoyltransferase from elicited cell cultures of carnation, *Dianthus caryophyllus* L. *Plant Mol. Biol.*, **1997**, *35*, 777–789.
- Yen, C.-Y.; Chiu, C.-C.; Chang, F.-R.; Chen, J.; Hwang, C.-C.; Hseu, Y.-C.; Yang, H.-L.; Lee, A.; Tsai, M.-T.; Guo, Z.-L.; Cheng, Y.-S.; Liu, Y.-C.; Lan, Y.-H.; Chang, Y.-C.; Ko, Y.-C.; Chang, H.-W.; Wu, Y.-C. 4 $\beta$ -Hydroxywithanolide E from *Physalis peruviana* (golden berry) inhibits growth of human lung cancer cells through DNA damage, apoptosis and G2/M arrest. *BMC Cancer*, **2010**, *10*, 46.
- Yilmaztekin, M. Analysis of volatile components of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) grown in Turkey by HS-SPME and GC-MS. *Sci. World J.*, **2014a**, *2014*, 796097.
- Yilmaztekin, M. Characterization of potent aroma compounds of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) fruits grown in Antalya through the determination of odor activity values. *Int. J. Food Prop.*, **2014b**, *17*, 469–480.

- Zabetakis, I.; Holden, M. A. Strawberry flavour: analysis and biosynthesis. *J. Sci. Food Agric.*, **1997**, *74*, 421–234.
- Zhang, C.-Y.; Zhang, Q.; Zhong, C.-H.; Guo, M.-Q. Analysis of volatile compounds responsible for kiwifruit aroma by desiccated headspace gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **2016**, *1440*, 255–259.
- Zhang, H.; Samadi, A. K.; Cohen, M. S.; Timmermann, B. N. Anti-proliferative withanolides from the Solanaceae: a structure-activity study. *Pure Appl. Chem.*, **2012**, *84*, 1353–1367.

## MATERIAL SUPLEMENTARIO

**Tabla S1.** Concentración ( $\mu\text{g g PF}^{-1}$ ) de compuestos volátiles producidos por frutos de *Physalis peruviana* L., después del tratamiento exógeno con alcoholes.

Suministro	Compuestos	Tratamiento								
		Control		12 h		24 h		48 h		
<b>Etanol</b>	Acetato de etilo	3.167.825	± 325.152a	2.119.100	± 411.463a	2.155.461	± 67.074a	3.988.244	± 810.563a	
	Butanoato de metilo	1.128.641	± 43.248b	2.079.283	± 27.467a	1.696.867	± 101.162ab	177.464	± 39.980c	
	2-Metil 1-butanol	3.020.459	± 111.080a	3.387.236	± 2.479a	2.988.850	± 472.490a	4.267.245	± 322.890a	
	Butanoato de etilo	21.557.625	± 4.820.752ab	38.988.891	± 3.559.840a	36.420.579	± 1.932.422ab	7.017.077	± 1.225.922b	
	Acetato de butilo	305.997	± 52.844ab	337.970	± 2.111ab	462.533	± 1.349a	257.161	± 39.628b	
	1-Hexanol	627.829	± 19.921b	808.608	± 27.426ab	1.027.874	± 75.990ab	1.372.145	± 258.285a	
	Acetato de 2-metilbutilo	61.412	± 12.277a	44.197	± 10.334a	67.007	± 17.550a	90.721	± 17.419a	
	Butanoato de propilo	52.752	± 7.332bc	43.448	± 9.984c	80.137	± 3.457ab	89.592	± 3.640a	
	Hexanoato de metilo	2.578	± 520b	3.259	± 670b	6.115	± 313a	6.350	± 569a	
	Butanoato de butilo	3.699.975	± 908.422ab	3.028.678	± 33.619b	6.418.868	± 132.281ab	12.823.873	± 868.969a	
	Hexanoato de etilo	1.025.796	± 100.820a	1.565.883	± 621.867a	1.188.642	± 12.360a	1.211.812	± 214.036a	
	Acetato de hexilo	213.853	± 25.153a	62.412	± 9.522c	75.837	± 474bc	153.580	± 21.532ab	
	Benzoato de metilo	11.649	± 2.898ab	6.536	± 1.663b	18.732	± 1.086ab	52.741	± 1.835a	
	Hexanoato de butilo	53.886	± 12.483ab	10.482	± 2.721b	24.384	± 5.244ab	122.177	± 3.353a	
	Butanoato de hexilo	5.621.420	± 1.331.471b	2.394.585	± 487.962b	6.683.221	± 957.646b	18.088.397	± 1.408.692a	
	Octanoato de etilo	3	± 1a	1	± 0a	1	± 1a	2	± 0a	
<b>Butanol</b>	Acetato de etilo	3.167.825	± 325.152a	1.619.579	± 492.956a	2.817.972	± 741.090a	4.041.809	± 547.286a	
	Butanoato de metilo	1.128.641	± 43.248a	1.293.504	± 41.184a	1.413.709	± 352.409a	248.350	± 39.800b	
	2-Metil 1-butanol	3.020.459	± 111.080b	1.934.461	± 414.946b	4.559.525	± 202.760a	4.586.630	± 152.491a	
	Butanoato de etilo	21.557.625	± 4.820.752ab	24.640.649	± 204.956ab	24.733.217	± 4.434.022a	7.802.806	± 1.036.069b	
	Acetato de butilo	305.997	± 52.844a	212.203	± 22.841a	353.209	± 58.654a	241.071	± 43.012a	
	1-Hexanol	627.829	± 19.921b	714.307	± 124.319b	695.301	± 86.313b	1.132.619	± 92.734a	
	Acetato de 2-metilbutilo	61.412	± 12.277a	32.798	± 4.100a	54.631	± 15.797a	77.835	± 13.232a	
	Butanoato de propilo	52.752	± 7.332ab	29.374	± 2.991b	39.979	± 901ab	66.300	± 1.276a	
	Hexanoato de metilo	2.578	± 520b	790	± 51c	4.617	± 367ab	7.916	± 1.067a	
	Butanoato de butilo	3.699.975	± 908.422b	2.324.090	± 170.927b	4.407.108	± 758.932b	9.879.306	± 875.884a	
	Hexanoato de etilo	1.025.796	± 100.820a	738.808	± 69.699a	678.718	± 49.261a	1.199.510	± 271.730a	
	Acetato de hexilo	213.853	± 25.153a	54.441	± 6.328a	83.892	± 2.880a	204.955	± 69.114a	

	Benzoato de metilo	11.649 ±	2.898b	2.849 ±	310b	9.162 ±	514b	24.287 ±	2.723a
	Hexanoato de butilo	53.886 ±	12.483ab	8.697 ±	664b	24.672 ±	2.489ab	64.251 ±	5.082a
	Butanoato de hexilo	5.621.420 ±	1.331.471b	2.774.566 ±	281.124b	6.750.186 ±	340.172ab	13.219.567 ±	2.784.035a
	Octanoato de etilo	3 ±	1a	2 ±	0a	2 ±	0a	10 ±	2a
<b>Hexanol</b>	Acetato de etilo	3.167.825 ±	325.152a	1.663.915 ±	199.571a	2.059.072 ±	371.687a	2.943.988 ±	504.774a
	Butanoato de metilo	1.128.641 ±	43.248a	646.250 ±	75.309a	688.971 ±	169.193a	178.624 ±	12.689b
	2-Metil 1-butanol	3.020.459 ±	111.080a	1.811.439 ±	307.988a	2.497.161 ±	463.927a	2.043.821 ±	200.574a
	Butanoato de etilo	21.557.625 ±	4.820.752a	24.485.724 ±	2.558.021a	20.805.871 ±	4.454.636a	7.762.266 ±	342.234a
	Acetato de butilo	305.997 ±	52.844a	208.470 ±	39.430a	281.777 ±	72.956a	230.469 ±	39.261a
	1-Hexanol	627.829 ±	19.921a	1.397.235 ±	198.511a	828.831 ±	107.750a	712.586 ±	87.252a
	Acetato de 2-metilbutilo	61.412 ±	12.277a	35.863 ±	6.628a	54.985 ±	10.636a	115.471 ±	39.173a
	Butanoato de propilo	52.752 ±	7.332ab	28.888 ±	7.520b	46.999 ±	8.237ab	75.975 ±	11.315a
	Hexanoato de metilo	2.578 ±	520c	4.075 ±	352bc	6.860 ±	45ab	7.148 ±	181a
	Butanoato de butilo	3.699.975 ±	908.422ab	1.916.336 ±	409.223b	4.005.459 ±	732.246ab	8.678.139 ±	1.540.223a
	Hexanoato de etilo	1.025.796 ±	100.820a	670.982 ±	36.929a	762.343 ±	95.972a	1.067.248 ±	111.966a
	Acetato de hexilo	213.853 ±	25.153a	187.826 ±	15.908a	110.966 ±	24.255a	149.971 ±	40.857a
	Benzoato de metilo	11.649 ±	2.898ab	3.710 ±	478b	8.758 ±	1.146ab	22.270 ±	3.615a
	Hexanoato de butilo	53.886 ±	12.483a	24.822 ±	2.866a	44.158 ±	7.640a	73.055 ±	15.697a
	Butanoato de hexilo	5.621.420 ±	1.331.471ab	1.803.660 ±	31.169b	6.034.566 ±	538.150ab	11.258.690 ±	2.072.001a
	Octanoato de etilo	3 ±	1a	1 ±	0a	3 ±	1a	5 ±	1a
<b>Octanol</b>	Acetato de etilo	3.167.825 ±	325.152ab	1.507.259 ±	114.606b	2.171.484 ±	754.833ab	3.809.513 ±	15.812a
	Butanoato de metilo	1.128.641 ±	43.248a	822.844 ±	3.040a	940.690 ±	67.000a	254.191 ±	37.855b
	2-Metil 1-butanol	3.020.459 ±	111.080a	1.733.865 ±	568.866a	2.514.296 ±	480.239a	3.073.241 ±	505.598a
	Butanoato de etilo	21.557.625 ±	4.820.752a	15.998.693 ±	2.523.019ab	19.777.264 ±	1.292.230ab	7.740.891 ±	1.500.969b
	Acetato de butilo	305.997 ±	52.844a	205.680 ±	20.641a	304.215 ±	17.796a	246.455 ±	27.268a
	1-Hexanol	627.829 ±	19.921a	793.252 ±	41.549a	899.175 ±	104.980a	1.477.385 ±	592.825a
	Acetato de 2-metilbutilo	61.412 ±	12.277a	31.923 ±	2.050a	50.882 ±	7.657a	72.435 ±	10.987a
	Butanoato de propilo	52.752 ±	7.332b	21.355 ±	1.769c	48.818 ±	4.007b	85.165 ±	1.671a
	Hexanoato de metilo	2.578 ±	520a	2.376 ±	668a	3.466 ±	257a	3.265 ±	36a
	Butanoato de butilo	3.699.975 ±	908.422ab	1.640.233 ±	300.109b	4.266.303 ±	646.359ab	12.296.311 ±	1.293.462a
	Hexanoato de etilo	1.025.796 ±	100.820a	473.428 ±	79.516b	749.673 ±	93.816ab	1.137.413 ±	147.538a
	Acetato de hexilo	213.853 ±	25.153a	108.691 ±	10.942a	156.901 ±	4.359a	203.746 ±	46.892a
	Benzoato de metilo	11.649 ±	2.898ab	3.814 ±	1.102b	7.120 ±	602ab	18.200 ±	225a

Hexanoato de butilo	53.886	±	12.483a	14.037	±	2.257a	67.283	±	10.369a	65.140	±	16.372a
Butanoato de hexilo	5.621.420	±	1.331.471ab	1.285.257	±	251.733b	6.141.623	±	1.676.013ab	9.389.840	±	624.494a
Octanoato de etilo	3	±	1ab	1	±	0b	1.689	±	23ab	2.083	±	213a

Los valores corresponden a promedios de tres réplicas por tratamiento ± ES. Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de una vía con Tukey HSD como prueba de comparación múltiple a posteriori;  $P \leq 0,05$ ) entre los tratamientos para cada volátil. Los compuestos fueron identificados por GC-MS y confirmados con estándares comerciales.