

## **Poscosecha de frutos: maduración, ablandamiento y control transcripcional\***

### **Postharvest fruits: maturation, softening and transcriptional control**

**Mónica Elizabeth Martínez-González<sup>1</sup>, Rosendo Balois-Morales<sup>2§</sup>, Irán Alia-Tejacal<sup>3</sup>, Moises Alberto Cortes-Cruz<sup>4</sup>, Yolotzin Apatzingan Palomino-Hermosillo<sup>2</sup> y Graciela Guadalupe López-Gúzman<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Nayarit-Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias. Ciudad de la cultura "Amado Nervo", Tepic, Nayarit, México. CP. 63155. (mc.monica.martinez@gmail.com). <sup>2</sup>Universidad Autónoma de Nayarit-Unidad de Tecnología de Alimentos. Ciudad de la cultura "Amado Nervo" s/n. Tepic, Nayarit, México. CP. 63155. (pasingan@gmail.com; lguzman2303@hotmail.com). <sup>3</sup>Universidad Autónoma del estado de Morelos-Posgrado en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural. Av. Universidad núm. 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México. CP. 62209. (iran.alia@uaem.mx). <sup>4</sup>Autor para correspondencia: (balois\_uanayar@hotmail.com).

#### **Resumen**

El proceso de formación de un fruto requiere una serie compleja de interacción de genes y rutas de señalización para la conversión de un ovario de la flor en un fruto. En frutos carnosos involucra el crecimiento, el desarrollo y la maduración del fruto. El objetivo de esta revisión se enfoca en la recopilación de la información sobre investigaciones relevantes relacionadas con la maduración, ablandamiento y regulación transcripcional de los frutos durante el manejo postcosecha de éstos. Para realizar esta búsqueda se hizo uso de múltiples bases de datos (Scielo, Redalyc, Elsevier, Scopus, Wiley Online Library, ScienceDirect, Springer). La importancia de la maduración de los frutos y su análisis a nivel molecular ha sido de gran interés en la investigación, ya que es un proceso fisiológico y bioquímico complejo que conduce a cambios en la apariencia, la textura, el sabor y el aroma. Los factores de transcripción han mostrado tener una gran importancia, no sólo durante el desarrollo temprano, sino también en el control regulatorio de la maduración y la senescencia; aunque hay avances en la identificación de

#### **Abstract**

The process of fruit formation requires a complex series of gene interaction and signaling pathways for the conversion of a flower ovary into a fruit. In fleshy fruits it involves the growth, development and maturation of the fruit. The objective of this review is to compile the information on relevant research related to the ripening, softening and transcriptional regulation of fruits during post - harvest management. In order to carry out this study search, multiple databases were used (Scielo, Redalyc, Elsevier, Scopus, Wiley Online Library, ScienceDirect, Springer). The importance of fruit maturation and its analysis at the molecular level has been of great interest in research, as it is a complex physiological and biochemical process leading to changes in appearance, texture, taste and aroma. Transcription factors have been shown to be of great importance, not only during early development, but also in the regulatory control of maturation and senescence; although there is progress in identifying these regulators, much remains to be investigated. In the near future, it will

estos reguladores, queda mucho por investigar. En un futuro próximo, será posible controlar la maduración de los frutos y alargar su vida de anaquel manipulando la producción de etileno utilizando un enfoque transgénico.

**Palabras clave:** ablandamiento, control transcripcional, etileno, maduración, poscosecha, regulación.

## Introducción

Las semillas representan el germoplasma de la planta, por lo que la estrategia para su dispersión es fundamental para asegurar la supervivencia de la siguiente generación. Los frutos han desarrollado mecanismos complejos para maximizar la eficacia de este proceso (Karlova *et al.*, 2014). Desde el punto de vista ecológico, los frutos inmaduros representan un órgano que debe ser protegido y no debe ser atractivo, el color verde le permite camuflajearse con las hojas (Iqbal *et al.*, 2017). La maduración es un evento coordinado de diferentes rutas bioquímicas reguladas por el etileno que produce cambios en el tejido que rodea a las semillas, volviendo al fruto más atractivo y así ayudar a la dispersión de las mismas. Estos cambios afectan el color, el olor, la textura y el contenido de azúcares, lo que ha sido explotado por los seres humanos para la domesticación de los cultivos (Klee y Giovannoni, 2011; Seymour *et al.*, 2013).

Por ello, se han realizado estudios para una mejor comprensión del órgano floral el desarrollo del fruto (Bao *et al.*, 2010; Seymour *et al.*, 2013) el papel de las hormonas y los genes relacionados con el desarrollo y la maduración de los frutos (Alexander y Grierson, 2002; Cara y Giovannoni, 2008; Kumar *et al.*, 2014), así como los desórdenes fisiológicos (Pegoraro *et al.*, 2010) y las alteraciones epigenéticas de la maduración (Manning *et al.*, 2006; Zhong *et al.*, 2013).

En este sentido, la biología molecular ha contribuido significativamente a elucidar como ocurren el crecimiento y el desarrollo del fruto (Gapper *et al.*, 2013; McAtee *et al.*, 2013; Pech *et al.*, 2013; Seymour *et al.*, 2013; Gapper *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2014; Dos Santos *et al.*, 2015).

Estudios realizados por Bouzayen *et al.* (2010) revelaron a través de herramientas genómicas y post-genómicas avanzadas, los mecanismos por los cuales la calidad nutricional y sensorial se desarrollan durante las etapas de madurez fisiológica y de consumo del fruto utilizando.

be possible to control the maturation of fruits and extend their shelf life by manipulating ethylene production using a transgenic approach.

**Keywords:** ethylene, maturation, postharvest, regulation, softening, transcriptional control.

## Introduction

Seeds represent the germplasm of the plant, so the strategy for dispersal is critical to ensure the survival of the next generation. The fruits have developed complex mechanisms to maximize the efficiency of this process (Karlova *et al.*, 2014). From an ecological point of view, the immature fruits represent an organ that must be protected, so it should not be attractive and its green color allows it to camouflage itself with the leaves (Iqbal *et al.*, 2017). The maturation is a coordinated event of different biochemical pathways regulated by ethylene that produces changes in the tissue surrounding the seeds, making the fruit more attractive and thus helping the dispersion of the same. These changes affect the color, smell, texture and sugar content, which has been exploited by humans for the domestication of crops (Klee and Giovannoni, 2011; Seymour *et al.*, 2013).

Therefore, studies have been carried out for a better understanding of the floral organ development of the fruit (Bao *et al.*, 2010; Seymour *et al.*, 2013) the role of hormones and genes related to the development and the maturation of fruits (Alexander and Grierson, 2002; Cara and Giovannoni, 2008; Kumar *et al.*, 2014), as well as physiological disorders (Pegoraro *et al.*, 2010) and the maturation-associated epigenetic alterations (Manning *et al.*, 2006; Zhong *et al.*, 2013).

In this sense, molecular biology has contributed significantly to elucidating and occur growth and fruit development (Gapper *et al.*, 2013; McAtee *et al.*, 2013; Pech *et al.*, 2013; Seymour *et al.*, 2013; Gapper *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2014; Dos Santos *et al.*, 2015).

Studies by Bouzayen *et al.* (2010) revealed through advanced genomic and post-genomic tools the mechanisms by which nutritional and sensorial quality are developed during the stages of physiological maturity and consumption of the fruit using.

Uno de los fenómenos más estudiados es el ablandamiento de los frutos, que es una serie de eventos genéticamente programados, caracterizados por procesos bioquímicos y fisiológicos que alteran su firmeza, color, sabor y textura (Nishiyama *et al.*, 2007). Dado que la mayor parte de los atributos de calidad se generan durante el proceso de maduración, se ha considerado esencial el comprender mejor los mecanismos involucrados en esta última etapa de desarrollo (Bouzayen *et al.*, 2010). El objetivo de esta revisión se enfoca en la recopilación de la información sobre investigaciones relevantes relacionadas con la maduración, ablandamiento y regulación transcripcional de los frutos durante el manejo poscosecha de éstos.

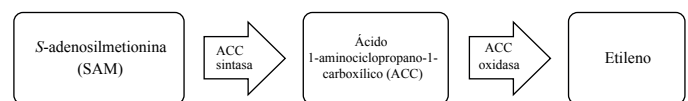
### Biosíntesis de etileno y clasificación de frutos

Los frutos pueden clasificarse como climatéricos y no climatéricos en función de su patrón de aumento en la producción de etileno y bióxido de carbono durante la maduración, aunque existen variaciones importantes en la sincronía y tasa de incremento, técnicamente representa una categorización muy útil para el manejo de la cosecha y manejo poscosecha de los frutos (Lelièvre *et al.*, 1997). Aquellos que presentan un climaterio respiratorio y un aumento en la producción de etileno, se conocen como frutos climatéricos e incluyen a frutos como el tomate, plátano, manzana, pera, mango y papaya (Omboki *et al.*, 2015). En contraste, en frutos no climatéricos como la fresa, uva y los cítricos, el aumento en la respiración no manifiesta un clímax y la producción de etileno es baja o ausente (Dos Santos *et al.*, 2015).

Los principales pasos en la biosíntesis de etileno (Figura 1) involucran la conversión de *S*-adenosilmetionina (SAM) a ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) por la ACC sintasa (ACS) y luego por la ACC oxidasa (ACO) a etileno (Alexander y Grierson, 2002). En el tejido de frutos climatéricos, la biosíntesis de etileno inicia a un nivel bajo durante el desarrollo (sistema 1), pero al inicio de la maduración se vuelve autoctalítico (sistema 2) (Karlova *et al.*, 2014), debido a que la presencia de etileno activa la acción del gen que codifica a la enzima ACO que convierte el ACC a etileno (Liu *et al.*, 2015).

Diversos estudios genéticos han sugerido que el proceso de la maduración está programado en la célula y que requiere de la expresión diferencial de genes, lo que resulta en la transcripción de ARNm específicos y en la síntesis de proteínas de *novo* (Lincoln y Fischer, 1988; Darley *et al.*, 2001).

One of the most studied phenomena is the softening of the fruit, which is a genetically programmed series of events, characterized by biochemical and physiological processes that alter its firmness, color, taste and texture (Nishiyama *et al.*, 2007). Since most of the quality attributes are generated during the maturation process, it has been considered essential to better understand the mechanisms involved in this last stage of development (Bouzayen *et al.*, 2010). The objective of this review is to compile the information on relevant research related to the ripening, softening and transcriptional regulation of fruits during post-harvest management.



**Figura 1. Principales pasos en la biosíntesis de etileno.**  
**Figure 1. Main steps in ethylene biosynthesis.**

### Ethylene biosynthesis and fruit classification

The fruits can be classified as climacteric and non-climacteric according to their pattern of increase in the production of ethylene and carbon dioxide during maturation, although there are important variations in the synchrony and rate of increase, technically represents a very useful categorization for the management of the harvest and post-harvest handling of the fruits (Lelièvre *et al.*, 1997). Those that present a climacteric respiratory and an increase in the production of ethylene, are known as climacteric fruits and include fruits such as tomato, banana, apple, pear, mango and papaya (Omboki *et al.*, 2015). In contrast, in non-climacteric fruits such as strawberry, grape and citrus, increased respiration does not show a climax and ethylene production is low or absent (Dos Santos *et al.*, 2015).

The major steps in ethylene biosynthesis (Figure 1) involve the conversion of *S*-adenosylmethionine (SAM) to 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) by ACC synthase (ACS) and then by ACC oxidase (ACO) to ethylene (Alexander and Grierson, 2002). In the climacteric fruit tissue, ethylene biosynthesis begins at a low level during development (system 1), but at the beginning of maturation it becomes autoclaved (system 2) (Karlova *et al.*, 2014), because presence of ethylene activates the action of the gene encoding the ACO enzyme that converts ACC to ethylene (Liu *et al.*, 2015).

En este sentido, una tendencia en las investigaciones ha sido el uso de técnicas de biología molecular dirigidas al aislamiento, reconocimiento y expresión de los genes de las principales enzimas que actúan durante el ablandamiento ocurrido en la maduración de los frutos (Brummell y Harpster, 2001). Sin embargo, las diferencias moleculares entre la maduración climatérica y la no climatérica aún son poco conocidas, por lo que se ha propuesto que el etileno juega un papel como coordinador de la maduración en especies climatéricas para facilitar la maduración rápida y coordinada (Giovannoni, 2004).

### Regulación molecular de la biosíntesis de etileno

La comprensión del modo de acción del etileno ha progresado con la identificación y el uso de factores de transcripción capaces de unirse a la región promotora de genes relacionados a la biosíntesis y acción del etileno, como los reguladores transcripcionales que pertenecen al tipo *Apetala2* (AP2)/ethylene response factor (ERF) (Klee y Giovannoni, 2011; Pech *et al.*, 2012; Grierson, 2013; Pech *et al.*, 2013).

Anteriormente, las bases moleculares de la síntesis y regulación del etileno fueron un punto focal del análisis de la maduración. Sin embargo, en estudios más recientes se ha hecho énfasis en la caracterización de la transducción de señales del etileno (Giovannoni, 2004). No obstante, el etileno por sí mismo no es suficiente para la maduración y para que haya una respuesta al etileno debe existir un desarrollo adecuado (Lelièvre *et al.*, 1997; Giovannoni, 2001). Por consecuencia, los frutos inmaduros normalmente no maduran en respuesta a la aplicación de etileno exógeno. Bauchot *et al.* (1998) observaron que en melones transgénicos con síntesis de etileno silenciada, algunos aspectos de la maduración climatérica, como la producción de los compuestos volátiles de aroma, son regulados por factores del desarrollo que deben ser coordinados adecuadamente con la síntesis de etileno.

Se han identificado al menos seis diferentes receptores de etileno putativos en el genoma del tomate, LeETR1, LeETR2 (Zhou *et al.*, 1996; Lashbrook *et al.*, 1998), NR (Wilkinson *et al.*, 1995; Payton *et al.*, 1996), LeERT4, LeETR5 (Tieman y Klee, 1999), y LeETR6 (Ciardi y Klee, 2001), los cuales se expresan diferencialmente en varios tejidos como hojas, semillas y flor (Alexander y Grierson, 2002).

Los transcritos que codifican para dos receptores de etileno (NR Y LeTR4) se acumulan en altos niveles en frutos de tomate que están madurando, lo que sugiere que estos dos

Several genetic studies have suggested that the maturation process is programmed into the cell and requires differential expression of genes, resulting in the transcription of specific mRNAs and the synthesis of *de novo* proteins (Lincoln and Fischer, 1988; Darley *et al.*, 2001).

In this sense, a trend in research has been the use of molecular biology techniques aimed at the isolation, recognition and expression of the genes of the main enzymes that act during the softening occurred in the maturation of the fruits (Brummell and Harpster, 2001). However, the molecular differences between climatic and non-climacteric maturation are still poorly known, and it has been proposed that ethylene plays a role as a maturation coordinator in climacteric species to facilitate rapid and coordinated maturation (Giovannoni, 2004).

### Molecular regulation of ethylene biosynthesis

Understanding the mode of action of ethylene has progressed with the identification and use of transcription factors capable of binding to the promoter region of genes related to biosynthesis and ethylene action, such as the transcriptional regulators belonging to the type *Apetala2* (AP2)/ethylene response factor (ERF) (Klee and Giovannoni, 2011; Pech *et al.*, 2012; Grierson, 2013; Pech *et al.*, 2013).

Previously, the molecular bases of ethylene synthesis and regulation were a focal point of the maturation analysis. However, more recent studies have emphasized the characterization of ethylene signal transduction (Giovannoni, 2004). However, ethylene by itself is not sufficient for maturation and for there to be a response to ethylene there must be adequate development (Lelièvre *et al.*, 1997; Giovannoni, 2001). Consequently, immature fruits do not usually mature in response to the application of exogenous ethylene. Bauchot *et al.* (1998) observed that in transgenic melons with silenced ethylene synthesis some aspects of climatic maturation, such as the production of volatile aroma compounds, are regulated by development factors that must be adequately coordinated with ethylene synthesis.

At least six different putative ethylene receptors in the tomato genome, LeETR1, LeETR2 (Zhou *et al.*, 1996; Lashbrook *et al.*, 1998), NR (Wilkinson *et al.*, 1995; Payton *et al.*, 1996), LeERT4, LeETR5 (Tieman y Klee, 1999), and LeETR6 (Ciardi y Klee, 2001), differentially expressed in several tissues such as leaves, seeds and flower (Alexander y Grierson, 2002).

receptores podrían funcionar en la maduración inducida con etileno (Wilkinson *et al.*, 1995; Yen *et al.*, 1995; Alba *et al.*, 2005).

Alba *et al.* (2005) demostraron que el etileno regula la bioquímica, la morfología, y la actividad transcriptómica en todo el desarrollo del fruto. La comparación de los patrones de expresión de genes que codifican enzimas en rutas de desarrollo del fruto a los productos medidos de dichas rutas (etileno, carotenoides y ascorbato) sugieren nuevos puntos reguladores del desarrollo del fruto influenciados por el etileno.

La actividad de la enzima ACC sintasa se ve afectada por la fosforilación de proteínas. Esta evidencia refuerza la idea de que la síntesis de etileno está regulada desde la transcripción hasta su actividad (Argueso *et al.*, 2007); por ejemplo, los perfiles contrastantes de los genes E4 y E8. La transcripción del gen E4 es estimulada tanto por el sistema 1 como por el sistema 2 de biosíntesis de etileno. Mientras que la transcripción del gen E8 es inducido sólo en frutos maduros; es decir, por el sistema 2, un fuerte indicador de que ambos son regulados en el desarrollo y son específicos para ciertos tejidos (Omboki *et al.*, 2015).

Muchos genes están involucrados en la biosíntesis de etileno, pero los genes que codifican las enzimas ACO y ACS son los más caracterizados (Liu *et al.*, 2015). Barry *et al.* (2000) reportaron que nueve genes codifican a la enzima ACS, LeACS1A, LeACS1AB y LeACS2 a 8, de los cuales 4 se expresan durante la maduración del fruto: LeACS1A, LeACS2, LeACS4 y LeACS6. LeACS6 es el principal gen de ACS involucrado en la síntesis de etileno en frutos verdes, aunque LeACS1A también se expresó en los mismos tejidos (plántulas de tomate de 10 días). La expresión de LeACS1 y LeACS4 es inducida durante el paso a la maduración que depende del factor de transcripción RIN-MADS (Vrebalov *et al.*, 2002).

Por otro lado, la enzima ACO es codificada por cinco genes en tomate donde tres de ellos, LeACO1, 3 y 4 se expresan diferencialmente (Van-der-Hoeven *et al.*, 2002). Los niveles de LeACO1 y 4 aumentan de forma masiva en la etapa verde inmadura de un fruto y son altamente expresados durante la maduración climática, mientras que sus niveles se mantuvieron durante el período de maduración (Omboki *et al.*, 2015), mientras que la expresión de LeACO3 es altamente dependiente de etileno (Llop-Tous *et al.*, 2000). Los genes que codifican a ACO y ACS también se han

Transcripts encoding two ethylene receptors (NR and LeTR4) accumulate at high levels in maturing tomato fruits, suggesting that these two receptors may function in ethylene-induced maturation (Wilkinson *et al.*, 1995; Yen *et al.*, 1995; Alba *et al.*, 2005).

Alba *et al.* (2005) demonstrated that ethylene regulates biochemistry, morphology, and transcriptomic activity throughout fruit development. Comparison of the expression patterns of genes encoding enzymes in fruit development pathways to products measured from these routes (ethylene, carotenoids and ascorbate) suggest new regulatory points of fruit development influenced by ethylene.

The activity of the enzyme ACC synthase is affected by protein phosphorylation. This evidence reinforces the idea that ethylene synthesis is regulated from transcription to its activity (Argueso *et al.*, 2007); for example, the contrasting profiles of the E4 and E8 genes. Transcription of the E4 gene is stimulated by both system 1 and system 2 of ethylene biosynthesis. Whereas transcription of the E8 gene is induced only in mature fruits; that is, by system 2, a strong indicator that both are developmentally regulated and are specific to certain tissues (Omboki *et al.*, 2015).

Many genes are involved in ethylene biosynthesis, but the genes encoding the ACO and ACS enzymes are the most characterized (Liu *et al.*, 2015). Barry *et al.* (2000) reported that nine genes encode the enzyme ACS, LeACS1A, LeACS1AB and LeACS2 to 8, of which 4 are expressed during fruit maturation: LeACS1A, LeACS2, LeACS4 and LeACS6. LeACS6 is the main ACS gene involved in the synthesis of ethylene in green fruits, although LeACS1A was also expressed in the same tissues (10-day tomato seedlings). Expression of LeACS1 and LeACS4 is induced during the maturation step depending on the RIN-MADS transcription factor (Vrebalov *et al.*, 2002).

On the other hand, the ACO enzyme is encoded by five genes in tomato where three of them, LeACO1, 3 and 4 are differentially expressed (Van-der-Hoeven *et al.*, 2002). The levels of LeACO1 and 4 increase massively in the immature green stage of a fruit and are highly expressed during climatic maturation, while their levels were maintained during the maturation period (Omboki *et al.*, 2015), while expression of LeACO3 is highly dependent on ethylene (Llop-Tous *et al.*, 2000). The genes encoding ACO and ACS have also been characterized in peach (Tatsuki *et al.*, 2006), melon (Yamamoto *et al.*, 1995) and apple (Dandekar *et al.*, 2004; Omboki *et al.*, 2015).



caracterizado en durazno (Tatsuki *et al.*, 2006), melón (Yamamoto *et al.*, 1995) y manzana (Dandekar *et al.*, 2004; Omboki *et al.*, 2015).

En fresa, un fruto modelo de maduración no climatérica, se ha encontrado que la concentración de etileno es relativamente alta en frutos verdes, disminuye en frutos blancos y finalmente aumenta de nuevo en la etapa roja de la maduración (Perkins-Veazie *et al.*, 1996; Iannetta *et al.*, 2006). Además, éste último aumento está acompañado por una mayor tasa de respiración que se asemeja a la que se produce en frutos climatéricos al inicio de la maduración (Iannetta *et al.*, 2006).

Evidencia reciente de la regulación de los genes MADS-box de la maduración, tanto en tomate (climatérico) como en fresa (no climatérico), sugiere mecanismos reguladores comunes operando en ambas especies, climatéricas y no climatéricas (Vrebalov *et al.*, 2002).

### Control transcripcional de la maduración

El estudio de la regulación transcripcional del desarrollo temprano de frutos carnosos en especies distintas al tomate se ve obstaculizado por la falta de o dificultad de los protocolos de transformación para los estudios funcionales y la falta de mutantes disponibles. Por tanto, la información sobre la función génica de estas especies es a menudo incompleta y se deriva de estudios de expresión o de expresión heteróloga en otras especies (Karlova *et al.*, 2014).

Recientemente, se ha hecho un avance significativo en la comprensión del control transcripcional de la maduración utilizando al tomate (*Solanum lycopersicum*) como sistema modelo. Los factores de transcripción ripening-inhibitor (RIN) (Vrebalov *et al.*, 2002), nonripening (NOR) (Giovannoni, 2007) y colorless nonripening (CNR) (Manning *et al.*, 2006) funcionan como reguladores globales de la maduración y actúan de forma contraria al etileno, mientras que factores de transcripción adicionales que son requeridos para una maduración normal incluyen TOMATO agamous-like1 (TAGL1) (Itkin *et al.*, 2009; Vrebalov *et al.*, 2009), hd-zip homeobox protein-1 (HB-1) (Lin *et al.*, 2008), apetala2a (AP2a) (Chung *et al.*, 2010; Karlova *et al.*, 2011), ethylene response factor6 (ERF6) (Lee *et al.*, 2012), arabidopsis pseudo response regulator2-like (APRR2-Like) (Pan *et al.*, 2013) y fruitfull (TDR4/FUL1 y MBP7/FUL2) (Bemer *et al.*, 2012).

In strawberry, a non-climacteric modeling fruit, it has been found that the ethylene concentration is relatively high in green fruits, decreases in white fruits and finally increases again in the red stage of ripening (Perkins-Veazie *et al.*, 1996; Iannetta *et al.*, 2006). In addition, this last increase is accompanied by a higher rate of respiration that resembles that produced in climacteric fruits at the beginning of maturation (Iannetta *et al.*, 2006).

Recent evidence of regulation of MADS-box maturation, both tomato (climacteric) and strawberry (non-climacteric) genes, suggests common regulatory mechanisms operating in both species, climacteric and non-climacteric (Vrebalov *et al.*, 2002).

### Transcriptional control of maturation

The study of the transcriptional regulation of the early development of fleshy fruits in species other than tomatoes is hampered by the lack of or difficulty of transformation protocols for functional studies and the lack of available mutants. Therefore, information on the gene function of these species is often incomplete and is derived from studies of expression or heterologous expression in other species (Karlova *et al.*, 2014).

Recently, a significant advance has been made in the understanding of transcriptional control of maturation using tomato (*Solanum lycopersicum*) as a model system. The transcription factors ripening-inhibitor (RIN) (Vrebalov *et al.*, 2002), nonripening (NOR) (Giovannoni, 2007) and colorless nonripening (CNR) (Manning *et al.*, 2006) function as global regulators of maturation and act anti-ethylene, whereas additional transcription factors that are required for normal maturation include TOMATO agamous-like1 (TAGL1) (Itkin *et al.*, 2009; Vrebalov *et al.*, 2009), hd-zip homeobox protein-1 (HB-1) (Lin *et al.*, 2008), apetala2a (AP2a) (Chung *et al.*, 2010; Karlova *et al.*, 2011), ethylene response factor 6 (ERF6) (Lee *et al.*, 2012), arabidopsis pseudo response regulator2-like (APRR2-Like) (Pan *et al.*, 2013) and fruitfull (TDR4/FUL1 and MBP7/FUL2) (Bemer *et al.*, 2012).

Most positive transcriptional regulators, such as agamous, shatterproof, mads-box, fruitfull affecting maturation pathways have been described (Omboki *et al.*, 2015). Many of these MADS-box transcription factors influence the synthesis of ethylene by direct binding of the ACS2 and

La mayoría de los reguladores transcripcionales positivos, como *agamous*, *shatterproof*, *mads-box*, *fruitfull* que afectan las rutas de maduración han sido descritos (Omboki *et al.*, 2015). Muchos de estos factores de transcripción de MADS-box influyen en la síntesis de etileno por unión directa de los promotores de los genes ACS2 y ACS4 como en el caso de RIN y TAGL1 (Cherian *et al.*, 2014). TAGL1 está involucrado en la maduración normal del tomate y contribuye a su “carnosidad” (Itkin *et al.*, 2009; Vrebalov *et al.*, 2009).

El mecanismo molecular preciso mediante el cual los productos génicos codificados por RIN, NOR, CNR, TAGL1 y HB-1 operan en la red regulatoria sigue siendo desconocido (Seymour *et al.*, 2013); sin embargo, es probable que las proteínas de MADS-box actúen como heterodímeros o multímeros (Giovannoni, 2007).

Adicionalmente, otros componentes de la red regulatoria, incluyendo a los factores de transcripción que actúan como reguladores negativos, tales como AP2 y SIAP2a (que pertenece a la familia *apetala2/erf* de factores de transcripción y actúa en forma opuesta a RIN, NOR y CNR), han sido reportados como reguladores principales de la maduración (Chung *et al.*, 2010; Karlova *et al.*, 2011). Además, el efector negativo SIAP2a es inducido durante la maduración, pero su represión lleva a una aceleración en la maduración, niveles elevados de producción de etileno y gran acumulación de carotenoides (Chung *et al.*, 2010; Karlova *et al.*, 2011).

### **Pérdida de la firmeza**

El ablandamiento es un proceso de maduración programado en muchos frutos, que les proporciona diferentes características como lo jugoso, lo crujiente y la firmeza (Seymour *et al.*, 2002). Durante este proceso se producen enzimas que modifican la pared celular causando cambios de textura en el fruto; haciéndolo más apetecible a los animales que dispersan las semillas, y/o más susceptibles a patógenos que liberan las semillas (Gapper *et al.*, 2013). La química de la pared celular es el principal contribuyente, junto con los cambios en la turgencia celular, de la textura del fruto y los genes que codifican a las enzimas responsables de estos cambios.

Estos últimos han sido objeto de manipulación genética en el fruto, con el objetivo de extender la vida de anaquel (Vicente *et al.*, 2007; Goulao y Oliveira, 2007; Matas *et al.*, 2009).

ACS4 gene promoters as in the case of RIN and TAGL1 (Cherian *et al.*, 2014). TAGL1 is involved in the normal maturation of the tomato and contributes to its “meatiness” (Itkin *et al.*, 2009; Vrebalov *et al.*, 2009).

The precise molecular mechanism by which the gene products encoded by RIN, NOR, CNR, TAGL1 and HB-1 operate in the regulatory network is still unknown (Seymour *et al.*, 2013); however, it is likely that MADS-box proteins act as heterodimers or multimers (Giovannoni, 2007).

In addition, other components of the regulatory network, including transcription factors acting as negative regulators, such as AP2 and SIAP2a (belonging to the *apetala2/erf* family of transcription factors and acting in opposition to RIN, NOR and CNR), have been reported as major regulators of ripening (Chung *et al.*, 2010; Karlova *et al.*, 2011). In addition, the negative effector SIAP2a is induced during maturation, but its repression leads to an acceleration in maturation, high levels of ethylene production and large accumulation of carotenoids (Chung *et al.*, 2010; Karlova *et al.*, 2011).

### **Loss of firmness**

Softening is a maturation process programmed in many fruits, which provides them with different characteristics such as juicy, crunchy and firmness (Seymour *et al.*, 2002). During this process enzymes are produced that modify the cell wall causing changes of texture in the fruit; making it more palatable to the animals that disperse the seeds, and/or more susceptible to pathogens that release the seeds (Gapper *et al.*, 2013). The chemistry of the cell wall is the main contributor, along with the changes in cellular turgor, the texture of the fruit and the genes that encode the enzymes responsible for these changes.

The latter have been subjected to genetic manipulation in the fruit, with the aim of extending shelf life (Vicente *et al.*, 2007; Goulao and Oliveira, 2007; Matas *et al.*, 2009). Cell wall metabolism during fruit maturation is a very complex process, including more than 50 genes related to cell wall structure (Tomato Genome Consortium, 2012).

Fruit softening is a significant change in the texture of climacteric fruits due to cell wall hemicellulose and the solubilization and depolymerization of pectin by several hydrolases (Rose *et al.*, 2004). The polygalacturonase (PG) enzyme is only expressed in mature fruit tissues and its

El metabolismo de la pared celular durante la maduración del fruto es un proceso muy complejo, que incluye más de 50 genes relacionados con la estructura de la pared celular (Tomato Genome Consortium, 2012).

El ablandamiento de la fruta es un cambio importante en la textura de frutos climatéricos debido a la hemicelulosa de la pared celular y a la solubilización y despolimerización de la pectina por varias hidrolasas (Rose *et al.*, 2004). La enzima poligalacturonasa (PG) sólo se expresa en tejidos del fruto maduro y su transcripción se activa únicamente durante la maduración (Omboki *et al.*, 2015). Diferentes regiones de la región del promotor PG interactúan positiva y negativamente con los elementos que median la expresión del gen que la codifica (Omboki *et al.*, 2015). Se cree que la PG desempeña un papel clave en el ablandamiento del fruto, aunque estudios transgénicos han indicado que la PG no es la única enzima responsable (Giovannoni *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1990).

Además de la PG, que elimina los residuos de galactosil de la pectina (Atkinson *et al.*, 1998), un conjunto de enzimas modificadoras de la pared celular también participan en la maduración y los genes que las codifican se han aislado a partir de algunas especies, pero principalmente del tomate: la  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa elimina el arabinosil y algunos otros residuos de la pectina (Sozzi *et al.*, 2002; Itai *et al.*, 2003); la ramnogalacturonasa (RG) hidroliza los enlaces  $\alpha$ -1,2 entre los residuos de galacturonosil y ramnosil en la pectina (Wong, 2008), la xiloglucano/endotransglucosilasa/hidrolasa hidroliza o transglicosolata xiloglucano (Saladié *et al.*, 2007); las glicosidasas ( $\beta$ -galactosidasa) eliminan los residuos de galactosilo de la pectina y el xiloglucano (Smith *et al.*, 2002).

Las mananasas hidrolizan al azar el enlace  $\beta$  de las cadenas principales de manano que constituyen parte de los glicanos de hemicelulosa (Rodríguez-Gacio *et al.*, 2012); las pectato liasas (PL) catalizan la escisión eliminadora de pectina desesterificada (Marín-Rodríguez *et al.*, 2002); las pectinmetilesterasas (PME) degradan poliuronidos metilesterificados (Wakabayashi *et al.*, 2003) y las expansinas interrumpen los enlaces de hidrógeno entre las microfibrillas de celulosa y glicanos entrecruzados (Rose *et al.*, 1997; Brummell *et al.*, 1999b). La contribución exacta que cada enzima presta para el ablandamiento del fruto sigue siendo poco clara debido al hecho de que los mecanismos debajo de la pared celular mediados por los cambios de textura son complejos.

transcription is activated only during maturation (Omboki *et al.*, 2015). Different regions of the PG promoter region interact positively and negatively with elements that mediate the expression of the gene encoding it (Omboki *et al.*, 2015). The PG is believed to play a key role in softening the fruit, although transgenic studies have indicated that PG is not the only enzyme responsible (Giovannoni *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 1990).

In addition to PG, which removes galactosyl residues from pectin (Atkinson *et al.*, 1998), a set of cell wall modifying enzymes also participate in maturation and the genes encoding them have been isolated from some species, but mainly tomato:  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase removes arabinosil and some other pectin residues (Sozzi *et al.*, 2002; Itai *et al.*, 2003); the ramnogalacturonase (RG) hydrolyzes  $\alpha$ -1,2 bonds between the galacturonosyl and ramnosil residues in pectin (Wong, 2008), xyloglucan/endotransglucosylase/hydrolase hydrolyzes or xyloglucan transglicosolate (Saladié *et al.*, 2007); glycosidasas ( $\beta$ -galactosidase) remove galactosyl residues from pectin and xyloglucan (Smith *et al.*, 2002).

The mannanases hydrolyse the  $\beta$  bond of the mannan backbones that are part of the hemicellulose glycans at random (Rodríguez-Gacio *et al.*, 2012); pectin lyases (PL) catalyze cleavage of deesterified pectin (Marín-Rodríguez *et al.*, 2002); pseudomethylesterases (PME) degrade methyl esterified polyuronides (Wakabayashi *et al.*, 2003) and expansins disrupt hydrogen bonds between cellulose microfibrils and crosslinked glycans (Rose *et al.*, 1997; Brummell *et al.*, 1999b). The exact contribution that each enzyme provides for the softening of the fruit remains unclear due to the fact that the mechanisms under the cell wall mediated by texture changes are complex.

Taking tomato as a model, some genes potentially related to cell wall degradation have been isolated (Bouzayen *et al.*, 2010). However, suppression of candidate genes, such as those coding for PG, PME and  $\beta$ -glucanase, has been shown to have no major impact on the fruit's firmness evolution (Giovannoni *et al.*, 1989; Tieman *et al.*, 1992; Brummell *et al.*, 1999a).

Within the family of genes that degrade the cell wall of climacteric fruits, some members are regulated by ethylene, while others are not, confirming the coexistence of dependent and ethylene-independent processes (Flores *et al.*



Tomando al tomate como modelo, se han aislado algunos genes potencialmente relacionados con la degradación de la pared celular (Bouzayen *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha mostrado que la supresión de los genes candidatos, como aquellos que codifican para PG, PME y  $\beta$ -glucanasa, no tienen gran impacto en la evolución de la firmeza del fruto (Giovannoni *et al.*, 1989; Tieman *et al.*, 1992; Brummell *et al.*, 1999a).

Dentro de la familia de genes que degradan la pared celular de frutos climatéricos, algunos miembros son regulados por el etileno, mientras que otros no, lo que confirma la coexistencia de procesos dependientes e independientes de etileno (Flores *et al.*, 2001; Nishiyama *et al.*, 2007). En general, parece que el ablandamiento del fruto involucra a muchos genes que codifican una variedad de enzimas que degradan la pared celular y proteínas no enzimáticas. Cada proteína podría jugar un papel específico en el ablandamiento y en los cambios de textura (Bouzayen *et al.*, 2010).

El desmontaje de la matriz de polisacáridos de la pared celular relacionado con la maduración, es generalmente el único factor que se menciona al describir la base estructural del ablandamiento del fruto y la pérdida asociada con la vida útil y la calidad del fruto, aunque hay otros (Matas *et al.*, 2009). Sin embargo, estudios recientes han comenzado a examinar la implicación potencial y la importancia relativa de otras estructuras y procesos fisiológicos. Por ejemplo, se ha propuesto que las diferencias en la estructura y la composición de la cutícula del fruto de tomate pueden estar asociados con la variación sustancial de la vida de anaquel del fruto que se ha reportado en diferentes genotipos (Saladié *et al.*, 2007).

La cutícula cumple funciones biológicas de impacto en la calidad y la vida de anaquel de frutos, incluyendo la capacidad de mantener la integridad de la piel (Hovav *et al.*, 2007), controlar la transpiración cuticular (Leide *et al.*, 2007) y limitar la infección microbiana. Además, juega un papel en la interacción planta-insecto como componente de la traducción de señales para la activación de genes específicos, controlando los cambios de temperatura y proporcionando soporte mecánico (Tafolla-Arellano *et al.*, 2013). Otros reportes han resaltado los procesos relacionados con la maduración que probablemente contribuyen a la firmeza del fruto, como la presión de turgencia (Saladié *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2008).

*et al.*, 2001; Nishiyama *et al.*, 2007). In general, it appears that softening of the fruit involves many genes encoding a variety of enzymes that degrade the cell wall and non-enzymatic proteins. Each protein could play a specific role in softening and texture changes (Bouzayen *et al.*, 2010).

Disassembly of the cell wall polysaccharide matrix related to maturation is generally the only factor mentioned in describing the structural basis of fruit softening and loss associated with shelf life and fruit quality, although there are others (Matas *et al.*, 2009). However, recent studies have begun to examine the potential implication and relative importance of other physiological structures and processes. For example, it has been proposed that differences in the structure and composition of the cuticle of the tomato fruit may be associated with the substantial variation in shelf life of the fruit that has been reported in different genotypes (Saladie *et al.*, 2007).

The cuticle fulfills biological functions of impact on the quality and shelf life of fruits, including the ability to maintain skin integrity (Hovav *et al.*, 2007), control cuticular transpiration (Leide *et al.*, 2007) and limit microbial infection. In addition, it plays a role in the plant-insect interaction as a component of signal translation for the activation of specific genes, controlling temperature changes and providing mechanical support (Tafolla-Arellano *et al.*, 2013). Other reports have highlighted maturation processes that probably contribute to fruit firmness, such as turgor pressure (Saladie *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2008).

## Conclusions

Despite the progress in the study of the mechanisms of fruit maturation, a large number of questions remain, such as the relationship between ethylene synthesis and the differential expression of genes related to the production of volatile compounds, with the color change, but more so, with those that encode the enzymes related to softening.

Transcription factors have been shown to be of great importance, not only during early development but also in the regulatory control of maturation and senescence, although there is progress in identifying these regulators, much remains to be investigated.

## Conclusiones

A pesar del avance en el estudio de los mecanismos de la maduración de los frutos, aún quedan sin responder un gran número de interrogantes, como la relación entre la síntesis de etileno y la expresión diferencial de genes relacionados con la producción de compuestos volátiles, con el cambio de color, pero más aún, con los que codifican a las enzimas relacionadas con el ablandamiento.

Los factores de transcripción han mostrado tener una gran importancia, no sólo durante el desarrollo temprano, sino también en el control regulatorio de la maduración y la senescencia, aunque hay avances en la identificación de estos reguladores, aún queda mucho por investigar.

El ablandamiento del fruto es el proceso que se da como resultado de la hidrólisis de los diversos componentes de la pared celular que incluyen celulosa, hemicelulosa, pectina y proteínas. La hidrólisis de estos componentes se produce por la acción de PG, PME, PL, RG, endo-1,4- $\beta$ -D-glucanasa (EGasa) y  $\beta$ -galactosidasa. El papel de estas enzimas ha sido ampliamente confirmado mediante la aplicación de técnicas moleculares que implican sobreexpresar y disminuir la actividad enzimática conocida; es decir, alteración en el proceso de hidrólisis.

En un futuro próximo, será posible controlar la maduración de los frutos y alargar su vida de anaquel manipulando la producción de etileno utilizando un enfoque transgénico.

## Agradecimientos

Proyecto apoyado por el fondo sectorial de investigación para la educación, cb-2014-01/242718.

## Literatura citada

Alba, R.; Payton, P.; Fei, Z.; McQuinn, R.; Debbie, P.; Martin, G. B. and Giovannoni, J. J. 2005. Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. *The Plant Cell*. 17(11):2954-2965.

Alexander, L. and Grierson, D. 2002. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *J. Exp. Bot.* 53:2039-2055.

The softening of the fruit is the process that occurs as a result of the hydrolysis of the various components of the cell wall including cellulose, hemicellulose, pectin and proteins. The hydrolysis of these components is produced by the action of PG, PME, PL, RG, endo-1,4- $\beta$ -D-glucanase (EGase) and  $\beta$ -galactosidase. The role of these enzymes has been widely confirmed by the application of molecular techniques that involve overexpressing and diminishing the known enzymatic activity; that is, alteration in the hydrolysis process.

In the near future, it will be possible to control the maturation of fruits and extend their shelf life by manipulating ethylene production using a transgenic approach.

*End of the English version*



- Argueso, C. T.; Hansen, M. and Kieber, J. J. 2007. Regulation of ethylene biosynthesis. *J. Plant Growth Reg.* 2(26):92-105.
- Atkinson, R. G.; Bolitho, K. M.; Wright, M. A.; Iturriagagoitia-Bueno, T.; Reid, S. J. and Ross, G. S. 1998. Apple ACC-oxidase and polygalacturonase: ripening-specific gene expression and promoter analysis in transgenic tomato. *Plant Molecular Biology*. 38: 449-460.
- Bao, F.; Azhakanandam, S. and Franks, R. G. 2010. SEUSS and SEUSS-LIKE transcriptional adaptors regulate floral and embryonic development in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 152: 821-836.
- Barry, C. S.; Llop-Tous, M. I. and Grierson, D. 2000. The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato. *Plant Physiol.* 123: 979-986.
- Bauchot, A. D.; Mottram, D. S.; Dodson, A. T. and John, P. 1998. Effect of aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase antisense gene on the formation of volatile esters in cantaloupe *Charentais melon* (cv. Vedrandais). *J. Agric. Food Chem.* 46(11):4787-4792.
- Bemer, M.; Karlova, R.; Ballester, A. R.; Tikunov, Y. M.; Bovy, A. G.; Wolters-Arts, M.; Rossetto, P. de B.; Angenent, G. C. and Maagd, R. A. 2012. The tomato fruitfull homologs TDR4/FUL1 and MBP7/FUL2 regulate ethylene-independent aspects of fruit ripening. *The Plant Cell*. 24(11):4437-4451.
- Bouzayen, M.; Latché, A.; Nath, P. and Pech, J. C. 2010. Mechanism of fruit ripening. *In: plant developmental biology- biotechnological perspectives*, Pua, E. C. and Davey, M. R. (Eds.). Springer-Verlag, Berlin, Germany. Vol. 1. 319-339 pp.
- Brummell, D. A.; Hall, B. D. and Bennett, A. B. 1999a. Antisense suppression of tomato endo-1, 4- $\beta$ -glucanase Cel2 mRNA accumulation increases the force required to break fruit abscission zones but does not affect fruit softening. *Plant Mol. Biol.* 40(4):615-622.

- Brummell, D. A.; Harpster, M. H.; Civello, P. M.; Palys, J. M.; Bennett, A. B. and Dunsmuir, P. 1999b. Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *The Plant Cell*. 11(11):2203-2216.
- Brummell, D. A. and Harpster, M. H. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *In: Plant Cell Walls*. Carpita, N. C.; Campbell, M. and Tierney, M. (Eds.). 1<sup>a</sup> (Ed.). Springer Science. 311-340 pp.
- Cara, B. and Giovannoni, J. J. 2008. Molecular biology of ethylene during tomato fruit development and maturation. *Plant Sci*. 175:106-113.
- Cherian, S.; Figueroa, C. R. and Nair, H. 2014. 'Movers and shakers' in the regulation of fruit ripening: a cross-dissection of climacteric *versus* non-climacteric fruit. *J. Exp. Bot.* eru280.
- Chung, M. Y.; Vrebalov, J.; Alba, R.; Lee, J.; McQuinn, R.; Chung, J. D. and Giovannoni, J. 2010. A tomato (*Solanum lycopersicum*) APETALA2/ERF gene, SlAP2a, is a negative regulator of fruit ripening. *The Plant J*. 64(6):936-947.
- Ciardi, J. and Klee, H. 2001. Regulation of ethylene-mediated responses at the level of the receptor. *Ann. Bot.* 88(5):813-822.
- Dandekar, A. M.; Teo, G.; DeFilippi, B. G.; Uratsu, S. L.; Passey, A. J.; Kader, A. A.; Stow, J. R.; Colgan, R. J. and James, D. J. 2004. Effect of down-regulation of ethylene biosynthesis on fruit flavor complex in apple fruit. *Transgenic Res*. 13(4):373-384.
- Darley, C. P.; Forrester, A. M. and McQueen-Mason, S. J. 2001. The molecular basis of plant cell wall extension. *In: Plant Cell Walls*. Carpita, N. C.; Campbell, M. y Tierney, M. (Eds.). 1<sup>a</sup> (Ed.). Springer Science. 179-195 pp.
- Dos Santos, R. S.; Arge, L. W. P.; Costa, S. I.; Machado, N. D.; de Mello-Farias, P. C.; Rombaldi, C. V. and de Oliveira, A. C. 2015. Genetic regulation and the impact of omics in fruit ripening. *Plant Omics*. 8(2):78-88.
- Flores, F.; Ben Amor, M.; Jones, B.; Pech, J. C.; Bouzayen, M.; Latché, A. and Romojaro, F. 2001. The use of ethylene-suppressed lines to assess differential sensitivity to ethylene of the various ripening pathways in Cantaloupe melons. *Physiol. Plantarum*. 113:128-133.
- Gapper, N. E.; Giovannoni, J. J. and Watkins, C. B. 2014. Understanding development and ripening of fruit crops in an 'omics' era. *Hortic. Research*. 1.
- Gapper, N. E.; McQuinn, R. P. and Giovannoni, J. J. 2013. Molecular and genetic regulation of fruit ripening. *Plant Mol. Biol*. 82(6):575-591.
- Giovannoni, J. J. 2001. Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Ann. Rev. Plant Physiol*. 52: 725-749.
- Giovannoni, J. J. 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell*. 16(1):S170-S180.
- Giovannoni, J. J. 2007. Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Current Opinion Plant Biol*. 10(3):283-289.
- Giovannoni, J. J.; DellaPenna, D.; Bennett, A. B. and Fischer, R. L. 1989. Expression of a chimeric polygalacturonase gene in transgenic rin (ripening inhibitor) tomato fruit results in polyuronide degradation but not fruit softening. *The Plant Cell*. 1(1):53-63.
- Goulao, L. F.; Santos, J.; de Sousa, I. and Oliveira, C. M. 2007. Patterns of enzymatic activity of cell wall-modifying enzymes during growth and ripening of apples. *Postharvest Biol. Technol*. 43(3):307-318.
- Grierson, D. 2013. Ethylene and the control of fruit ripening. *In: Seymour, G. B.; Poole, M.; Giovannoni, J. J. and Tucker, G. A. (Eds.). 1<sup>a</sup> (Ed.). The Molecular Biology and Biochemistry of Fruit Ripening*. Blackwell Publishing Ltd. Ames, IA, USA. 43-73 pp.
- Hovav, R.; Chehanovsky, N.; Moy, M.; Jetter, R. and Schaffer, A. A. 2007. The identification of a gene (Cwp1), silenced during *Solanum* evolution, which causes cuticle microfissuring and dehydration when expressed in tomato fruit. *The Plant J*. 52(4):627-639.
- Iannetta, P. P.; Laarhoven, L. J.; Medina-Escobar, N.; James, E. K., McManus, M. T.; Davies, H. V. and Harren, F. J. 2006. Ethylene and carbon dioxide production by developing strawberries show a correlative pattern that is indicative of ripening climacteric fruit. *Physiol. Plantarum*. 127(2):247-259.
- Iqbal, N.; Khan, N. A.; Ferrante, A.; Trivellini, A.; Francini, A. and Khan, M. I. R. 2017. Ethylene role in plant growth, development and senescence: interaction with other phytohormones. *Frontiers Plant Sci*. 8.
- Itai, A.; Ishihara, K. and Bewley, J. D. 2003. Characterization of expression, and cloning, of beta-D-xylosidase and alpha-L-arabinofuranosidase in developing and ripening tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit. *J. Exp. Bot.* 54:2615-2622.
- Itkin, M.; Seybold, H.; Breitel, D.; Rogachev, I.; Meir, S. and Aharoni, A. 2009. Tomato agamous-like 1 is a component of the fruit ripening regulatory network. *The Plant J*. 60(6):1081-1095.
- Jiménez-Bermúdez, S.; Redondo-Nevado, J.; Muñoz-Blanco, J.; Caballero, J. L.; López-Aranda, J. M.; Valpuesta, V.; Pliego-Alfaro, F.; Quesada, M. A. and Mercado, J. A. 2002. Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. *Plant Physiol*. 128: 751-759.
- Karlova, R.; Chapman, N.; David, K.; Angenent, G. C.; Seymour, G. B. and de Maagd, R. A. 2014. Transcriptional control of fleshy fruit development and ripening. *J. Exp. Bot.* 65(16):4527-4541.
- Karlova, R.; Rosin, F. M.; Busscher-Lange, J.; Parapunova, V.; Do, P. T.; Fernie, A. R.; Fraser, P. D.; Baxter, C.; Angenent, G. C. and de Maagd, R. A. 2011. Transcriptome and metabolite profiling show that APETALA2a is a major regulator of tomato fruit ripening. *The Plant Cell Online*. 23(3):923-941.
- Klee, H. J. and Giovannoni, J. J. 2011. Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. *Ann. Rev. Gen.* 45: 41-59.
- Kumar, R.; Khurana, A. and Sharma, A. K. 2014. Role of plant hormones and their interplay in development and ripening of fleshy fruits. *J. Exp. Bot.* 65: 4561-4575.
- Lashbrook, C.; Tieman, D. and Klee, H. 1998. Differential regulation of the tomato ETR gene family throughout plant development. *Plant J*. 15: 243-252.
- Lee, J. M.; Joung, J. G.; McQuinn, R.; Chung, M. Y.; Fei, Z.; Tieman, D.; Klee, H. and Giovannoni, J. 2012. Combined transcriptome, genetic diversity and metabolite profiling in tomato fruit reveals that the ethylene response factor SlERF6 plays an important role in ripening and carotenoid accumulation. *The Plant J*. 70(2):191-204.
- Leide, J.; Hildebrandt, U.; Reussing, K.; Riederer, M. and Vogg, G. 2007. The developmental pattern of tomato fruit wax accumulation and its impact on cuticular transpiration barrier properties: effects of a deficiency in a  $\beta$ -ketoacyl-coenzyme A synthase (LeCER6). *Plant Physiol*. 144(3):1667-1679.
- Lelièvre, J. M.; Latché, A.; Jones, B.; Bouzayen, M. and Pech, J. C. 1997. Ethylene and fruit ripening. *Physiol. Plantarum*. 101:727-739.

- Lin, Z.; Hong, Y.; Yin, M.; Li, C.; Zhang, K. and Grierson, D. 2008. A tomato HD-Zip homeobox protein, LeHB-1, plays an important role in floral organogenesis and ripening. *The Plant J.* 55(2):301-310.
- Lincoln, J. E. and Fischer, R. L. 1988. Diverse mechanisms for the regulation of ethylene-inducible gene expression. *Molecular and General Genetics MGG.* 212(1):71-75.
- Liu, C.; Zhao, A.; Zhu, P.; Li, J.; Han, L.; Wang, X.; Fan, W.; Lü, R.; Wang, C.; Li, Z.; Lu, C. and Lu, C. 2015. Characterization and expression of genes involved in the ethylene biosynthesis and signal transduction during ripening of mulberry fruit. *PLoS one.* 10(3):e0122081.
- Llop-Tous, I.; Barry, C. S. and Grierson, D. 2000. Regulation of ethylene biosynthesis in response to pollination in tomato flowers. *Plant Physiol.* 123(3):971-978.
- Manning, K.; Tor, M.; Poole, M.; Hong, Y.; Thompson, A. J.; King, G. J.; Giovannoni, J. J. and Seymour, G. B. 2006. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nature Gen.* 38(8):948-952.
- Marín-Rodríguez, M. C.; Orchard, J. and Seymour, G. B. 2002. Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *J. Exp. Bot.* 53:2115-2119.
- Matas, A. J.; Gapper, N. E.; Chung, M. Y.; Giovannoni, J. J. and Rose, J. K. 2009. Biology and genetic engineering of fruit maturation for enhanced quality and shelf-life. *Current Opinion Biotechnol.* 20(2):197-203.
- McAtee, P.; Karim, S.; Schaffer, R. and David, K. 2013. A dynamic interplay between phytohormones is required for fruit development, maturation, and ripening. *Frontiers in Plant Science.* 4:79.
- Nishiyama, K.; Guis, M.; Rose, J. K.; Kubo, Y.; Bennett, K. A.; Wangjin, L.; Kato, K.; Koichiro, U.; Nakano, R.; Inaba, A.; Bouzayen, M.; Latché, A.; Pech, J. C. and Bennett, A. B. 2007. Ethylene regulation of fruit softening and cell wall disassembly in Charentais melon. *J. Exp. Bot.* 58(6):1281-1290.
- Omboki, R. B.; Wu, W.; Xie, X. and Mamadou, G. 2015. Ripening genetics of the tomato fruit. *Inter. J. Agric. Crop Sci.* 8(4):567-572.
- Pan, Y.; Bradley, G.; Pyke, K.; Ball, G.; Lu, C.; Fray, R.; Marshall, A.; Jayasuta, S.; Baxter, C.; van Wijk, R.; Boyden, L.; Cade, R.; Chapman, N. H.; Fraser, P. D.; Hodgman, C. and Seymour, G. B. 2013. Network inference analysis identifies an APRR2-like gene linked to pigment accumulation in tomato and pepper fruits. *Plant Physiol.* 161(3):1476-1485.
- Payton, S.; Fray, R. G.; Brown, S. and Grierson, D. 1996. Ethylene receptor expression is regulated during fruit ripening, flower senescence and abscission. *Plant Mol. Biol.* 31(6):1227-1231.
- Pech, J. C.; Purgatto, E.; Girardi, C. L.; Rombaldi, C. V. and Latché, A. 2013. Current challenges in postharvest biology of fruit ripening. *Current Agric. Sci. Technol.* 19(1-18).
- Pech, J. C.; Purgatto, E.; Latché, A. and Bouzayen, M. 2012. Ethylene and fruit ripening. *In: the plant hormone ethylene, annual plant reviews.* McManus, M. T. (Ed.). 1<sup>a</sup> (Ed.). Blackwell Publishing, Oxford, UK. 44: 275-304.
- Pegoraro, C.; Zanuzo, M. R.; Chaves, F. C.; Brackmann, A.; Girardi, C. L.; Lucchetta, L.; Nora, L.; Silva, J. A. and Rombaldi, C. V. 2010. Physiological and molecular changes associated with prevention of woolliness in peach following pre-harvest application of gibberellic acid. *Postharvest Biol. Technol.* 57(1):19-26.
- Perkins-Veazie, P. M.; Huber, D. J. and Brecht, J. K. 1996. In vitro growth and ripening of strawberry fruit in the presence of ACC, STS or propylene. *Ann. App. Biol.* 128(1):105-116.
- Rodríguez-Gacio, M. C.; Iglesias-Fernández, R.; Carbonero, P. and Matilla, A. J. 2012. Softening-upmannan-rich cellwalls. *J. Exp. Bot.* 63: 3976-3988.
- Rose, J. K.; Lee, H. H. and Bennett, A. B. 1997. Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* 94: 5955-5960.
- Saladié, M.; Matas, A. J.; Isaacson, T.; Jenks, M. A.; Goodwin, S. M.; Niklas, K. J.; Xiaolin, R.; Labavitch, J. M.; Shackel, K. A.; Fernie, A. R.; Lytovchenko, A.; O'Neill, M. A.; Watkins, C. B. and Rose, J. K. 2007. A reevaluation of the key factors that influence tomato fruit softening and integrity. *Plant Physiol.* 144: 1012-1028.
- Seymour, G. B.; Manning, K.; Eriksson, E. M.; Popovich, A. H. and King, G. J. 2002. Genetic identification and genomic organization of factors affecting fruit texture. *J. Exp. Bot.* 53: 2065-2071.
- Seymour, G. B.; Ostergaard, L.; Chapman, N. H.; Knapp, S. and Martin, C. 2013. Fruit development and ripening. *Ann. Rev. Plant Biol.* 64: 219-241.
- Smith, C. J. S.; Watson, C. F.; Bird, C. R.; Ray, J.; Schuch, W. and Grierson, D. 1990. Expression of a truncated tomato polygalacturonase gene inhibits expression of the endogenous gene in transgenic plants. *Molecular and General Genetics MGG.* 224(3):477-481.
- Smith, D. L.; Abbott, J. A. and Gross, K. C. 2002. Down-regulation of tomato beta-galactosidase 4 results in decreased fruit softening. *Plant Physiol.* 129: 1755-1762.
- Sozzi, G. O.; Greve, L. C.; Prody, G. A. and Labavitch, J. M. 2002. Gibberellic acid, synthetic auxins, and ethylene differentially modulate alpha-L-arabinofuranosidase activities in antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase tomato pericarp discs. *Plant Physiol.* 129: 1330-1340.
- Tafolla-Arellano, J. C.; González-León, A.; Tiznado-Hernández, M. E.; Zacarías García, L. and Báez-Saúdo, R. 2013. Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en plantas. *Rev. Fitotec. Mex.* 36(1):3-12.
- Tatsuki, M.; Haji, T. and Yamaguchi, M. 2006. The involvement of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase isogene, Pp-ACS1, in peach fruit softening. *J. Exp. Bot.* 57:1281-1289.
- Tieman, D. M.; Harriman, R. W.; Ramamohan, G. and Handa, A. K. 1992. An antisense pectin methylesterase gene alters pectin chemistry and soluble solids in tomato fruit. *Plant Cell.* 4: 667-669.
- Tieman, D. M. and Klee, H. J. 1999. Differential expression of two novel members of the tomato ethylene-receptor family. *Plant Physiol.* 120(1):165-172.
- Thomas, T. R.; Shackel, K. A. and Matthews, M. A. 2008. Mesocarp cell turgor in *Vitis vinifera* L. berries throughout development and its relation to firmness, growth, and the onset of ripening. *Planta.* 228(6):1067-1076.
- Van-der-Hoeven, R.; Ronning, C.; Giovannoni, J.; Martin, G. and Tanksley, S. 2002. Deductions about the number, organization, and evolution of genes in the tomato genome based on analysis of a large expressed sequence tag collection and selective genomic sequencing. *Plant Cell.* 14: 1441-1456.

- Vicente, A. R.; Saladié, M.; Rose, J.; Labavitch, K. C. and John, M. 2007. The linkage between cell wall metabolism and fruit softening: looking to the future. *J. Sci. Food Agric.* 87:1435-1448.
- Vrebalov, J.; Ruezinsky, D.; Padmanabhan, V.; White, R.; Medrano, D.; Drake, R.; Schuch, W. and Giovannoni, J. 2002. A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (*rin*) locus. *Science*. 296: 343-346.
- Wakabayashi, K.; Hoson, T. and Huber, D. J. 2003. Methyl de-esterification as a major factor regulating the extent of pectin depolymerization during fruit ripening: a comparison of the action of avocado (*Persea americana*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) polygalacturonases. *J. Plant Physiol.* 160(6):667-673.
- Wilkinson, J.; Lanahan, M.; Yen, H.-C.; Giovannoni, J. and Klee, H. 1995. An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by *Never-ripe*. *Science*. 270:1807-1809.
- Wong, D. 2008. Enzymatic deconstruction of backbone structures of the ramified regions in pectins. *Protein J.* 27:30-42.
- Yamamoto, M.; Miki, T.; Ishiki, Y.; Fujinami, K.; Yanagisawa, Y.; Nakagawa, H.; Ogura, N.; Hirabayashi, T. y Sato, T. 1995. The synthesis of ethylene in melon fruit during the early stage of ripening. *Plant Cell Physiol.* 36(4):591-596.
- Yen, H. C.; Lee, S.; Tanksley, S.; Lanahan, M.; Klee, H. and Giovannoni, J. 1995. The tomato never-ripe locus regulates ethylene-inducible gene expression and is linked to a homolog of the Arabidopsis *ETR1* gene. *Plant Physiol.* 107: 1343-1353.
- Zhong, S.; Fei, Z.; Chen, Y.R.; Zheng, Y.; Huang, M.; Vrebalov, J.; Mcquinn, R.; Gapper, N.; Liu, B.; Xiang, J.; Shao and Giovannoni, J. J. 2013. Single-base resolution methylomes of tomato fruit development reveal epigenome modifications associated with ripening. *Nature Biotechnol.* 31(2): 154-159.
- Zhou, D.; Kalaitzis, P.; Mattoo, A. K. and Tucker, M. L. 1996. The mRNA for an *ETR1* homologue in tomato is constitutively expressed in vegetative and reproductive tissues. *Plant Mol. Biol.* 30(6):1331-1338.