

# Expresión del gen de la ACC oxidasa en la maduración del fruto de Pitaya (*Stenocereus stellatus* (Pfeiff.) Riccob.) Cactaceae

Yunuen Rodríguez-Irepan<sup>1</sup>, Francisco Javier Suárez-García<sup>2</sup>, Edmundo Mercado-Silva<sup>3</sup>, Luis María Suarez-Rodríguez<sup>1</sup>, Mauro Manuel Martínez-Pacheco<sup>1</sup>, Rafael Salgado-Garciglia<sup>1</sup>, Rodolfo López-Gómez<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup> Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Edificio A1' Ciudad Universitaria. Morelia Mich. CP 58060 México.

<sup>2</sup> Centro de de Desarrollo de Productos Bioticos CEPROBI-IPN. Yauatepec Mor. México

<sup>3</sup> Universidad Autónoma de Querétaro. Instituto de Química. Querétaro Qro. México Hidalgo, Morelia, Mich. Ciudad Universitaria, Edif. A. C.P. 58030

## Resumen

Pitaya es el nombre genérico que se le ha dado al fruto producido por varias especies de cactáceas columnares. Estos frutos son altamente perecederos. El gas etileno juega un papel central en la maduración de frutos climatéricos y está fuertemente asociado con pérdidas postcosecha. Este trabajo tuvo como objetivo medir la producción de etileno y CO<sub>2</sub> en frutos de pitaya producidos por la especie *Stenocereus stellatus*, así como el aislamiento parcial del gen de la ACC oxidasa de esta especie y detectar su expresión durante la maduración del fruto. Nuestros resultados muestran que este fruto presenta un comportamiento no climatérico. Sin embargo, detectamos la expresión del gen de la ACC oxidasa durante la maduración del fruto.

**Palabras clave:** Etileno, cactáceas, climatérico, pitaya.

## Abstract

Pitaya is the generic name which has been given to the fruit produced by several species of columnar cacti. These fruits are highly perishable. Ethylene gas plays a central role in climacteric fruit ripening and is strongly associated with postharvest losses. This work had as objective to measure the ethylene and CO<sub>2</sub> production by pitaya fruits produced by the *Stenocereus stellatus* specie (Cactaceae), as well as partial isolation of ACC oxidase gene of this specie and detect its expression during fruit ripening. Our results show that this fruit has a non climacteric behavior; however ACC oxidase gene expression was detected during fruit ripening.

**Keywords:** Ethylene, cacti, climacteric, pitaya.

## Introducción

La maduración de los frutos representa un proceso único en las plantas. Los frutos son importantes para las plantas porque protegen las semillas durante su desarrollo y subsecuentemente favorecen su dispersión en el medio ambiente. Adicionalmente, los frutos también son muy importantes en la alimentación para los animales principalmente para el hombre. El proceso de maduración requiere de la coordinación de una serie de rutas bioquímicas que dan lugar a los cambios en color, textura, aroma y calidad nutricional. El etileno es un regulador de crecimiento vegetal gaseoso y muchas investigaciones han demostrado que este gas juega un papel regulador primordial en la maduración de los frutos carnosos llamados climatéricos (Barry *et al.*, 2007). Sin embargo, también han surgido evidencias de que hay procesos independientes del etileno durante la maduración (Giovannoni, 2004). En contraste con la abundancia de información referente a la regulación del proceso de maduración en frutos climatéricos, para frutos no climatéricos la información es escasa. Debido a sus características los frutos carnosos climatéricos o no climatéricos son susceptibles de deterioros postcosecha que

impiden su preservación y son causas de enormes pérdidas. Los frutos conocidos como pitayas son producidos por diferentes especies de cactáceas columnares pertenecientes al género *Stenocereus* (Piña-Lujan, 1977). Estos cactus son en su mayoría elementos del Bosque Tropical Caducifolio, el cual se desarrolla principalmente en las regiones semiáridas de nuestro país (Pimienta-Barrios *et al.*, 1994). Existen diferentes reportes acerca del comportamiento respiratorio no climatérico de frutos de cactáceas como son los frutos de diferentes especies de *Opuntia sp* (tunas), pitaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*), especies de *Hylocereus sp* (pitahayas) (Lakshminarayana *et al.*, 1973, Nerd *et al.*, 1999). Los frutos de pitaya son altamente perecederos y este factor es la causa principal que impide su comercialización. Aunque existen reportes de la expresión de genes de la ruta de síntesis de etileno en la maduración de frutos no climatéricos, como es el caso de la ACC oxidasa y de receptores de etileno, los resultados obtenidos no demuestran una relación clara entre el etileno y el proceso de maduración de estos frutos (Cazzonelli *et al.*, 1998; Trainotti *et al.*, 2005). En este trabajo reportamos el comportamiento respiratorio y la producción de etileno en frutos de pitaya producidos por la especie *Stenocereus stellatus*, así como el aislamiento parcial del gen que codifica para la ACC oxidasa. La expresión del gen de la ACC oxidasa fue detectada durante el proceso de maduración del fruto tanto en cáscara como en pulpa.

✉ **Autor de correspondencia:** Rodolfo López-Gómez. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Edificio A1' Ciudad Universitaria. Morelia Mich. CP 58060 México. email: lgomez@umich.mx

## Materiales y métodos

### Material Vegetal

Frutos de pitaya fueron colectados en un huerto de traspasio en la comunidad de Chiautla Puebla México. Los frutos fueron marcados y monitoreados durante su periodo de crecimiento. Al término del desarrollo los frutos se cosecharon y se identificaron tres estadios de maduración del fruto; fruto verde recién cortado (verde), fruto con inicio de coloración en la cáscara (maduro) y frutos totalmente coloridos (sobremaduro). El tejido de cáscara y pulpa del fruto fue obtenido de los diferentes estadios y congelado en nitrógeno líquido, el tejido fue conservado a -70 °C hasta su procesamiento.

Para la obtención de las plántulas, semillas de frutos fueron obtenidas limpiándolas del mucílago que las rodea con agua corriente y una coladera. Las semillas limpias se dejaron secar durante aproximadamente 24 hrs. Sobre papel periódico. Lotes de 50 semillas se germinaron en condiciones de luz natural sobre un papel filtro humedecido. Plántulas de 20 días de edad fueron congelada en nitrógeno líquido y conservadas a -70 °C hasta su uso.

### Extracción de ácidos nucleicos

El ADN fue extraído de 1gr de plántulas usando el método de Doyle *et al.* (1987). El ARN fue extraído a partir de 1gr de tejido de cáscara o pulpa del fruto con algunas modificaciones al método de López-Gómez *et al.* (1992).

### Producción de CO<sub>2</sub> y Etileno

Se colocaron frutos de manera individual en recipientes herméticos de aproximadamente 410 ml, la tapa contaba con dos orificios donde eran fijados trozos de manguera de látex para la toma de muestras de aire mediante una jeringa. Se colocaron los frutos en el interior del recipiente por una hora, en una cámara a 20 °C. Para estos análisis se emplearon 30 frutos, 10 por cada estado de madurez (verde, maduro y sobremaduro) y se repitió 4 veces el ensayo.

Para la determinación de etileno, se utilizó una muestra de aire de 5 ml, la cual se colocó en tubos sellados al vacío (vacuntainer). De los tubos se tomó una porción de 100 µl y se inyectó en el

Cromatografo de Gases (AutoSystem-GC Perkin-Elmer, con el programa Turbochrom 4 de PE-Nelson), con un "Loop" de 10 µl. Como patrón se tomaron 10 lecturas de gas etileno con una concentración de 500 ppm, se determinó el "tiempo de retención", se obtuvo el área bajo la curva promedio y se relacionó con la concentración de etileno para cada muestra (Ketsa y Daengkanit, 1999).

La tasa de producción de CO<sub>2</sub> (respiración) fue medida en un analizador de O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> NITEC a partir de muestras tomadas de los recipientes sellados e inyectadas directamente en el equipo. La producción de etileno y de CO<sub>2</sub> fue medida diariamente durante 5 días.

### Ensayo de PCR y análisis de Secuencia

Para el aislamiento del fragmento de ACC Oxidasa se utilizaron los siguientes cebadores degenerados diseñados a partir de zonas consenso de genes de ACC oxidasas reportadas para otras especies en el sitio del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)): primer sentido ACCOFW 5'

GC(A/T/G/C) TG(C/T) GA(A/G) AA(T/C) TGG GG(G/A/C/T) TT 3' y primer reverso ACCORW 5' AA(A/G) TT(C/T) CA(G/A) GC(A/C/G/T) AA(A/G) GA(A/G) 3'. 100 ng de ADN fueron utilizados en la reacción de PCR bajo las siguientes condiciones: 95 °C 10 min inicial, 30 ciclos de 95 °C 1 min, 48 °C 1 min, 72 °C 1 min. El fragmento obtenido fue clonado en el vector PCRII (InvitroGen, Carlsbad CA). La secuenciación fue llevada a cabo utilizando el kit Cicle Sequencing Big Dye AB Terminator v3.1 (Applied Biosystems) siguiendo el protocolo del fabricante.

### Ensayo tipo Northern

Para el northern blot 10 µg de ARN total se corrieron en un gel desnaturalizante y fueron transferidos a una membrana de Nylon Hybond N<sup>+</sup>. Los ácidos nucleicos fueron fijados por UV en crosslinker (Sambrook *et al.*, 2001). La membrana fue hibridada en un buffer de fosfatos a 65 °C con la sonda SsACCO1 marcada radioactivamente con <sup>32</sup>P utilizando el Kit random priming (Gibco BRL, USA)

```

1 GAGAATTGGGGTTTTTTTGGAGCTGGTGAACCATAGCAITTCCTGTTGAAATGTTGGAC
  E N W G F F E L V N H S I P V E M L D
58 ACTGTGGAGAGGATGACAAAGGAGCACTACAGCAAGTGCATGGAGCAGAAGTTCAA
  T V E R M T K E H Y S K C M E Q K F K
114 GGAGATGGTGGCAAGCAAAGGCTTAGAGGGTGC GGAGTCTGAGATGAACGACGTC
  E M V A A S K G L E G A E S E M N D V
168 ATTGGGAAAGCACTTCTCCCTCCGCCACCGCCCTGCTCCAACATCTCCGAGA
  D W E S T F F L R H R P V S N I S E I
223 TCCCTGACCTTGACGATGAATACAGGAAGGTGATGAAGGAATTTGCAGGAGAAAT
  P D L D D E Y R K V M K E F A G E I
279 AGAGAAGCTAGCAGAGCAACTTCTGGACTTGCTGTGTGAGAACCTTGGTCTGGAA
  E K L A E Q L L D L L C E N L G L E
333 AAAGGGTATCTTAAGAAGGTCTTCCATGGGACCCATGGACCCACCTTCGGTACAA
  K G Y L K K V F H G T H G P T F G T K
388 AGGTCAGCAATTACCCACCCTGCCCTAAACCAGACCTCATCAAGGGCCTCCGGGC
  V S N Y P P C P K P D L I K G L R A
443 CCACACCGACCGCGTGGCATTATCCTCCTTTTCCAAGATGACAAGGTCAGCGGA
  H T D A G G I I L L F Q D D K V S G
498 CTCAGCTCCTCAAAGATGGCAATGGGTTGATGTCCCACCAATGAAACTCCA
  L Q L L K D G Q W V D V P P M K H S I
554 TTGTCACTTGGGTGACCAACTTGAGGTCATACTAATGGGAAGTACAAGAG
  V I N L G D Q L E V I T N G K Y K S
609 CGTCGTGACCGCGTGATTGCACAGACAGATGGCAACAGGATGTCAATAGCATCA
  V V H R V I A Q T D G N R M S I A S
664 TTCTACAACCAGGGAGCGACGCTGTGATCTATCCGGCGCCTGCATTGGTCCGAGA
  F Y N P G S D A V I Y P A P A L V E K
719 AAGACAAGGAGAATGCCCGGCTTACCCCAAGTTTGTGTCGAGGACTACATGAA
  D K E K C P A Y P K F V F E D Y M K
774 GCTCTATGTTGGGCTGAAATCCAGGAAAAGGAGCCAAGGTTTGAAGCCATGAA
  L Y V G L K F Q E K E P R F E A M K
829 GCA
      A

```

Figura 1. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos deducidos del fragmento genómico de ACC oxidasa de pitaya *Stenocereus stellatus*

con una especificidad de  $10^8$ - $10^9$  cpm/ $\mu$ g. El blot fue lavado a 65 °C dos veces (15 min) en condiciones de alta astringencia (1mM Na<sub>2</sub> EDTA, 40mM NaHPO<sub>4</sub>, 1% SDS) (Ausubel et al., 1991)

## Resultados

### Clonación del fragmento del gen de la ACC oxidasa y su organización en el genoma de pitaya

La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando los cebadores de ACC oxidasa y 100 ng de ADN total extraído de plántulas de pitaya. El fragmento obtenido fue de 1400 pb y fue clonado en el vector pCR 2.1 “TOPO” (Invitrogen) y secuenciado (SsACCO1). La secuencia fue comparada en el sitio del NCBI (Blast) mostrando una alta identidad con genes de ACC oxidasas de otras plantas reportados previamente. El fragmento genómico obtenido incluye las regiones no codificantes (intrones) del gen

(datos no mostrados). Este fragmento contiene tres intrones siendo característico este número para otras secuencias genómicas de ACCOxidasa reportadas de otras especies de plantas. La secuencia codificante del gen se muestra en **figura 1**, ésta fue comparada con secuencias de genes de ACC Oxidasas de otras especies encontrándose valores de identidad de 83-85% con las proteínas más similares. El fragmento presenta también los tres dominios conservados presentes en las ACC oxidasas (fig 2); la caja 1 y 2 representan el sitio potencial de zipper de leucina y la caja 3 el dominio de unión a hierro de la proteína. En este fragmento también están presentes los aminoácidos conservados para la actividad enzimática H, D, H característico de la superfamilia de la familia de las proteínas que requieren el ion hierro y ascorbato (fig 2) Chen et al. (2003)

### Producción de CO<sub>2</sub> y Etileno en frutos de pitaya

La producción de CO<sub>2</sub> durante el periodo postcosecha del fruto

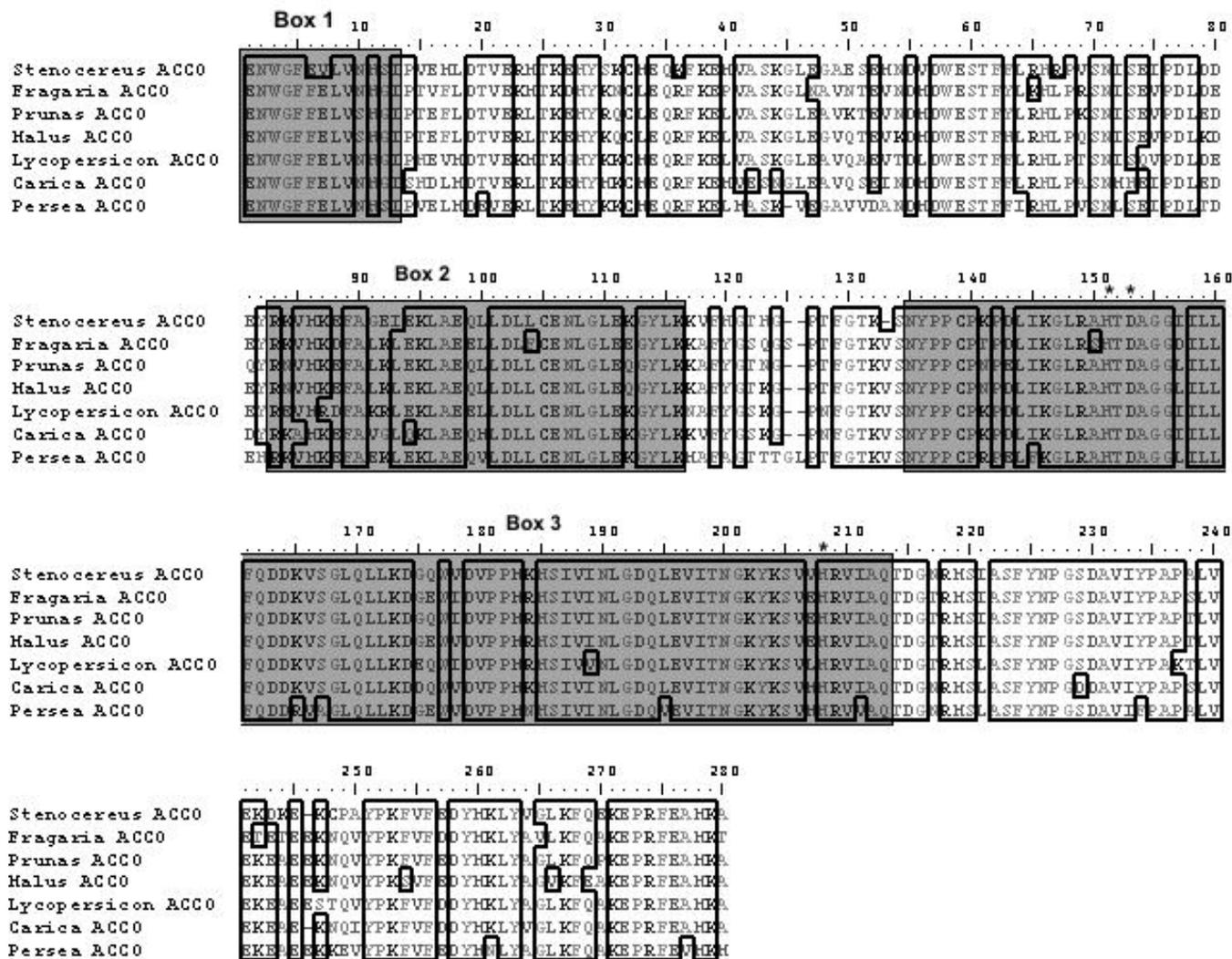
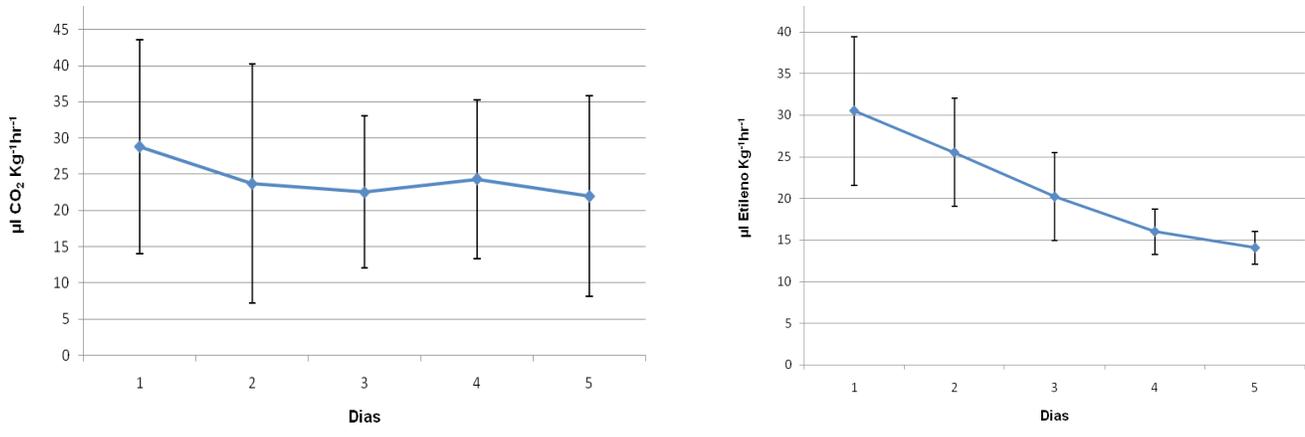


Figura 2. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del fragmento de ACC oxidasa de pitaya con las secuencias de algunos genes de ACC oxidasa de otros frutos. Fragmento de pitaya *Stenocereus stellatus* (FJ810860), fresa *Fragaria ananass* (AY706156.1), pera *Prunus persica* (AF129073.1), manzana *Malus x domestica* (AB086888.1), jitomate *Solanum lycopersicon* (P05116), papaya *Carica papaya* (AF379855.1), aguacate *Persea americana* (P19464). Los tres dominios conservados están sombreados (Cajas 1, 2, 3). Las cajas 1 y 2 son regiones presuntas de un zipper de leucina y la caja 3 es el dominio conservado de unión a hierro.



**Figura 3. Producción de CO<sub>2</sub> y Etileno por frutos de pitaya (*Stenocereus stellatus*).** Los frutos de pitaya fueron colectados en la región de Chiautla Puebla. Los frutos fueron incubados en recipientes herméticos por 1 hr. El CO<sub>2</sub> (Panel A) y el etileno (Panel B) fueron cuantificados por 5 días.

de pitaya se encuentra representada en la **figura 3A**, como puede observarse mediante este método de detección de CO<sub>2</sub>, la producción de este gas permaneció casi constante durante los 5 días de detección. En base a este resultado los frutos de pitaya tienen un comportamiento no climatérico. Para el caso del etileno el comportamiento fue similar (**figura 3B**), es decir no se detectó un aumento en los niveles de producción de etileno durante el periodo postcosecha de los frutos. En base a este parámetro y al de CO<sub>2</sub> estos frutos serían clasificados dentro del grupo no climatéricos.

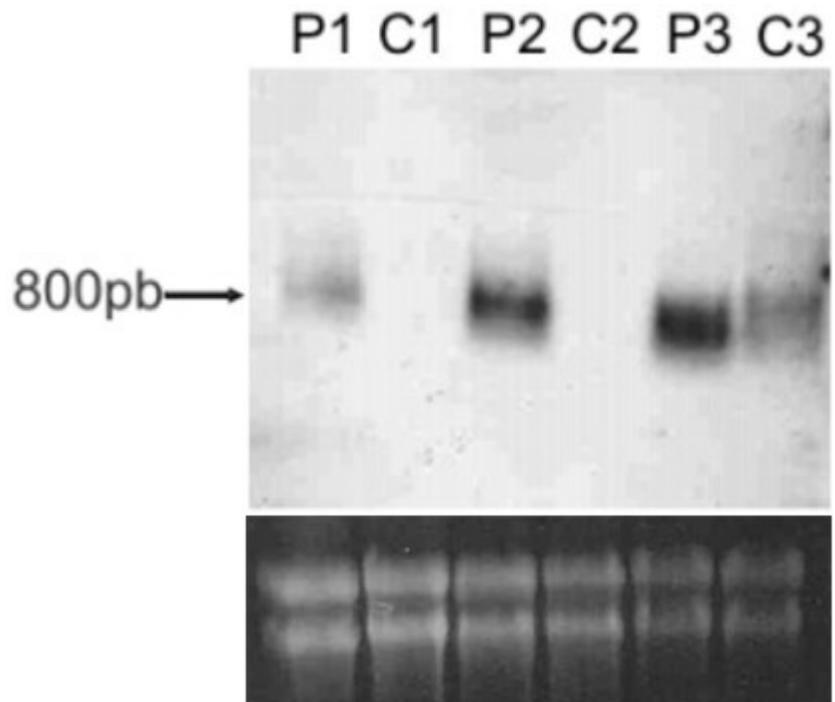
#### **Expresión del gen *SsACCO1* durante la maduración del fruto de pitaya**

El ARN total del fruto de pitaya fue extraído para realizar un ensayo tipo northern, tanto de pulpa como de cáscara en los tres estadios de maduración (verde, maduro y sobremaduro). Como puede observarse en la **figura 4**, existe una señal para el mensajero de este gen en la pulpa del estadio 1 la cual se va acentuando conforme avanza la maduración, la señal en el tejido de la cáscara se hace evidente hasta el estadio de completa maduración, este resultado sugiere que posiblemente el proceso de expresión de este gen se inicia en la pulpa en estados tempranos de la maduración del fruto y conforme avanza el proceso de maduración se hace más abundante el mensajero para este gen en la pulpa. La señal en la cáscara del fruto es evidente hasta un estadio tardío en el proceso de maduración.

### **Discusión**

En este artículo reportamos el aislamiento y clonación de un fragmento genómico del gen que codifica para la ACC oxidasa de pitaya. Este fragmento muestra una estructura similar a otros genes de ACC oxidasas de otras plantas reportadas con anterioridad en el banco de datos de

NCBI. El fragmento contiene los tres intrones característicos de estos genes de la familia de las ACC oxidasas. La parte codificante contiene los aminoácidos conservados de unión al ion hierro y al ascorbato de esta superfamilia de proteínas, así mismo presenta los tres dominios conservados de las ACC



**Figure 4. Ensayo tipo northern blot de la maduración del fruto de pitaya.** El ARN total fue extraído (10 mg), desnaturalizado con formaldehído y transferido a una membrana de nylon (Hybond-N membrane (Amersham)), de los tres estadios de maduración del fruto de pitaya tanto de cáscara como de pulpa. La membrana fue hibridada utilizando como sonda el fragmento de la ACC oxidasa de pitaya *Ss-ACO* marcada con <sup>32</sup>P, con la finalidad de detectar el transcrito en los diferentes estadios y tejidos. P1 y C1, ARN de pulpa y cáscara respectivamente del estadio verde. P2 y C2, ARN de pulpa y cáscara respectivamente del estadio maduro. P3 y C3, ARN de pulpa y cáscara respectivamente del estadio sobremaduro. En la parte superior de la figura se observa el blot y en la parte inferior la calidad del ARN total teñido con bromuro de etidio.

oxidadas. Estudios de la producción de etileno y la expresión de este gen durante el proceso de maduración también fueron llevados a cabo. Los frutos de cactáceas en general han sido reportados como no climatéricos, y como puede verse en las **figura 3** el caso de este fruto de pitaya también caería dentro de la clasificación de frutos no climatéricos, ya que no hay un aumento neto de la producción de CO<sub>2</sub> y etileno durante el proceso de maduración. Sin embargo encontramos expresión del gen de ACC oxidasa tanto en pulpa como en cáscara. La expresión se detectó primeramente en la pulpa en el estadio verde, aumentado la intensidad de la señal hasta el estadio sobremaduro del fruto. En el caso de la cáscara la señal no apareció sino hasta el estadio sobremaduro. La expresión de este gen sugiere que el mensajero aumenta en la pulpa conforme avanza el proceso de maduración y se presenta primero en la pulpa que en la cáscara, lo que sugeriría un proceso que va de la parte interior del fruto hacia fuera y que muy posiblemente el etileno esté jugando un papel directo en la maduración del fruto. Sin embargo la expresión de este gen no se correlaciona con la producción de etileno. Existen reportes de la expresión de genes de ACC oxidasa en frutos no climatéricos durante el proceso de maduración como es el caso de tuna (Collazo-Siquéz *et al.*, 2003), piña (Cazonelli *et al.*, 1998) y fresa (Trainotti *et al.*, 2005), de una manera indirecta la síntesis de etileno en cítricos (Stewart *et al.*, 1972) y durante el desarrollo del fruto en uva (Chervin *et al.*, 2004) y calabaza (Shiomi *et al.*, 1999). Comparando nuestros resultados con los reportados para tuna, encontramos que en pitaya hay una expresión diferencial en tiempo y por tejido, ya que en tuna la expresión se encuentra aparentemente al mismo nivel en los estadios de maduración tanto en pulpa como en cáscara (Collazo-Siquéz *et al.*, 2003). En el caso de piña sólo se detecta en la pulpa en estadio maduro (Cazonelli *et al.*, 1998). Más estudios son necesarios para aclarar el papel de este gen en el proceso de maduración de pitaya. Recientemente Iannetta *et al.* (2006) han publicado que en fresa hay una producción de CO<sub>2</sub> y etileno similar a la de frutos climatéricos, la detección de estos gases la llevaron a cabo usando espectroscopia de láser fotoacústica, lo cual sugiere que la sensibilidad del método utilizado para detectar CO<sub>2</sub> y etileno es muy importante para detectar el proceso climatérico.

Por otro lado Hadfield *et al.* (2000) reportan que existen eventos que son independientes de etileno o extremadamente sensibles a niveles muy bajos de etileno. El papel del etileno o de la ACC oxidasa en frutos no climatéricos aun es desconocido, estudios silenciando genes en la síntesis de etileno son necesarios para poder determinar si tiene realmente una participación en el proceso de maduración de pitaya o es una respuesta a un proceso de senescencia (Barry *et al.*, 2007).

## Referencias

- Ausubel F M, Brent R, Kingston RE, More DD, Seidman JG, Smith JA, Sthul K (1991) *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing Associates Inc. and Willey and Sons Inc. USA.
- Barry CS, Giovannoni JJ (2007) Ethylene and fruit ripening. *J. Plant Growth Regul.* 26:143-159
- Cazzonelli CL, Cavallaro AS, Botella JR (1998) Cloning and characterisation of ripening-induced ethylene biosynthetic genes from non-climacteric pineapple (*Ananas comosus*) fruits. *Aust. J. Plant Physiol.* 25:513-518
- Chen YT, Lee YR, Yang CY, Wang YT, Yang SF, Shaw JF (2003) A novel papaya ACC oxidase gene (CP-ACO2) associated with late stage fruit ripening and leaf senescence. *Plant Science* 164:531-540
- Chervin C, El-Kereamy A, Roustan JP, Latché A, Lamou J, Bouzayen M (2004) Ethylene seems required for the berry development and ripening in grape, a non-climacteric fruit. *Plant Science*. 167:1301-1305
- Collazo-Siquéz P, Valverde ME, Paredes-López O, Guevara-Lara F (2003) Expression of ripening related genes in prickly pear (*Opuntia* sp) fruits. *Plant Foods for Human Nutrition* 58:317-326
- Doyle JJ, Doyle JD (1987) A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19:11-15
- Giovannoni JJ (2004) Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell* 16:S170-S180
- Hadfield KA, Dang T, Guis M, Pech JC, Bouzayen M, Bennett AB (2000) Characterization of ripening regulated cDNAs and their expression in ethylene suppressed Charentais melon fruit. *Plant Physiol.* 122:977-983
- Iannetta PPM, Laarhoven LC, Medina-Escobar N, James EK, McManus MT, Davis HV, Harren FJM (2006) Ethylene and carbon dioxide production by developing strawberries show a correlative pattern that is indicative of ripening climacteric fruit. *Physiologia Plantarum* 127:247-259
- Ketsa S, Daengkanit T (1999) Firmness and activities of polygalacturonase, pectinesterase,  $\beta$ -galactosidase and cellulase in ripening durian harvested at different stages of maturity. *Scientia Horticulturae* 80:181-188
- Lakshminarayana S, Alvarado y Sosa L, Barrientos Pérez F (1979) The development and postharvest physiology of the fruit of prickly pear (*Opuntia amyclae* Tenore). In GE Inglett, G Charalambous (eds), *Tropical Foods Vol 1 Chemistry and Nutrition*. Academic Press, USA. pp 69-93
- López-Gómez R, Gómez-Lim MA (1992) A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. *Hort. Science* 27 (5):440-442
- Nerd A, Gutman F, Mizrahi Y (1999) Ripening and postharvest behaviour of fruits of two *Hylocereus* species (Cactaceae). *Postharvest Biology and Technology* 17:39-45
- Pimienta-Barríos E, Nobel PS (1994) Pitaya (*Stenocereus* spp., Cactaceae): An ancient and modern fruit crop of México. *Economic Botany* 48 (1):76-83
- Piña-Luján I (1977) Pitayas y otras cactáceas afines del estado de Oaxaca. *Cact. Suc. Mex XXII*:3-14.
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning a laboratory manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory press USA.
- Shiomi S, Nakamoto J-i, Yamamoto M, Kubo Y, Nakamura R, Inaba A (1999) Expression of ACC synthase and ACC oxidase genes in different tissues of immature and mature cucumber fruits. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 68 (4):830-832
- Stewart I, Wheaton TA (1972) Carotenoids in citrus—their accumulation induced by ethylene. *J. Agric. Food Chem.* 20:448-449
- Trainotti L, Pavanello A, Casadoro G (2005) Different ethylene receptors show an increased expression during the ripening of strawberries: does such an increment imply a role for ethylene in the ripening of these non-climacteric fruits? *J. Exp. Botany* 56 (418):2037-2046