



Ciencia y Tecnología

Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ANÁLISIS PROTEÓMICO DEL ENDOSPERMO
SÓLIDO Y LÍQUIDO DE SEMILLAS DE DOS
CULTIVARES DE COCOTERO EN DIFERENTES
ESTADIOS DE MADURACIÓN**

Tesis que presenta

JEAN WILDORT FÉLIX

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: **Bioquímica y Biología Molecular**)

Mérida, Yucatán, México
2025

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Jean Wildort Félix titulado **Análisis proteómico del endospermo sólido y líquido de semillas de dos cultivares de cocotero en diferentes estadios de maduración**, fue realizado en la Unidad de Biología integrativa, en la línea de investigación Interacción planta-ambiente, en el laboratorio 06 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Ignacio Rodrigo Islas Flores y la codirección del Dr. Carlos Mariano Oropeza Salín, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente

Dr. José Luis Hernández Stefanoni
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 14 de abril de 2025

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Firma: _____

Nombre: Jean Wildort Félix

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto **CB-2027-2018-A1-S-10398**, titulado “**Análisis de semillas de cocotero (*Cocos nucifera* L.) con diferente grado de madurez para determinar el efecto del proteoma y el metaboloma en la calidad del endospermo líquido y sólido**”, cuyo responsable técnico es el Dr. Ignacio Rodrigo Islas-Flores

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) por haberme aceptado y abierto las puertas de su seno científico para poder estudiar.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por la beca otorgada durante 4 años

A los Doctores Ignacio Rodrigo Islas Flores y Carlos Oropeza-Salín, mi más sincero agradecimiento por su invaluable guía desde el inicio de este proceso. Ustedes han sido una pieza fundamental en este complicado camino, y sin duda, no habría sido lo mismo sin su apoyo. Agradezco profundamente que me hayan brindado la oportunidad de recurrir a su vasto conocimiento científico y, sobre todo, por su infinita paciencia. Sin su orientación, este logro no habría sido posible.

A cada uno de los miembros del comité revisor: Dra. Blondy Canto-Canché, Dr. Eliel Ruíz-May, Dr. Manuel Martínez Estévez, Dr. Víctor Aguilar Hernández y Dra. Georgina Estrada Tapia, mis agradecimientos por sus valiosos y acertados comentarios y correcciones. Su apoyo y contribuciones han sido fundamentales para enriquecer y mejorar este trabajo. Gracias por su dedicación y por su compromiso en la revisión y perfeccionamiento de esta tesis.

Al M.C. Miguel Tzec-Simá, por su apoyo técnico y su orientación

A mis compañeros del LAB 06, M.C. Dilery Juárez Monroy, Dra. María Inés Granados Alegía, M.C. Rufino Gómez-Tah, Mónica Aparicio-Ortiz, Damian Mayo, Sarai Vivas-López, gracias por el apoyo a lo largo de este proceso.

A Jaccine Jeador, por ser una pieza fundamental durante todo este proceso. Tu apoyo, dedicación y compromiso han sido esenciales para mí. Gracias por estar siempre allí, por tu orientación y por tu invaluable contribución en cada etapa de este camino. Además, agradezco profundamente los momentos de risa que compartimos, los cuales hicieron que este viaje fuera mucho más llevadero y ameno. Tu compañía ha sido una gran bendición.

A la familia Valdez y Cetina por la confianza y la hospitalidad

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a todas las personas que me han acompañado y apoyado a lo largo de este proceso de lejos y de cerca, sin los cuales la culminación de esta tesis no habría sido posible.

A todos ustedes, mi más sincero agradecimiento.

FOR. N.N OMN. A.QVE

DEDICATORIA

Al Gran Arquitecto Del Universo, por guiarme con su sabiduría y por darme la fortaleza necesaria en los momentos de dificultad. Gracias por iluminar mi camino y permitirme aprender, crecer y encontrar la felicidad a lo largo de mi carrera.

A mis padres, Sr. y la Sra. Emmanuel Félix, quienes ya no están físicamente conmigo, pero cuyo legado sigue vivo en cada paso que doy. Gracias por su amor, por los valores que me inculcaron y por brindarme la oportunidad de recibir una educación de calidad. Su ejemplo de vida ha sido mi mayor fuente de inspiración.

A mis queridas hermanas FÉLIX: Juliette, Ginelle, Emmania, Dieulène, Rose-Carmène, Modeline, Adeline y Jenny-Flore, quiero expresar mi más profundo agradecimiento por ser una parte esencial de mi vida. Ustedes son el alma de nuestra familia y siempre han estado a mi lado en los momentos más difíciles. Ustedes son las principales impulsoras de mis sueños, y aunque el camino no siempre ha sido fácil, gracias a ustedes ha sido mucho más llevadero. Mi gratitud y cariño hacia cada una de ustedes no tiene fin.

A Félix Benjy, Jules Sankara, Dr. Dumorné Ronel, Lizier Wensly, Désir Jean Derly, por su amor incondicional y por confiar en mí en todo momento. Gracias por creer en mis capacidades y expectativas, su apoyo ha sido una fuente de motivación constante a lo largo de este proceso.

A mis sobrinos, les agradezco por ser una fuente constante de alegría e inspiración. Su energía y entusiasmo me han recordado la importancia de seguir adelante con pasión y esperanza. Gracias por hacer que este camino fuera aún más significativo.

A Dr. Jacques Fils Pierre, gracias por tus valiosos aportes a lo largo de este proceso. Gracias por acompañarme en cada etapa, por tu orientación y por compartir tu conocimiento, lo cual ha sido fundamental para mi desarrollo. Tu apoyo ha sido clave para llegar hasta aquí.

Finalmente, quiero dedicar esta tesis a la FAMILIA FÉLIX y Ramón Valdez Israel George, por su amor, apoyo y confianza constantes, los cuales han sido esenciales en mi vida.

VIC. I.T.VIR.

LISTA DE LOS PRODUCTOS GENERADOS

2024 Jean Wildort Félix, Blondy Canto-Canché, Miguel Tzec-Simá, Eliel Ruiz May, Carlos Oropeza-Salín e Ignacio Islas-Flores. *Quantitative proteomic analysis of two coconut varieties during maturation using the TMT approach*. **II Congreso Internacional de Agrosistemas. 24-26 de abril de 2024, Conkal, Yucatán.**

2023 Félix, J.W.; Granados-Alegría, M.I.; Gómez-Tah, R.; Tzec-Simá, M.; Ruíz-May, E.; Canto-Canché, B.; Zamora-Briseño, J.A.; Bojórquez-Velázquez, E.; Oropeza-Salín, C.; Islas-Flores, I. *Proteome Landscape during Ripening of Solid Endosperm from Two Different Coconut Cultivars Reveals Contrasting Carbohydrate and Fatty Acid Metabolic Pathway Modulation*. **International Journal of Molecular Sciences**. 24:10431. <https://doi.org/10.3390/ijms241310431>

2022 Jean Wildort Félix, Blondy Canto-Canché, Miguel Tzec-Simá, Eliel Ruiz May, Carlos Oropeza-Salín e Ignacio Islas-Flores. *Proteomic approach in coconut fruit ripening: an insight in amino acid metabolism*. **XXXIII Congreso Nacional de Bioquímica. 16-21 de octubre del 2022, Mérida, Yucatán**

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO I	5
1. ANTECEDENTES	5
1.1. ORIGEN, MORFOLOGÍA Y FENOLOGÍA DEL COCOTERO	5
1.2. ORIGEN Y DESARROLLO DE LOS ENDOSPERMOS LÍQUIDO Y SÓLIDO	6
1.3. IMPORTANCIA DEL FRUTO DE COCOTERO	6
1.4. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DEL ENDOSPERMO SÓLIDO Y LÍQUIDO	7
1.5. MADURACIÓN Y FITOHORMONAS	8
1.5.1. MADURACIÓN DE LOS FRUTOS CLIMATÉRICOS Y NO CLIMATÉRICOS	8
1.5.2. FITOHORMONAS	9
1.6. METABOLISMO EN LAS PLANTAS	10
1.6.1. METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS EN FRUTOS Y SEMILLAS	10
1.6.2. METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS EN FRUTOS OLEAGINOSOS	12
1.6.3. CICLO DEL GLIOXILATO	13
1.7. PROTEÓMICA	14
1.7.1. PROTEÓMICA BASADA EN GEL	15
1.7.2. PROTEÓMICA BASADA EN ETIQUETAS ISOBÁRICAS	16
1.8. LAS ÓMICAS Y SU APLICACIÓN EN COCO	17
1.9. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	21
1.10 JUSTIFICACION	21
1.11 OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS	22
1.11.1 OBJETIVO GENERAL	22
1.11.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
1.12 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	23
CAPÍTULO II	24
2 ANÁLISIS PROTEÓMICO DEL ENDOSPERMO LÍQUIDO DE FRUTOS DE COCOTERO	24
2.1. INTRODUCCIÓN	24
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	25
2.2.1. RECOLECCIÓN DE MATERIAL VEGETAL	25
2.2.2. EXTRACCIÓN DEL PROTEOMA DEL ENDOSPERMO LÍQUIDO DE DOS CULTIVARES DE COCOTERO	26

2.2.3.	CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR SDS-PAGE.....	26
2.2.4.	PROTEÓMICA	26
2.3.	RESULTADOS	27
2.3.1.	COMPARACIÓN DE FRUTOS DE COCOTERO DE EVY Y APM.....	27
2.3.2.	ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS DEL ENDOSPERMO LÍQUIDO DE LOS CULTIVARES EVY Y APM.	28
2.3.3.	ANÁLISIS PROTEÓMICO E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS UTILIZANDO ETIQUETAS DE MASA EN TÁNDEM (TMT) 29	29
2.3.4.	ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (ACP).....	30
2.3.5.	RUTAS KEGG.....	31
2.3.6.	PROTEÍNAS ACUMULADAS DIFERENCIALMENTE	32
2.3.7.	PROTEÍNAS DEL METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS ACUMULADAS DIFERENCIALMENTE (PAD) EN EL ENDOSPERMO LÍQUIDO DE LOS CULTIVARES EVY Y APM	33
2.3.7.1.	GLUCÓLISIS	33
2.3.7.2.	CICLO DE CALVIN-BENSON	34
2.3.7.3.	RUTAS DE LAS PENTOSAS FOSFATO	35
2.3.7.4.	CICLO DE LOS ÁCIDOS TRICARBOXÍLICOS (CAT)	36
2.4.	DISCUSIÓN.....	37
CAPÍTULO III		40
3	EL PANORAMA PROTEÓMICO DURANTE LA MADURACIÓN DEL ENDOSPERMO SÓLIDO DE DOS CULTIVARES DIFERENTES DE COCO REVELA UNA MODULACIÓN CONTRASTANTE DE LAS VÍAS METABÓLICAS DE CARBOHIDRATOS Y ÁCIDOS GRASOS	40
3.1.	RESUMEN	40
PALABRAS CLAVE: PROTEÓMICA; VARIEDADES DE COCO; ENDOSPERMO SÓLIDO; ETAPAS DE MADURACIÓN; METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS Y LÍPIDOS; TMT-SPS-MS3.		41
3.2.	INTRODUCCIÓN	41
3.3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
3.3.1.	RECOLECCIÓN DE MATERIAL VEGETAL	44
3.3.2.	EXTRACCIÓN DEL PROTEOMA DEL ENDOSPERMO SÓLIDO DE COCO	44
3.3.3.	CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR SDS-PAGE.....	45
3.3.4.	PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA PROTEÓMICA	45
3.3.5.	MARCAJE DE TMT Y FRACCIONAMIENTO DE PÉPTIDOS.....	45
3.3.6.	NANO-LC-MS/MS, SELECCIÓN DE PRECURSORES SÍNCRONOS SPS-MS ³	46
3.3.7.	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS	47
3.4.	RESULTADOS	48

3.4.1.	PARÁMETROS FISIOLÓGICOS Y FISCOQUÍMICOS DEL FRUTO DEL COCO.....	48
3.4.2.	PANORAMA DEL PROTEOMA DEL ENDOSPERMO SÓLIDO DE COCO DURANTE LA MADURACIÓN	49
3.4.3.	DINÁMICA DEL PROTEOMA DEL ENDOSPERMO SÓLIDO DE COCO DURANTE LA MADURACIÓN	51
3.4.4.	DESINTOXICACIÓN DE LAS VÍAS DE ROS Y METILGLIOXAL EN CULTIVARES APM Y EVY	53
3.4.5.	PADS INVOLUCRADAS EN EL METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS EN LOS CULTIVARES EVY Y APM.....	53
3.4.5.1.	GLUCÓLISIS Y GLUCONEOGÉNESIS.....	53
3.4.5.2.	EL CICLO DE LOS ÁCIDOS TRICARBOXÍLICOS (CAT).....	55
3.4.6.	PADS INVOLUCRADAS EN EL METABOLISMO DE LOS LÍPIDOS EN LOS CULTIVARES APM Y EVY	56
3.4.7.	OTRAS PROTEÍNAS.....	58
3.5.	<u>DISCUSIÓN.....</u>	<u>59</u>
3.6.	<u>CONCLUSIÓN</u>	<u>63</u>
	<u>CAPÍTULO IV.....</u>	<u>65</u>
4.	DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES	65
4.1.	DISCUSIÓN GENERAL	65
4.2.	CONCLUSIONES GENERALES.....	68
	<u>REFERENCIAS.....</u>	<u>70</u>
	<u>ANEXOS.....</u>	<u>86</u>

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Diferentes cultivares de cocotero.** A) Alto del Pacífico mexicano; B) Enano verde de Yucatán; C) Diferentes partes de la semilla de cocotero. (Foto del autor) 5
- Figura 2. Diferentes usos de la palma de coco** (Foto del autor)..... 7
- Figura 3. Vía metabólica de los carbohidratos.** (glucólisis, gluconeogénesis, fotosíntesis, ciclo de los ácidos tricarbóxicos, rutas de las pentosas fosfato). Foto del autor 12
- Figura 4. Metabolismo de los ácidos grasos en especies oleaginosas.** Flechas en amarillo, indican el anabolismo y en rojo el catabolismo. El ciclo de los ácidos tricarbóxicos (CATs) ocurre en la matriz mitocondrial y el ciclo del glioxilato en los glioxisomas. Foto del autor 14
- Figura 5. Esquematación del flujo de trabajo de la proteómica.** Proteómica basada en gel utilizando una matriz de poliacrilamida (en rojo). En la proteómica libre de gel o de alta escala es de tipo masivo (en verde). En la cuantificación sin etiquetas, se digieren múltiples muestras de proteínas con tripsina o con otras proteasas. Los péptidos resultantes se separan mediante cromatografía líquida (LC) y se ionizan antes de ingresar al espectrómetro de masas (MS). En la estrategia SILAC (Marcaje de isótopos estables mediante aminoácidos en cultivos celulares), las muestras de células se cultivan in vitro en medios adicionados con isótopos naturales (ligeros). En iTRAQ y TMT se utiliza marcaje isobárico. 15
- Figura 6. Flujo de trabajo de la proteómica basada en el marcaje con etiquetas y espectrometría de masas.** Las proteínas se extraen de diversas muestras biológicas. Las proteínas se digieren enzimáticamente en péptidos. Los péptidos se reducen, se alquilan y luego se conjugan a las etiquetas isobáricas. Los péptidos conjugados se someten a cromatografía líquida de fase reversa, se ionizan mediante electropulverización y se rocían en el espectrómetro de masas. El espectro MS1 registra el número de iones para varios valores de m/z del péptido intacto que eluye en un momento dado. La cuantificación se realiza midiendo las intensidades de los iones indicadores de fragmentos liberados de las etiquetas en el modo MS en tándem (MS2) durante la fragmentación del péptido. 17
- Figura 7. Estrategia experimental aplicada en este estudio.** 23
- Figura 8. Flujo de trabajo experimental** para la realización del análisis proteómico basado en TMT-SPS-MS3 en las proteínas del agua de coco de los cultivares EVY y APM. 27
- Figura 9. Comparación de frutos de cocotero de dos cultivares durante la maduración.** A) Peso del fruto de coco en gramos (g) B) Volumen de agua del fruto de coco en mililitros (mL) C) Grados Brix del agua del fruto del coco en porcentaje (%). 28

Figura 10. Perfil electroforético en geles de 12% SDS-PAGE de polipéptidos del endospermo líquido de los cultivares EVY y APM. A la izquierda los diferentes pesos moleculares, a la derecha pesos moleculares de polipéptidos encontrados en el endospermo líquido.	29
Figura 11. Representación proporcional en diagrama de Venn de las proteínas identificadas en cada etapa de maduración y en cada cultivar. En el cultivar APM, las réplicas biológicas de los diferentes estadios se marcaron de la siguiente manera: Inmaduro (Inm APM), Intermedio (Int APM), Maduro (Mad APM). El cultivar EVY fue el siguiente: Inmaduro (Inm EVY), Intermedio (Int EVY), Maduro (Mad EVY).	30
Figura 12. Análisis de componentes principales (ACP) de las tres etapas de maduración, inmaduro, intermedio y maduro, de los endospermos líquidos de dos cultivares de frutos de cocotero EVY y APM. Para cada etapa de maduración se realizaron tres réplicas. En el cultivar APM, las réplicas biológicas de los diferentes estadios se marcaron de la siguiente manera: Inmaduro (Inm APM), Intermedio (Int APM), Maduro (Mad APM). El cultivar EVY fue el siguiente: Inmaduro (Inm EVY), Intermedio (Int EVY), Maduro (Mad EVY).	31
Figura 13. Rutas metabólicas deducidas a partir del KEGG en frutos de cocotero de los cultivares APM (Azul) y EVY (Rojo).	32
Figura 14. Cambios generales en la regulación de las proteínas de los frutos de cocotero de dos cultivares en tres estadios de maduración. Los diferentes estadios se describieron de la siguiente manera: inmaduro (Int/Inm); intermedio (Mad/Int) y maduro (Mad/Inm). Las proteínas que estuvieron acumuladas hacia arriba (barras azules) y hacia abajo (barras naranjas).	33
Figura 15. Glucólisis en el endospermo líquido en estadios inmaduro, intermedio y maduro de los cultivares EVY y APM.	34
Figura 16. Ciclo de Calvin-Benson en el endospermo líquido en estadios inmaduro, intermedio y maduro de los cultivares EVY y APM.	35
Figura 17. Rutas de las pentosas fosfato en el endospermo líquido en estadios inmaduro, intermedio y maduro de los cultivares EVY y APM.	36
Figura 18. Ciclo del ácido tricarbóxico en el endospermo líquido en estadios inmaduro, intermedio y maduro de los cultivares EVY y APM. (A) CAT en plantas, variación V y en (B) plantas variación II y hongos.	37
Figura 19. Maduración del coco y proteínas identificadas en los cultivares Enano verde de Yucatán (EVY) y Alto del Pacífico mexicano (APM). Cambios visuales de la	

maduración de frutos EVY (A) y APM (B). Perfil de proteína del endospermo sólido durante la maduración del EVY y APM en SDS-PAGE (C), el estándar de peso molecular de la proteína se indica en el lado izquierdo de la Figura. Número de proteínas identificadas por TMT-SPS-MS3 en EVY y APM (D). Representación proporcional en diagrama de Venn de las proteínas identificadas en cada variedad (E). (Félix et., 2023) 49

Figura 20. Enriquecimiento de los procesos biológicos encontrados en el endospermo sólido de coco visualizados como TreeMap. Proteínas compartidas entre ambos cultivares (proteoma central, A). Proteínas únicas identificadas en los cultivares EVY (B) y APM (C). Cada cuadro representa el peso del valor p dentro del diagrama de árbol. Los componentes (recuadros) del mismo color representan similitud semántica (similitud media permitida, 0,7). Los procesos biológicos más enriquecidos se muestran como componentes más grandes dentro del mapa. 1, organización del citoesqueleto de microtúbulos; 2, Metabolismo de la fructosa 1,6-bisfosfato; 3, Regulación de fusión no autofágica de vacuolas; 4, proceso basado en microtúbulos; 5, respuesta a la sustancia que contiene arsénico; 6, transporte retrógrado mediado por vesículas del, aparato de Golgi al retículo endoplásmico; 7, metabolismo de derivados de carbohidratos; 8, regulación negativa de la respuesta a la privación de agua. (Félix et., 2023) 50

Figura 21. Análisis proteómicos comparativos durante la maduración del endospermo sólido. Análisis de componentes principales (ACP) de la abundancia de proteínas de EVY (A). Proteínas diferenciales acumuladas significativamente están representadas en gráficos de volcanes en las relaciones Log 2 intermedias/inmaduras (B), maduras/inmaduras (C) maduras/intermedias (D). ACP de la abundancia de proteínas de APM (E). Las proteínas significativas acumuladas diferencialmente se representan como en F, G y H. El eje x corresponde al valor de log₂ FC, y el eje y muestra el P value-log₁₀. Los puntos en azul representan las proteínas reguladas hacia abajo (< 1/1,5 cambio de veces, FC) y los puntos en rojo representan las proteínas acumuladas al alza (≥ 1,5 FC). Alanina aminotransferasa 2 (ALAT2), L-ascorbato peroxidasa 2 (APX2), alfa-galactosidasa 2 (AGAL2), anexina D1 (ANXD1), aldehído deshidrogenasa familia 2 miembro B4 (AL2B4), biotina carboxilasa (BC), EF de unión a calcio -proteína de la familia de la mano (CbEF), carboxipeptidasa (CP), factor de elongación 1-beta 1 (EF1B1), factor de elongación putativo 1-alfa (EF1A4), proteína 1 similar a la nodulina temprana (Enod1), proteína similar a Em (GEA6) , Dihidrolipoil deshidrogenasa 2 (LPD2), Inositol-3-fosfato sintasa isoenzima 2 (INO2), Probable fructocinasa-6 (PFK6), Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (SDP6), Proteína de choque térmico 90-4 (HSP90-4), Proteína de la familia de glutatión S-

transferasa (GST), exonucleasa 2 similar a DIS3 putativa, UDP-glucosa 4-epimerasa (GEPI48), proteína de la familia FAM10 putativa, proteína similar a glucano endo-1,3-beta-glucosidasa (GbG), proteína similar a RHOMBOID 2 (RBL2), proteína abundante de embriogénesis tardía (LEA) de 11 kDa, exonucleasa 2 similar a DIS3 putativa, proteína MADRE de FT y TFL1 (MFT), proteína 1A asociada al cuerpo oleoso (OBP1A), proteína del complejo T 1 subunidad theta (TCPQ), piruvato cinasa 2 de plastidio (PKP1), piruvato cinasa de plastidio 2 (PKP1), sacarosa sintasa 4 (SUS4), serina carboxipeptidasa II-3 (SCII-3), supuesta serina proteasa (EDA2), UDP-glucosa 6-deshidrogenasa 3 (UGDH3), péptidos antimicrobianos similares a vicilina 2-2 (AMP2-2), Villin-4 (VILI4). (Félix et., 2023) 52

Figura 22. Representación visual de las proteínas diferenciales asociadas con enzimas relacionadas con especies reactivas de oxígeno (ROS) y vías de desintoxicación del metilglioxal en los cultivares EVY y APM. La reconstrucción de la ruta se llevó a cabo utilizando la herramienta de "resumen celular" en la plataforma de base de datos Plant Metabolic Network (PMN). (Félix et., 2023) 53

Figura 23. Representación visual de proteínas diferenciales asociadas a las principales rutas biosintéticas de carbohidratos. Patrón de acumulación de proteínas relacionadas con carbohidratos determinado por TMT-SPS-MS3. Los círculos pequeños indican los valores de log 2 FC de cada proteína; los círculos grandes son el promedio de los valores del log 2FC y las columnas indican la suma del log 2FC (**A**). Dinámica de las enzimas diferenciales identificadas en la gluconeogénesis I (**B**) y la glucólisis I (a partir de glucosa 6-fosfato) (**C**). La reconstrucción de la ruta se llevó a cabo mediante el uso de la herramienta de "resumen celular" en la plataforma de base de datos Plant Metabolic Network (PMN). (Félix et., 2023)..... 55

Figura 24. Representación visual de proteínas diferenciales asociadas al CAT. Dinámica de enzimas diferenciales identificadas en el CAT V (plantas, **A**) y II (plantas y hongos, **B**). (Félix et., 2023)..... 56

Figura 25. Representación visual de proteínas diferenciales asociadas a las rutas biosintéticas de ácidos grasos. Patrón de acumulación de proteínas relacionadas con lípidos determinado por TMT-SPS-MS3. Los círculos pequeños especifican los valores de log 2FC de cada proteína; los círculos grandes son el promedio de los valores de log 2FC, y las columnas indican la suma del log 2FC (**A**). Dinámica de enzimas diferenciales identificadas en las rutas biosintéticas de palmitato (**B**), y elongación de ácidos grasos saturados (**C**). La reconstrucción de la ruta se realizó mediante la herramienta de "resumen

celular" en la base de datos de la plataforma Plant Metabolic Network (PMN). (Félix et., 2023)	57
Figura 26. Perfil de dos cultivares de coco durante la maduración, volumen de agua (mL) y peso fresco (g). A) Enano verde de Yucatán B) Alto del Pacífico mexicano. Frutos inmaduros: (6-8 meses) después de la polinización (MDP); Intermedios: (9-10 MDP); Maduros: (11-14 MDP)	86
Figura 27. Análisis de Venn para la distribución de las proteínas en los diferentes cultivares y los dos endospermos. Endospermo sólido enano Verde de Yucatán (mamey), endospermo líquido enano Verde de Yucatán (azul), endospermo sólido alto del pacífico mexicano (verde), endospermo líquido alto del pacífico mexicano (rosa)	87
Figura 28. Ontología de genes de las proteínas compartidas entre los endospermos sólido y líquido de los cultivares EVY y APM en los tres estadios de maduración. ..	88
Figura 29. Perfil del endospermo sólido y líquido del coco en el estadio maduro. ..	88
Figura 30. Perfil electroforético en SDS-PAGE de 12% de polipéptidos de dos cultivares teñido en plata. Enano verde de Yucatán y Alto del Pacífico mexicano. A la izquierda los diferentes pesos moleculares.....	89
Figura 33. Glucólisis en el endospermo líquido en estadios inmaduro, intermedio y maduro de los cultivares EVY y APM. (A) Proteínas citosólicas implicadas en la glucólisis IV; (B) glucólisis II a partir de fructosa 6-fosfato; (C) glucólisis I a partir de glucosa 6-fosfato.	90
Figura 34. Comparación de la glucólisis de los endospermos sólido y líquido en estadios inmaduro, intermedio y maduro de los cultivares EVY y APM. (A) Proteínas citosólicas implicadas en la glucólisis IV; (B) glucólisis II a partir de fructosa 6-fosfato; (C) glucólisis I a partir de glucosa 6-fosfato.	91
Figura 35. Comparación del TCA de los endospermos sólido y líquido en estadios inmaduro, intermedio y maduro de los cultivares EVY y APM. (A) TCA variación V; (B) TCA ciclo II.	91
Figura 36. Comparación de las rutas de las pentosas fosfato de los endospermos sólido y líquido en estadios inmaduro, intermedio y maduro de los cultivares EVY y APM.	92
Figura 37. Comparación del ciclo de Calvin-Benson de los endospermos sólido y líquido en estadios inmaduro, intermedio y maduro de los cultivares EVY y APM. ..	93

RESUMEN

El coco (*Cocos nucifera* L.) pertenece a la familia Arecaceae, es diploide y consta de dos grandes grupos de variedades, los enanos y los altos. Ambos se destinan al consumo directo y a la transformación. A lo largo de la maduración, el coco acumula mayormente carbohidratos en los estadios tempranos y ácidos grasos en las etapas tardías, pero se desconoce cómo se coordinan estas rutas metabólicas en los diferentes estadios. En esta investigación se utilizó la espectrometría de masas con selección de precursores sincrónicos Tandem Mass Tag (TMT-SPS-MS3), con el objetivo de analizar la dinámica de las proteínas involucradas en el metabolismo de los ácidos grasos y carbohidratos del endospermo líquido y sólido de dos cultivares de cocotero en los estadios inmaduro, intermedio y maduro, respectivamente. En el endospermo líquido, de los cultivares Enano verde de Yucatán (EVY) y Alto del Pacífico mexicano (APM), se detectó un total de 881 y 1125 proteínas, respectivamente, de las cuales 436 fueron compartidas entre los tres estadios de maduración, la mayoría pertenecientes a las rutas del CAT, glucolisis/gluconeogénesis, fijación de carbono en organismos fotosintéticos. En el endospermo sólido los análisis proteómicos mostraron un total de 378 y 488 proteínas para el EVY y APM, respectivamente. Doscientas cuarenta y cuatro (244) fueron proteínas diferenciales en EVY y 347 en APM; de estas, 155 proteínas fueron compartidas (“core”) entre ambos cultivares. Las proteínas del metabolismo de los lípidos se acumularon más en el cultivar APM respecto al EVY. En los dos endospermos y los dos cultivares, 111 proteínas fueron compartidas en los tres estadios. Los resultados anteriores apoyan la existencia de una estrecha coordinación metabólica entre los endospermos sólido y líquido de cocotero, la cual se acompaña de la regulación espacio temporal en la acumulación/eliminación de las proteínas involucradas en las diferentes rutas metabólicas que participan en la maduración del coco. Este trabajo es el primero en resaltar la proteómica de las variedades y las etapas de maduración del endospermo sólido, así como el primer trabajo proteómico que se realiza en el endospermo líquido de esta especie. En conclusión, los resultados de este trabajo contribuyen al entendimiento del proceso bioquímico que acompaña la maduración del fruto del coco Enano verde de Yucatán y Alto del Pacífico mexicano.

ABSTRACT

Coconut (*Cocos nucifera* L.) belongs to the *Arecaceae* family, is diploid and consists of two large groups of varieties, dwarf and tall. Both are intended for direct consumption and for processing. During maturation, coconut accumulates mostly carbohydrates in the early stages and fatty acids in the late stages, but it is unknown how these metabolic pathways are coordinated at different stages. In this research, Tandem Mass Tag Synchronous Precursor Selection Mass Spectrometry (TMT-SPS-MS3) was used to analyze the dynamics of the proteins involved in the metabolism of fatty acids and carbohydrates in the liquid and solid endosperm of two coconut cultivars at the immature, intermediate and mature stages, respectively. In the liquid endosperm, in the cultivars Yucatan green dwarf (YGD) and Mexican Pacific tall (MPT), a total of 881 and 1125 proteins were detected, respectively, of which 436 proteins were shared between the three stages of maturation, most of them belonging to the TCA pathways, glycolysis/gluconeogenesis, carbon fixation in photosynthetic organisms. While in the solid endosperm, the proteomic analyses showed a total of 378 and 488 proteins for YGD and MPT, of which 244 were differential proteins in YGD and 347 in MPT; of these, 155 proteins were shared (“core”) between both cultivars. Lipid metabolism proteins accumulated more in MPT than in YGD. In both endosperms and both cultivars, 111 proteins were shared in the three stages. The above results support the existence of a close metabolic coordination between the solid and liquid endosperms of coconut palm, which is accompanied by the spatiotemporal regulation in the accumulation/elimination of proteins involved in the different metabolic pathways involved in coconut maturation. This work is the first to highlight the proteomics of the varieties and stages of maturation of the solid endosperm, as well as the first proteomic work carried out on the liquid endosperm of this species. In conclusion, the results of this work contribute to the understanding of the biochemical process that accompanies the coconut fruit maturation of the YGD and MPT.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo y crecimiento de las plantas están influenciado por señales endógenas, así como por su entorno ambiental (Kou *et al.*, 2021). Por otra parte, las vías metabólicas y los mecanismos reguladores relacionados con la fructificación, el desarrollo y la maduración de las frutas siguen siendo en gran parte desconocidos, debido, en parte al limitado conocimiento bioquímico molecular y la escasa investigación en el área (Sun *et al.*, 2022). Hoy en día, las ómicas como la genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica hasta la fenómica son herramientas útiles para comprender cómo se interrelacionan las vías metabólicas y cómo se regulan, al tiempo que permiten aclarar los procesos biológicos que acompañan al desarrollo y la maduración. En los últimos 20 años, ha habido progresos en los estudios multiómicos en los humanos y algunas plantas modelo; sin embargo, el avance no ha sido el mismo para todos los organismos (Righetti y Boschetti, 2019), tal es el caso del cocotero (*Cocos nucifera* L.), dado que su proceso de maduración ha sido poco estudiado a nivel molecular y ómico.

El cocotero es una de las Arecaceas más importantes del mundo. Consta de dos grandes grupos de variedades según su altura y hábitos reproductivos, los altos y los enanos (Lantican *et al.*, 2019; Xiao *et al.*, 2017). Dada la diversidad de usos, se le llama “árbol de la vida” o “árbol de los mil usos”. Cada parte de la palma de coco, desde las hojas hasta las raíces, tienen aplicaciones que reditúan en beneficios económicos, tal es el caso de los derivados nutraceuticos (Zheng *et al.*, 2019). De la semilla del cocotero, el endospermo líquido y sólido son los componentes más utilizados; abundantes en carbohidratos y lípidos, respectivamente. El agua de coco es más que una bebida tropical, también se ha usado en la medicina tradicional y como medio de crecimiento microbiológico (Naik *et al.*, 2020; Prades *et al.*, 2012). En cuanto al endospermo sólido, de él se obtienen productos como el aceite de coco, coco rallado deshidratado, leche de coco y proteína de coco (Ojobor *et al.*, 2018). A medida que crece la población mundial, aumenta el interés por los aceites vegetales (Yang *et al.*, 2016), por lo que actualmente hay una enorme demanda de aceite de coco.

Los lípidos y los carbohidratos desempeñan un papel importante en las semillas, independientemente de si son ortodoxas o recalcitrantes. Se ha reportado que, en las etapas tempranas del desarrollo de la semilla de coco, la cual es una semilla recalcitrante oleaginosa, en el endospermo líquido se acumulan principalmente carbohidratos y que dicha acumulación disminuye en las etapas intermedias y maduras. En lo que respecta a los lípidos, están presentes en baja cantidad en las etapas tempranas y su síntesis se

incrementa en las etapas intermedia y tardía (Bourgis *et al.*, 2011). Desde el punto de vista bioquímico y molecular, se desconoce la forma en que ambas rutas metabólicas se coordinan. Se han utilizado varios enfoques proteómicos para analizar el endospermo sólido, pero no están claras las variedades ni las etapas de maduración que se utilizaron (Ma *et al.*, 2022; Huang *et al.*, 2016; D'Amato *et al.*, 2012). Por otra parte, la mayoría de las investigaciones del agua de coco se enfocaron a la caracterización fisicoquímica de la misma (Mahayothee *et al.*, 2016; Appiah *et al.*, 2014; Yong *et al.*, 2009; Jackson *et al.*, 2004), sin abordar el componente proteómico. Dado lo anterior, en este estudio se evaluó el comportamiento de las proteínas del agua de coco durante la maduración del fruto. En conjunto, el objetivo de este estudio fue analizar y cuantificar mediante la estrategia TMT-SPS-MS3, las proteínas involucradas en el metabolismo de ácidos grasos y carbohidratos del endospermo sólido y líquido de semillas en tres estadios de maduración en dos cultivares de cocotero. En el endospermo líquido se encontraron 881 y 1125 proteínas en el cultivar Enano verde de Yucatán (EVY) y en el cultivar Alto del Pacífico mexicano (APM), respectivamente, mientras que en el endospermo sólido se encontraron 378 y 488 para el EVY y APM, respectivamente. Los resultados de este trabajo constituyen un avance en el conocimiento de los procesos proteómicos del metabolismo de lípidos, ácidos grasos y carbohidratos que ocurren durante la maduración de las semillas de coco y brindan un panorama global acerca de los mecanismos moleculares subyacentes a las complejas redes reguladoras de la maduración de las semillas de coco.

CAPÍTULO I

1. ANTECEDENTES

1.1. Origen, morfología y fenología del cocotero

El cocotero (*C. nucifera*) está ampliamente distribuido en las zonas tropicales y pantropicales del mundo y se cultiva en más de 95 países; no obstante, su origen no está bien establecido. Es una palmera grande, miembro de la familia de las Arecaceae, dependiendo de la variedad, puede crecer hasta 30 metros de altura, con hojas de 4–6 metros de largo (Izzeddin *et al.*, 2019; Ojobor *et al.*, 2018). Es diploide con 32 cromosomas ($2n = 32$) y consta de al menos dos grupos de variedades, basados en su estatura y hábito de reproducción, los altos (>18 metros), cuya floración inicia a los 8-10 años después de la siembra y los enanos (<12 metros), cuya floración empieza 4-6 años después de la siembra (Figura 1 A, B) (Lantican *et al.*, 2019; Xiao *et al.*, 2017). El fruto del cocotero consta de tres capas, el exocarpo (la capa más externa), el mesocarpo (la capa fibrosa intermedia) y el endocarpo (la parte interna más dura del fruto). El exocarpo y el mesocarpo forman la cáscara fibrosa del coco mientras que el endocarpo rodea al endospermo sólido y líquido (Figura 1 C) (Harries, 2012).



Figura 1. Diferentes cultivares de cocotero. A) Alto del Pacífico mexicano; B) Enano verde de Yucatán; C) Diferentes partes de la semilla de cocotero. (Foto del autor)

1.2. Origen y desarrollo de los endospermos líquido y sólido

El desarrollo de la semilla comienza luego de la fertilización de las flores femeninas, ya que el coco emite una inflorescencia cada 28 o 30 días (Sudha *et al.*, 2021). Aunque una inflorescencia produce muchas flores, no todas llegan a fruto maduro; muchas se caen del tallo durante el desarrollo (Niral *et al.*, 2021). Kumar y colaboradores, (2018) reportaron que a partir del tercer mes después de la polinización en la semilla se forma el endospermo líquido y alcanza su volumen máximo a los ocho meses en las dos variedades. Durante la fase temprana de germinación hay un aumento gradual en la cantidad de agua de coco, que es mayor en las variedades altas en comparación con las enanas (Kumar *et al.*, 2018). Mientras que, durante la maduración de la semilla el volumen de agua disminuye en las dos variedades (Jackson *et al.*, 2004). El endospermo líquido juega un papel vital en el desarrollo de la semilla al actuar como reservorio precursor para la síntesis de los componentes de la semilla y los nutrientes del agua de coco se derivan de los tejidos fotosintéticos maternos, así como de los del propio fruto (Yong *et al.*, 2009).

En cuanto al endospermo sólido, éste se forma a partir de una capa de células en la cavidad del saco embrionario, y posteriormente empieza a notarse en la región antípodal (Abraham y Matthew, 1963). Agaton y colaboradores, (1989) observaron núcleos flotantes libres en el endospermo líquido en la etapa inmadura, que luego dieron lugar al endospermo sólido. A diferencia del endospermo líquido, el endospermo sólido se forma a partir del séptimo mes, pasando por varias etapas, desde una pulpa blanda (etapa inmadura) hasta llegar a la madurez donde la pulpa se vuelve dura (Angeles *et al.*, 2018)

1.3. Importancia del fruto de cocotero

Se ha reportado que el coco se encuentra entre los cultivos más importantes y extensos del mundo (Kumalasari *et al.*, 2020). En Malasia, el cocotero es el cuarto cultivo industrial, basado en el área total plantada, ésta es una de las industrias agrícolas más antiguas del país (Halim *et al.*, 2018). En Indonesia también es parte de la vida cotidiana y se le llama “árbol de la vida” porque todas sus partes son útiles (Zheng *et al.*, 2019) y en Tailandia es uno de los productos agrícolas importantes (Nitiwattananon y Thanachasai, 2019). El cocotero es una de las palmas económicamente más importantes en todo el mundo debido a la versatilidad de sus productos, que han sido utilizados por la humanidad desde la antigüedad como fuente de alimentos, bebidas, combustible, medicamentos y material de construcción, incluyendo la fabricación de techos, cuerdas, muebles y construcción de muros o vallas con la madera (Figura 2) (Muñoz-Pérez *et al.*, 2019).

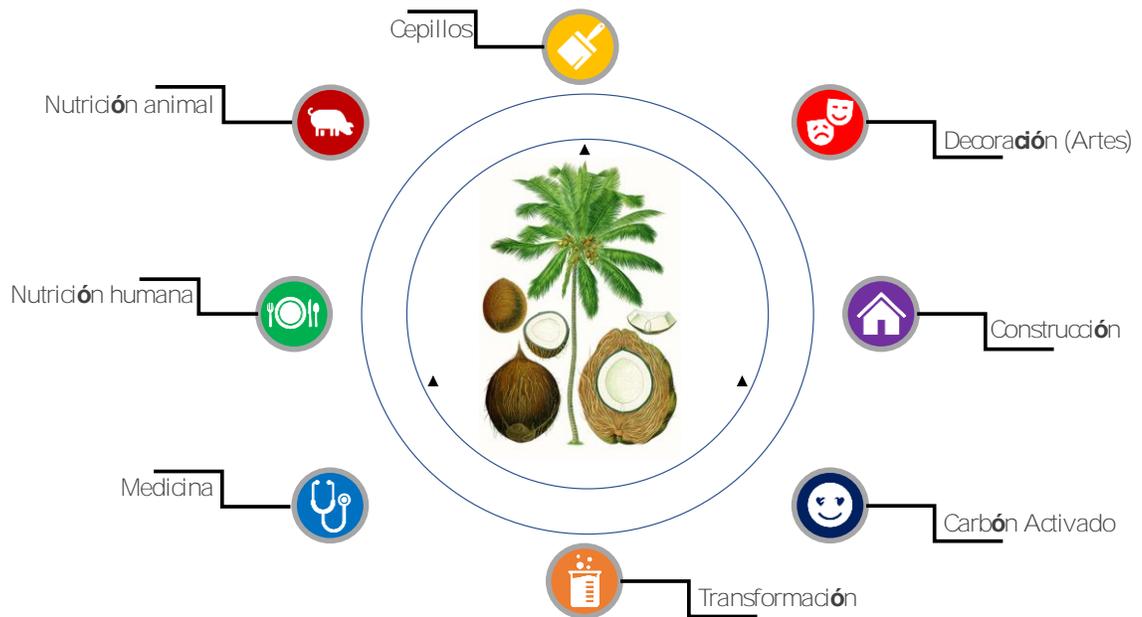


Figura 2. Diferentes usos de la palma de coco (Foto del autor)

1.4. Composición nutricional del endospermo sólido y líquido

El endospermo sólido del fruto de cocotero proporciona una buena fuente de proteínas y puede mejorar la digestión, ayudar a regular el azúcar en la sangre, proteger contra la diabetes, ayudar a prevenir enfermedades cardíacas y el cáncer, así como a perder peso (Kumalasari *et al.*, 2020). Ojabor *et al.* (2018) describieron que la “carne del coco” o endospermo sólido contiene altos porcentajes de elementos minerales, especialmente sodio y potasio. Por otro lado, Appaiah *et al.* (2014) afirmaron que la “carne de coco” contiene 50-60% de grasas. De la “carne de coco” se extrae el aceite de coco, que es rico en ácidos grasos de cadena media, los cuales tienen numerosos beneficios para la salud (Teng *et al.*, 2019). En general, el coco tiene cantidades considerables de azúcares reductores (0.4–2.9%), proteínas (0.02–0.55%) (Madihalli *et al.*, 2020).

En cuanto al endospermo líquido, su composición está determinada por una variedad de factores, incluida la región de crecimiento, que incluye al tipo de suelo, las condiciones ambientales, la aplicación de fertilizantes, la variedad y el cultivo, y la etapa de madurez en la cosecha (Burns *et al.*, 2020). El agua de coco es un endospermo líquido, que representa aproximadamente el 25% en peso de la nuez entera (Naik *et al.*, 2020). Es una bebida con un sabor ligeramente dulce y ácido (pH 5.6), el líquido es transparente incoloro dentro de

las nueces verdes jóvenes, contiene alrededor del 5% en peso de sólidos totales (Purkayastha *et al.*, 2012).

Preetha y colaboradores, (2012) describieron que el agua de coco contiene diferentes clases de aminoácidos, compuestos nitrogenados, elementos inorgánicos, ácidos orgánicos, azúcares y sus alcoholes, potasio, calcio, magnesio, sodio, ácido glutámico, lisina, arginina, alanina, citocinina, vitaminas, sustancias de crecimiento. Posteriormente, Rajashri *et al.* (2019) describieron la presencia de compuestos bioactivos en pequeñas cantidades. Al respecto Appaiah *et al.* (2014) reportaron que el potasio es el mineral principal en el agua de coco y que el sodio es el segundo. Según Ojobor *et al.* (2018) el agua de coco puede funcionar como un líquido de rehidratación durante la disentería pues puede reemplazar la pérdida de líquido del tracto gastrointestinal. Naik *et al.* (2020) reportaron que el agua de coco es la mejor alternativa a las bebidas deportivas debido a su bajo contenido calórico (17.4 kcal /100 g).

1.5. Maduración y fitohormonas

1.5.1. Maduración de los frutos climatéricos y no climatéricos

La maduración es un proceso biológico que implica importantes modificaciones externas e internas (Corpas y Palma, 2018), también depende de una cadena coordinada de señales endógenas y exógenas que involucra a las fitohormonas, entre otras. Durante la maduración, ocurren cambios fisiológicos y bioquímicos que pueden converger en la acumulación de pigmentos, ablandamiento de tejidos y endurecimiento de la semilla, desprendimiento de aromas e intensificación del sabor del fruto, entre otros (Mukherjee, 2019). Durante el desarrollo de los frutos, el metabolismo de los compuestos primarios y secundarios juega un papel crucial en la formación de los aromas, así como su vida útil (Forlani *et al.*, 2019). Dependiendo de la diferencia fisiológica del proceso de maduración, los frutos se clasifican en climatéricos y no climatéricos (Jiang *et al.*, 2019).

Una de las características principales de los frutos climatéricos como el plátano, tomate, aguacate, manzana, pera, melón, es que tienen la capacidad de madurar después de la cosecha mediante la aplicación exógena de etileno. Mientras que, de manera antagónica, los frutos no climatéricos como los cítricos, las uvas, la fresa, la frambuesa, el coco, no son capaces de madurar después de retirarlas de la planta madre (Fuentes *et al.*, 2019).

Las frutas cuya maduración está asociada a un pico de producción de etileno y un estallido respiratorio se denominan climatéricas, mientras que las que no lo presentan se denominan no climatéricas (Chen *et al.*, 2018). El cocotero es un fruto no climatérico, dado a que su maduración no está asociada a un pico de producción de etileno y tampoco madura si se

desprende de la planta madre de manera prematura. Zheng y colaboradores, (2019) hipotetizaron que, en la etapa temprana del desarrollo del endospermo sólido, el contenido de ácidos grasos monoinsaturados y saturados es elevado, mientras que, durante el periodo de maduración este contenido disminuye. Por otro lado, varios autores propusieron que, durante la primera etapa del desarrollo del endospermo sólido, hay más contenido de carbohidratos y en la etapa intermedia y tardía hay más contenido de ácidos grasos (Bourgis *et al.*, 2011). En este sentido, el cocotero es una planta oleaginosa como el aguacate, pero se diferencian porque el primero es un fruto no climatérico mientras que el aguacate si lo es. Analizar el proteoma del fruto de cocotero, relacionado con el metabolismo de los ácidos grasos y de los carbohidratos permitirá elucidar diferencias metabólicas entre los frutos climatéricos y no climatéricos y también brindará información acerca del metabolismo de carbohidratos y ácidos grasos que se realiza en las semillas oleaginosas. Se espera que la proteómica mediante etiquetado en tándem (Tandem Mass Tagg) permita identificar a las proteínas-candidato que son clave en la regulación de ambos metabolismos al estudiar diferentes estadios de desarrollo en los endospermos sólidos y líquidos de los frutos de coco Enano verde de Yucatán y del Alto del Pacífico mexicano.

1.5.2. Fitohormonas

Las fitohormonas son compuestos bioactivos que actúan en concentraciones muy bajas y regulan varios procesos celulares, así como las respuestas de las plantas a las condiciones ambientales cambiantes (Bai *et al.*, 2021a). El etileno es una fitohormona volátil con múltiples acciones fisiológicas que incluyen la maduración de la fruta, el crecimiento, la senescencia, la germinación de semillas, la floración y la respuesta a diversos tipos de estrés (Ji y Wang, 2021), en el caso del cocotero no hay un pico de etileno. En cuanto al ácido abscísico, este fitorregulador juega un papel importante en la maduración de frutos no climatéricos; también está involucrado en el crecimiento y en la dormancia de las yemas (Galli *et al.*, 2021). Las auxinas, desempeñan un papel importante en el crecimiento y desarrollo de las plantas y en la respuesta a diversos tipos de estrés (Ullah *et al.*, 2018). Xiao y colaboradores, (2020) han reportado funciones contrastantes de las auxinas en la regulación de la maduración de la fruta, dado que reportaron que esta clase de fitorreguladores inhiben la maduración al antagonizar los efectos del etileno o ácido abscísico.

Las citocininas son una de las fitohormonas importantes y necesarias para la regulación del crecimiento, el desarrollo y la aclimatación de las plantas al estrés ambiental.

En el coco, varios estudios han descrito la presencia de fitohormonas en los endospermos. Wu y Bin (2009), encontraron ácido indol-3-acético (una auxina) y ácido abscísico. Posteriormente, Tan y colaboradores (2014), reportaron que el agua de coco contenía, auxinas, giberelinas, ácido abscísico y citocininas y además propusieron que podría haber más fitohormonas endógenas que ellos no pudieron detectar. Concluyeron que identificar y cuantificar a las fitohormonas endógenas es muy importante dado que el endospermo líquido del coco se usa como medio nutritivo para el cultivo de tejidos vegetales de diversas especies. Por su parte, Yong y colaboradores (2009), reportaron que las citocininas del agua de coco promueven la división celular.

1.6. Metabolismo en las plantas

Diversos eventos ocurren durante el crecimiento y desarrollo de las plantas, tanto moleculares como bioquímicos y fisiológicos, todos repercuten en la morfología vegetal. La fotosíntesis proporciona la energía y el carbono para el metabolismo, el crecimiento y el mantenimiento a lo largo del ciclo día/noche (Fan *et al.*, 2017). En cuanto a la maduración de la fruta, este evento es producto de una compleja serie de reacciones bioquímicas que involucran una regulación bien orquestada por parte de múltiples hormonas y está acompañada de cambios en los rasgos metabólicos y fisiológicos (Ji y Wang, 2021). En el caso del presente estudio, éste se enfoca en dos rutas principales debido a que el metabolismo de los carbohidratos y de los ácidos grasos son predominantes en las semillas oleaginosas.

1.6.1. Metabolismo de carbohidratos en frutos y semillas

Las plantas son autótrofas y utilizan la energía luminosa para convertir el CO₂ en carbohidratos (Hennion *et al.*, 2018). Los carbohidratos solubles como la sacarosa, la glucosa y la fructosa son sustratos importantes del metabolismo vegetal (Li *et al.*, 2017), participan en la mayoría de las vías metabólicas y de señalización que controlan el crecimiento, el desarrollo y la tolerancia al estrés (Figura 3) (Hennion *et al.*, 2018). El metabolismo de los carbohidratos incluye a la fotosíntesis, la glucólisis, la gluconeogénesis, la ruta de las pentosas fosfato, al ciclo de los ácidos tricarbóxicos, entre otros; Luo y colaboradores, (2021) relataron que la glucólisis, la gluconeogénesis y la fotosíntesis desempeñan un papel importante en las respuestas al estrés biótico y abiótico, así como en regular los procesos de crecimiento y desarrollo.

La fotosíntesis es un proceso metabólico complejo que ocurre en las hojas y también está activo en los frutos verdes (Zhang *et al.*, 2022). La sacarosa es el principal producto final de la fotosíntesis en la mayoría de las plantas superiores y se transloca a través del

floema desde las hojas hasta los otros órganos (Wan *et al.*, 2018). El almidón es la reserva básica de carbohidratos que se acumulan en los cloroplastos de las hojas durante el proceso de fotosíntesis (Li *et al.*, 2017). El ciclo del CAT es una serie controlada de pasos enzimáticos que mediante la oxidación de acetil-CoA liberan la energía almacenada en forma de carbohidratos, grasas y proteínas. El ciclo también, produce precursores de aminoácidos como el α -cetoglutarato y el oxaloacetato (Sun *et al.*, 2022). El CAT está vinculado con la glucólisis y genera energía, lo que lo convierte en un eje central en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (Zhang *et al.*, 2022). La glucólisis a su vez, es una vía central de producción de energía en las células; cataboliza la glucosa hasta 2 piruvatos con producción de dos ATP y dos NADH. Los piruvatos generados pueden ser utilizados en las mitocondrias, particularmente en el ciclo del CAT y la cadena de fosforilación oxidativa para generar 28 ATP adicionales (Fuller and Kim, 2022). Aunado a eso, una reacción clave en la glucólisis es catalizada por la enzima citosólica gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, que desempeña funciones críticas en el metabolismo celular y la acumulación de aceite de semillas (Li *et al.*, 2020). Las rutas de los carbohidratos y de los lípidos se coordinan, por lo tanto, una pregunta fundamental es el cómo se regulan estas rutas a lo largo de la maduración, ya que el coco tiene dos comportamientos, en la etapa temprana, acumula carbohidratos y en la tardía, acumula ácidos grasos (Bourgis *et al.*, 2011), de allí la necesidad de estudiar a profundidad los dos metabolismos.

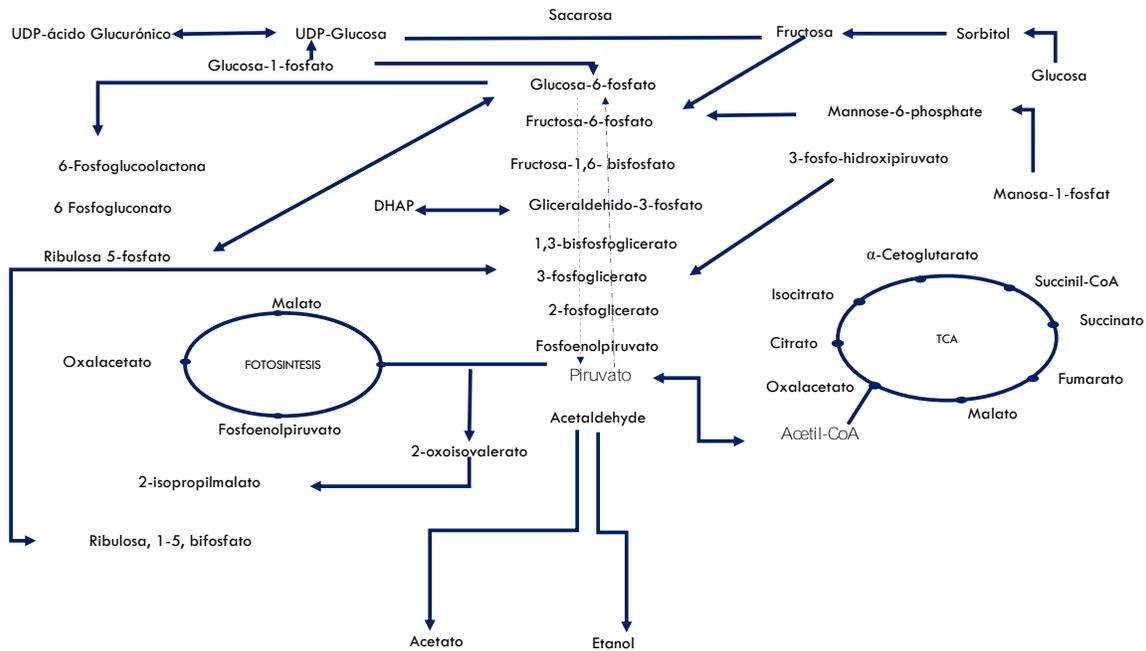


Figura 3. Vía metabólica de los carbohidratos. (glucólisis, gluconeogénesis, fotosíntesis, ciclo de los ácidos tricarboxílicos, rutas de las pentosas fosfato). Foto del autor

1.6.2. Metabolismo de ácidos grasos en frutos oleaginosos

En las semillas oleaginosas, los ácidos grasos cumplen múltiples funciones e incluyen ser importantes reservas de energía, componentes de la membrana, moléculas de señalización e incluso desempeñar un papel importante en las defensas de las plantas, entre otras (Correa *et al.*, 2020). También son esenciales para los procesos de crecimiento y desarrollo, como la germinación de semillas, la diferenciación de órganos y la polinización (Xiao y Chye, 2011). Dependiendo de la naturaleza químico-estructural de las cadenas, los ácidos grasos se pueden clasificar como saturados (sin dobles enlaces) o insaturados (con dobles enlaces); en cuanto a los insaturados se pueden clasificar en ácidos grasos monoinsaturados (un enlace doble simple) o poliinsaturados (más de 2 dobles enlaces en su cadena) (Saini y Keum, 2018). La mayor parte de las plantas oleaginosas como el aguate, la palma de aceite, la oliva acumula aceite en sus semillas, precisamente en sus mesocarpios (Bai *et al.*, 2021), mientras el coco los acumula en su endospermo. Los frutos oleaginosos son utilizados intensivamente y además tienen una gran demanda, debido al alto contenido de ácidos grasos de sus semillas. Cada semilla oleaginosa se diferencia por su perfil específico de ácidos grasos.

En las semillas oleaginosas, los lípidos en forma de triacilgliceroles (TAG), son la principal forma de almacenamiento de carbono y energía celular; constituyen hasta el 60 %

del peso seco de la semilla (Wang *et al.*, 2021). En las semillas oleaginosas, los TAG proporcionan energía esencial para impulsar el crecimiento (Yang y Benning, 2018), y también participan en eventos del desarrollo de las plantas.

En las plantas, la síntesis de ácidos grasos tiene lugar en los plastidios, en los peroxisomas y en las mitocondrias; se necesita acetil-CoA como precursor y la acción de acetil-CoA carboxilasa (Pedreschi *et al.*, 2019). El acetil-CoA se convierte en malonil-CoA para seguir con los procesos posteriores. En esta condensación, ocurre una serie de reacciones como la reducción de (β -hidroxiacil-ACP, deshidratación de (β -hidroxiacil-ACP y reducción de trans- Δ^2 -enoil-ACP, en la que se genera un acil-ACP) (Harwood *et al.*, 2005) (Figura 5).

1.6.3. Ciclo del glioxilato

El ciclo del glioxilato ocurre en los glioxisomas y, es una variación del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CATs, que ocurre en la matriz mitocondrial), dado que en él participan tres de las cinco enzimas asociadas con el CATs; por lo tanto, el ciclo del glioxilato y el CATs comparten varios de sus pasos intermedios (Beevers, 1980). No obstante, en el ciclo del glioxilato se omiten los pasos de descarboxilación y se realizan dos condensaciones, mediadas por las enzimas distintivas del ciclo, la isocitrato liasa y la malato sintasa. La isocitrato liasa hidroliza el isocitrato, un compuesto de 6 carbonos a los compuestos de 4 y 2 carbonos, succinato y glioxilato, respectivamente, mientras que la malato sintasa condensa el glioxilato (molécula de 2 carbonos) con una molécula de acetil-CoA (molécula de 2 carbonos), para producir malato, tal como se muestra en la Figura 4 (Faraoni *et al.*, 2019).

Las enzimas del ciclo del glioxilato, facilitan el catabolismo de los triacilglicerolos (TAGs) y lípidos almacenados hasta el intermediario metabólico acetil-CoA, el cual puede ser utilizado para la síntesis de azúcares o continuar su catabolismo para la extracción de energía (De Bellis *et al.*, 2020). En el caso de las semillas oleaginosas, como el coco, el ciclo del glioxilato es fundamental para la germinación dado que los ácidos grasos almacenados en forma de TAGs son catabolizados por lipasas. Los ácidos grasos libres se conjugan con CoA para formar acil-CoA, el cual se asocia con proteínas acarreadores de acilos (ACPs) incorporándose a los glioxisomas donde se catabolizan hasta acetil-CoA por β -oxidación (Figura 5, Cui *et al.*, 2020). Los intermediarios formados de este proceso son metabolizados hasta azúcares para apoyar la germinación del embrión y el desarrollo de la plántula (Correa *et al.*, 2020).

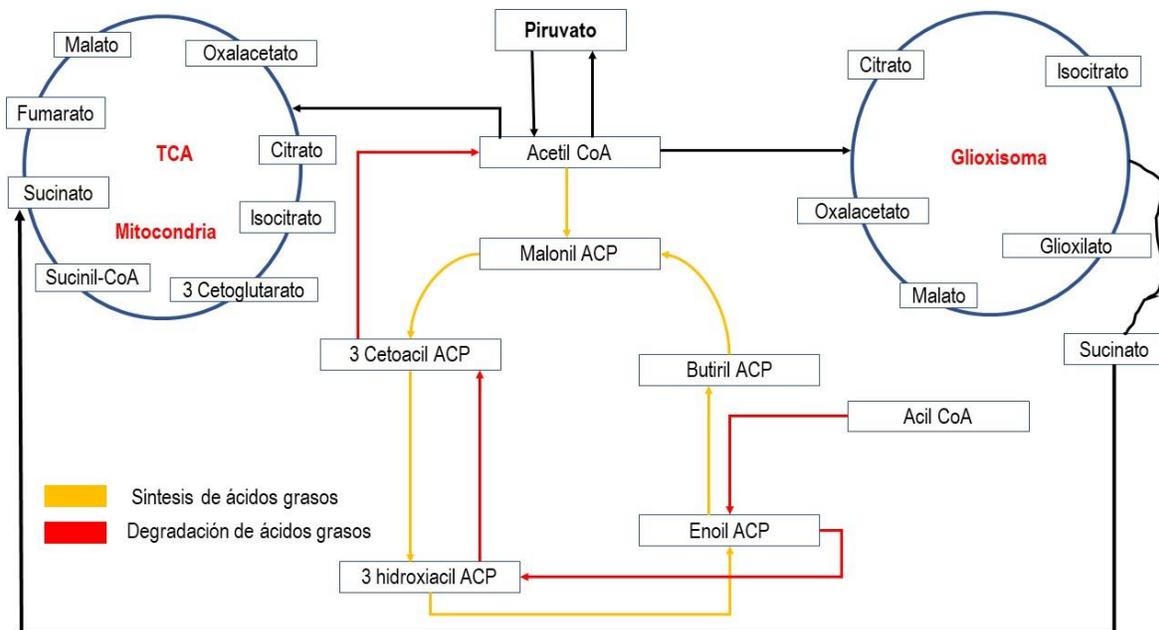


Figura 4. Metabolismo de los ácidos grasos en especies oleaginosas. Flechas en amarillo, indican el anabolismo y en rojo el catabolismo. El ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CATs) ocurre en la matriz mitocondrial y el ciclo del glioxilato en los glioxisomas. Foto del autor

1.7. Proteómica

La proteómica es el análisis de todo el complemento proteico de una célula, tejido u organismo en un conjunto de condiciones específicas y definidas (Agregan *et al.*, 2021). Como estrategia, esta herramienta permite la identificación de proteínas desde el nivel estructural (secuencia primaria de aminoácidos), sus modificaciones postraduccionales, así como el descubrimiento y la validación de biomarcadores (Preece *et al.*, 2018). Uno de los principales desafíos en los estudios proteómicos es el hecho de requerir varias réplicas de la muestra para compensar la variabilidad biológica y experimental (Schubert *et al.*, 2017).

La proteómica se divide en cualitativa y cuantitativa (Wu *et al.*, 2012). La primera se centra en la identificación de las proteínas presentes en las muestras sin importar su abundancia, mientras que la segunda considera la identidad, pero también la abundancia y su dinámica entre las muestras (Bachor *et al.*, 2019). La proteómica cuantitativa se puede dividir en la estrategia basada en gel o en la de alta escala (shotgun, no utiliza gel), así como con etiquetas o sin etiquetas (Macron *et al.*, 2015, Figura 5).

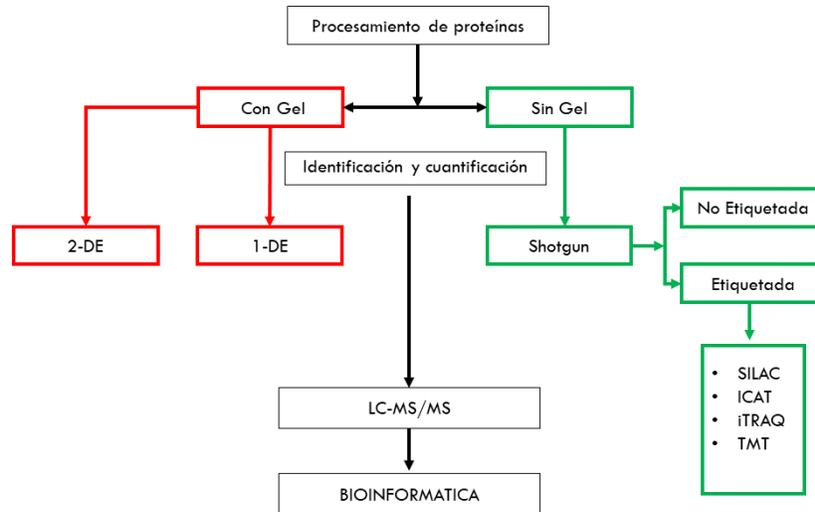


Figura 5. Esquematación del flujo de trabajo de la proteómica. Proteómica basada en gel utilizando una matriz de poliacrilamida (en rojo). En la proteómica libre de gel o de alta escala es de tipo masivo (en verde). En la cuantificación sin etiquetas, se digieren múltiples muestras de proteínas con tripsina o con otras proteasas. Los péptidos resultantes se separan mediante cromatografía líquida (LC) y se ionizan antes de ingresar al espectrómetro de masas (MS). En la estrategia SILAC (Marcaje de isótopos estables mediante aminoácidos en cultivos celulares), las muestras de células se cultivan in vitro en medios adicionados con isótopos naturales (ligeros). En iTRAQ y TMT se utiliza marcaje isobárico.

1.7.1. Proteómica basada en gel

La electroforesis bidimensional (2-D) fue desarrollada por O'Farrell, (1975), en la misma se utiliza un gradiente de pH en una matriz de poliacrilamida para separar las proteínas por su punto isoeléctrico; enseguida, las proteínas isoelectroenfocadas son transferidas a una segunda matriz de poliacrilamida (SDS-PAGE) para determinar la masa molecular de los polipéptidos. Mediante esta estrategia se pueden resolver entre 2500 y 3000 polipéptidos (Lee *et al.*, 2019). Sin embargo, algunas de las limitaciones de este enfoque es la reproducibilidad entre las réplicas de las muestras, así como su resolución (Kruft *et al.*, 2001), la escasa solubilidad de las proteínas hidrofóbicas y la dificultad para detectar proteínas con valores de pI extremos. Al-Amrani y colaboradores (2021), mencionaron que en el gel 2-D, las proteínas están separadas por su carga eléctrica neta y su masa molecular.

1.7.2. Proteómica basada en etiquetas isobáricas

La proteómica con etiquetas isobáricas para la cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ), y la que utiliza etiquetas de masa en tándem (TMT), permite la multiplexación o la cuantificación simultánea de varias muestras (Bramer *et al.*, 2020, Figura 6). La estrategia de etiquetado isobárico tipo TMT fue realizada por vez primera por Thompson y colaboradores en 2003 y un año después Ross y colaboradores desarrollaron y aplicaron la estrategia iTRAQ. La proteómica de alta escala (shotgun) ofrece mayores ventajas con respecto a la realizada sin etiquetado. Dichas ventajas están conferidas por el marcado isobárico y entre ellas se incluyen, mayor reproducibilidad, precisión y sensibilidad, así como la posibilidad de realizar cuantificación de alto rendimiento debido a la multiplexación de muestras (Bachor *et al.*, 2019). No obstante, sus ventajas, también el uso del marcaje isobárico tiene algunos inconvenientes como es el alto costo de los reactivos (Wang *et al.*, 2008). El etiquetado isobárico a través de etiquetas de masa en tándem (TMT) también permite la cuantificación relativa de todo el proteoma para muchas muestras evaluadas simultáneamente (Li *et al.*, 2020).

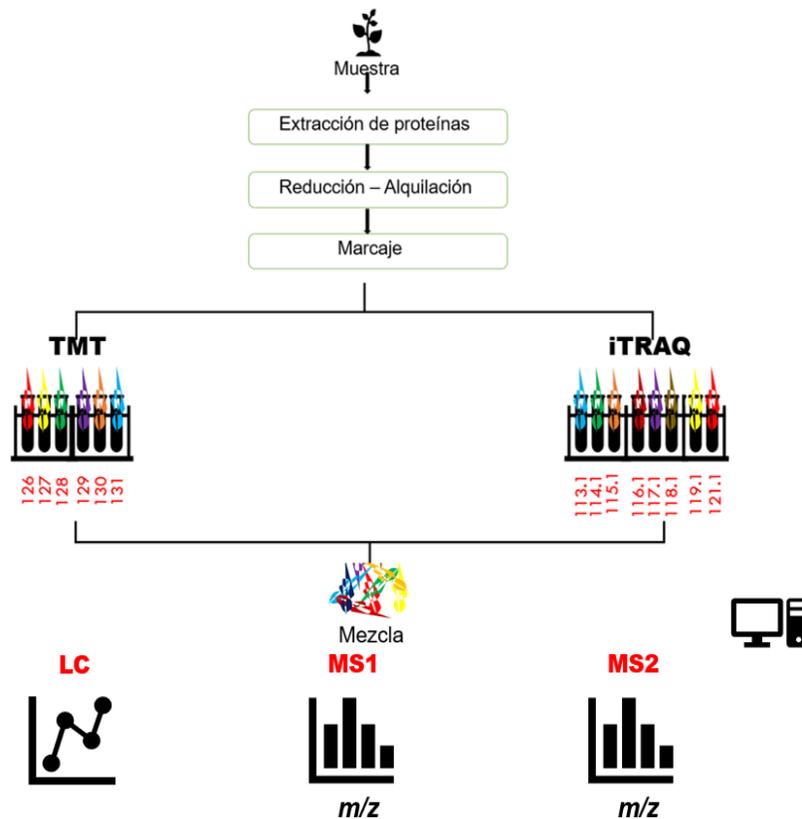


Figura 6. Flujo de trabajo de la proteómica basada en el marcaje con etiquetas y espectrometría de masas. Las proteínas se extraen de diversas muestras biológicas. Las proteínas se digieren enzimáticamente en péptidos. Los péptidos se reducen, se alquilan y luego se conjugan a las etiquetas isobáricas. Los péptidos conjugados se someten a cromatografía líquida de fase inversa, se ionizan mediante electropulverización y se rocían en el espectrómetro de masas. El espectro MS1 registra el número de iones para varios valores de m/z del péptido intacto que eluye en un momento dado. La cuantificación se realiza midiendo las intensidades de los iones indicadores de fragmentos liberados de las etiquetas en el modo MS en tándem (MS2) durante la fragmentación del péptido.

1.8. Las ómicas y su aplicación en coco

Hoy en día, las ómicas se consideran como una de las herramientas más útiles para estudiar a los organismos vivos. El objetivo de estas técnicas es identificar, caracterizar y cuantificar moléculas biológicas, con el fin de determinar su estructura y función en un organismo determinado. Estas herramientas permiten un análisis específico de los efectos de una determinada condición en un organismo en comparación con una condición control.

En el estudio del cocotero, las ómicas que se han aplicado se resumen en la Tabla 1. No obstante esos avances, falta mucho para integrar y entender de manera global los resultados obtenidos con las diferentes estrategias ómicas. Estudios genómicos en el

cocotero, inicialmente describieron la secuenciación de su genoma cloroplástico (Huang *et al.*, 2013), el mitocondrial (Aljohi *et al.*, 2016) y unos años después, Xiao *et al.* (2017), presentaron el primer borrador del genoma nuclear de cocotero. El tamaño del genoma en esta primera aproximación se estableció en 2,42 Gb y predijeron que contenía un total de 28,039 genes codificadores de proteínas.

Más tarde, Lantican y colaboradores, (2019) secuenciaron y ensamblaron una vez más, el genoma de hojas de la variedad de cocotero enano Catigan Green Dwarf, determinaron un tamaño de 2,15 Gb. En 2020, a su vez, Muliyar y colaboradores, ensamblaron y anotaron los genomas nucleares y de organelos de cocotero de la variedad enana “Chowghat Green” de la India y que posee mayor resistencia al amarillamiento letal. Encontraron un genoma de 1,93 Gb, y predijeron un total de 13,707 genes que codifican 11,181 proteínas. Más recientemente, Yang y colaboradores (2021) ensamblaron el genoma del coco, esto les permitió destacar vías de señalización involucradas en la tolerancia a la salinidad, encontraron que más del 72% del genoma del coco está formado por transposones.

También se han realizado estudios transcriptómicos enfocados en la expresión génica de diferentes tejidos y etapas de desarrollo de cocotero en respuesta a diferentes condiciones ambientales (Bandupriya y Dunwell, 2015). En un estudio transcriptómico de hojas jóvenes y copra del coco Fan y colaboradores, (2013) obtuvieron 57,304 transcritos de unigenes y determinaron que 347 participaban en la síntesis y el metabolismo de los ácidos grasos. Posteriormente, Nejat y colaboradores, (2015) detectaron la expresión de un conjunto básico de genes asociados con la defensa del coco en respuesta al ataque de fitoplasmas. En conjunto, ambos hallazgos, han permitido afirmar que la transcriptómica es eficiente en el descubrimiento de genes que se expresan a alta escala bajo determinada condición.

Tabla 1. Trabajos ómicos en cocotero (*Cocos nucifera* L.)

No.	Enfoque ómico	Tejidos usados	Variedades	Referencias
1		Cloroplasto	Thailand Dwarf	Huang <i>et al.</i> , 2013

2	GENÓMICA	Mitocondria	Tall from Oman	Aljohi <i>et al.</i> , 2016
3		Cloroplasto	Chowghat Green Dwarf	Rajesh <i>et al.</i> , 2020
4			Hainan Tall	Xiao <i>et al.</i> , 2017
5			Catigan Green Dwarf	Lantican <i>et al.</i> , 2019
6			Chowghat Green Dwarf	Muliyar <i>et al.</i> , 2020
7			Malayan Yellow Dwarf West African Tall	Yang <i>et al.</i> , 2021
8		TRANSCRIPTÓMICA	Hojas	Hainan Tall
9	Hojas		Malayan Red Dwarf	Nejat <i>et al.</i> , 2015
10	Raíz		Chowghat Green Dwarf	Rajesh <i>et al.</i> , 2015, 2018
	Hojas y raíces		Alto del Pacífico mexicano	Silverio-Gómez <i>et al.</i> , 2022
13	METABOLÓMICA	Endospermo líquido	ND	Costa <i>et al.</i> , 2015
14		Endospermo líquido	Hainan Tall	Chen <i>et al.</i> , 2018
15		Endospermo líquido	Hainan-native coconut	Zhang <i>et al.</i> , 2020
16		Endospermo líquido	Malayan Yellow Dwarf Chowghat Orange Dwarf	Kumar <i>et al.</i> , 2021
17		Endospermo líquido	Enano verde de Yucatán	Gómez-Tah <i>et al.</i> , 2023
18		Leche de coco	ND	D'Amato <i>et al.</i> , 2012
19		Polen	ND	Saha <i>et al.</i> , 2015

20	PROTEÓMICA	Endospermo sólido	ND	Huang <i>et al.</i> , 2016
21		Embrión	Chowgat Orange Dwarf	Jayaraj, 2019
22		Hojas	Hainan Tall Coco aromático	Yang <i>et al.</i> , 2020
23		Endospermo sólido	ND	Lin <i>et al.</i> , 2020
24		Endospermo sólido	ND	Kotecka-Majchrzak <i>et al.</i> , 2021
25		Endospermo sólido	Enano verde de Yucatán Alto del Pacífico mexicano	Félix <i>et al.</i> , 2023
26		Embrión	Enano verde de Yucatán Alto del Pacífico mexicano	Granados-Alegría <i>et al.</i> , 2024

A pesar del gran tamaño del genoma del coco y la gran cantidad de genes que se predice codifican proteínas, ningún trabajo ha podido extraer e identificar al menos la mitad del número de las proteínas predichas. D'Amato y colaboradores (2012) investigaron el proteoma de la leche de coco, del cual se identificaron 307 proteínas. Posteriormente, Huang y colaboradores (2016) generaron un mapa proteómico de coco utilizando electroforesis bidimensional (2-D) y espectrometría de masas e identificaron 200 proteínas. Por su parte, Lin y colaboradores (2020) aislaron proteínas de coco mediante una membrana de diálisis y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-UV), Identificaron dos tipos de globulina, una de 63 KDa, homóloga a la encontrada en la palma datilera (*P. dactylifera*). La globulina estaba constituida de 564 aminoácidos y contrastaba en tamaño con la detectada en la palma africana (*E. guineensis*) donde contenía 398 aminoácidos. Por otra parte, Yang y colaboradores (2020), realizaron el análisis proteómico basado en iTRAQ, de las hojas de dos variedades de coco, una de ellas tolerante al frío (Hainan Tall) y otra sensible (aromática). Encontraron proteínas involucradas en el metabolismo primario,

en la respuesta al estrés, la fotosíntesis y proteínas expresadas diferencialmente que estaban relacionadas con la respiración. De los trabajos proteómicos realizados en el cultivo de coco, el de Yang y colaboradores es el que más proteínas encontró con un total de 2975. Dados los resultados anteriores y a que el metabolismo de carbohidratos y ácidos grasos ha sido poco estudiado durante la maduración de la semilla de cocotero, en el presente trabajo se pretende resaltar la interrelación entre estas dos rutas metabólicas, ya que el cocotero, como muchas otras plantas oleaginosas, depende de una adecuada sincronización entre el metabolismo de los carbohidratos y los ácidos grasos. La comprensión de estos procesos no solo es relevante desde el punto de vista biológico, sino también para el mejoramiento de la producción de cocoteros.

1.9. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Cuánto influye la variedad y el estadio de maduración en la composición del proteoma de ácidos grasos y carbohidratos en los endospermos líquido y sólido del coco?

¿En qué se diferencian los proteomas de los endospermos sólido y líquido de coco?

1.10 JUSTIFICACION

El cultivo del cocotero tiene gran importancia económica por ser el “árbol de los mil usos”. Dadas las propiedades benéficas asociadas a los endospermos sólido y líquido del coco, la comercialización del agua tiene una estimación de 961,9 millones de dólares y se predice que subirá un 25% entre 2017 a 2025 (GVR, 2024) aunado a eso, las *Arecaceae* ocupan la 3^{era} posición en consumo después de las *Poaceae* y las *Fabaceae* (Kong *et al.*, 2021). La semilla del cocotero contiene un endospermo líquido y uno sólido que exhiben el metabolismo de carbohidratos y lípidos. Se conoce que, en las etapas tempranas del desarrollo de la semilla, en el endospermo líquido se acumulan principalmente carbohidratos y que dicha acumulación disminuye en las etapas intermedias y maduras. Además, se ha visto que los ácidos grasos están presentes en baja cantidad en la etapa temprana y que su síntesis se incrementa en las etapas intermedia y tardía (Bourgis *et al.*, 2011). Hasta el momento no se conocen los mecanismos que regulan la dinámica de acumulación de carbohidratos y ácidos grasos durante la maduración de la semilla de cocotero. Es de resaltar que esta falta de información también es una pregunta vigente para otras especies oleaginosas, y que su estudio en cocotero puede aportar información con respecto a las bases fundamentales de la especie y de la vida misma. La proteómica es una herramienta que actualmente permite la identificación masiva de proteínas. Entonces

el enfoque proteómico basado en TMT aplicado en los endospermos sólido y líquido de coco permitirá identificar en los diferentes estadios de desarrollo a las proteínas que son clave en la regulación del metabolismo de ácidos grasos y carbohidratos en esta especie.

1.11 OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS

1.11.1 Objetivo general

Analizar el proteoma relacionado con el metabolismo de ácidos grasos y carbohidratos de los endospermos sólido y líquido en distintos estadios de maduración en dos cultivares de cocotero.

1.11.2 Objetivos específicos

- a) Obtener el proteoma de los endospermos sólido y líquido en tres estadios de maduración de dos cultivares de cocotero.
- b) Identificar las proteínas asociadas al metabolismo de ácidos grasos y carbohidratos en los endospermos sólido y líquido de frutos de cocotero.
- c) Comparar el comportamiento cuantitativo de las proteínas relacionadas con el metabolismo de los ácidos grasos y de carbohidratos en tres diferentes etapas de maduración y entre las dos variedades de cocotero.
- d) Seleccionar proteínas candidatas a ser clave en la regulación del metabolismo de ácidos grasos y carbohidratos en las tres diferentes etapas de maduración y entre las dos variedades de cocotero

1.12 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

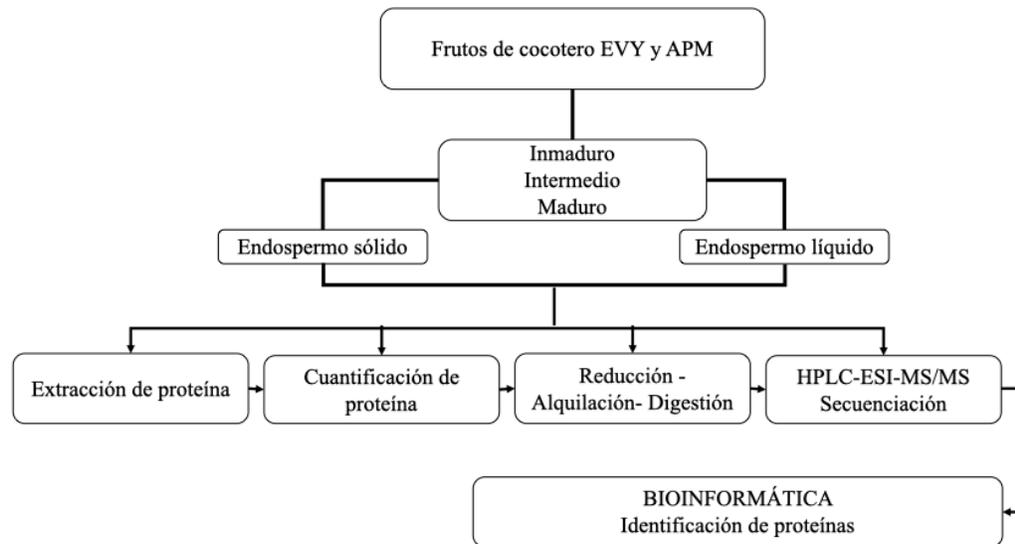


Figura 7. Estrategia experimental aplicada en este estudio.

CAPÍTULO II

2 Análisis proteómico del endospermo líquido de frutos de cocotero

2.1. Introducción

Las semillas oleaginosas son un componente crucial en el suministro de alimentos a la creciente población mundial; recientemente, los productos a base de proteínas vegetales se han vuelto populares entre los consumidores debido a su bajo costo, beneficios para la salud y buenas propiedades funcionales (Thaiphanit y Anprung, 2016). El mercado mundial de los endospermos sólido y líquido, y también de subproductos del coco, alcanzó los 11,500 millones de dólares americanos (Arhin *et al.*, 2023). Hoy en día, la demanda de agua de coco ha aumentado debido a su aporte nutricional a la salud humana (Teh *et al.*, 2017). El endospermo líquido del fruto de cocotero ha sido utilizado como bebida refrescante, aceite comestible, leche y entre otros.

Numerosos estudios evidenciaron diferencias entre variedades y/o cultivares, estadios de maduración, entre otros (Tan *et al.*, 2014; Jackson *et al.*, 2004). El endospermo líquido del fruto de cocotero es más que una simple bebida, en estadio inmaduro, contiene compuestos similares a los estrógenos que podrían usarse para prevenir la enfermedad de Alzheimer, aunado a esto, también se ha utilizado para tratar enfermedades renales (Lima *et al.*, 2015; Mahayothee *et al.*, 2016). Si bien los consumidores prefieren el agua de coco en las etapas inmaduras, Preetha *et al.* (2013) encontraron en ratas diabéticas, que, al suministrar agua de coco maduro en lugar de agua de coco inmaduro, hubo un efecto hipoglucemiante debido a la alta concentración de compuestos bioactivos. Estudios previos mostraron que el agua de coco inmaduro de las variedades altas contenía un mayor nivel de cetonas, mientras que las variedades enanas tenían un mayor porcentaje de aldehídos (Nasution *et al.*, 2018). Anseleme *et al.* (2018) reportaron diferencias entre los azúcares derivados del agua de coco pues describieron que los azúcares derivados de la palma de coco enano amarillo de Malasia son más hiperglucémicos que los de la palma de coco de la variedad Alta de África occidental.

La comprensión de los procesos biológico- moleculares involucrados en el desarrollo del fruto es un paso importante (Yousefi *et al.*, 2023); ya que puede ayudar a manipular y mejorar algunas variables de las plantas o de las semillas. Las plantas son sésiles, para adaptarse a los factores ambientales hacen uso de proteínas y metabolitos que juegan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis celular, y la regulación de los cambios fisiológicos (Yang *et al.*, 2023). Hoy en día, la proteómica es una estrategia

fundamental para estudiar el comportamiento de las proteínas en diferentes condiciones. El análisis proteómico expresa la acumulación de proteínas en un momento específico. Nos permite identificar biomarcadores, interacciones de redes de proteínas y vías biológicas relevantes (Yang *et al.*, 2022). La proteómica se ha utilizado en diversos campos como la medicina, el cáncer, las plantas y otros (Preese *et al.*, 2018), pero en lo referente al coco, la mayor parte de los trabajos proteómicos se han centrado en el endospermo sólido, dentro de los cuales D'Amatto *et al.* (2012) han revisado el proteoma de la leche de coco, Huang *et al.* (2016) han encontrado algunas proteínas de reserva. Recientemente, Félix *et al.* (2023) han presentado un panorama proteómico del endospermo sólido del coco, enfocándose en el metabolismo de los carbohidratos y los lípidos.

En lo que respecta al endospermo líquido, sus mecanismos de regulación son desconocidos, no se conoce su composición proteómica, lo que limita nuestra comprensión sobre el comportamiento de las proteínas a lo largo de la maduración. En estudios previos, se ha utilizado la metabolómica para analizar los cambios a lo largo de la maduración (Gómez-Tah *et al.*, 2023; Kumar *et al.*, 2021). Mientras que la presencia de varias proteínas ha sido mencionada en trabajos previos (García *et al.*, 2005, Kwon *et al.*, 1996), no obstante; hasta la fecha no se ha realizado ningún trabajo proteómico destinado a identificar las proteínas del endospermo líquido de la semilla de cocotero. La extracción de proteínas de cultivos recalcitrantes como el limón y el coco es difícil debido a su mayor contenido de agua (Muccilli *et al.*, 2009); no obstante, Thaiphanit y Anprung (2016), sugirieron que la precipitación de proteínas en su punto isoeléctrico podría ser un método adecuado para la extracción eficiente de proteínas de los subproductos del coco, aunque no lo llevaron a la práctica.

Dado lo anterior, el objetivo de este estudio fue identificar y comparar el proteoma del endospermo líquido de dos cultivares de coco en diferentes estadios de maduración. Utilizando el TMT-SPS-MS3, se encontraron 881 proteínas en el cultivar EVY y 1125 en el APM, respectivamente. Este trabajo proporciona un protocolo eficiente para la extracción de proteínas a partir del endospermo líquido de frutos de cocotero, así como el primer análisis proteómico cuantitativo de las proteínas del endospermo líquido presentes en tres etapas distintas de la maduración del endospermo líquido de dicha especie.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Recolección de material vegetal

Los cocos de los cultivares enano verde de Yucatán y el alto del Pacífico mexicano se cosecharon de una plantación ubicada a 20°24'03.95"N y 89°30'56.86"W en San Crisanto,

Yucatán, México. La cosecha de los frutos se realizó siguiendo los criterios descritos en el capítulo II de la tesis. Los frutos fueron lavados con agua destilada estéril, se descascarillaron manualmente, se cortó el endocarpio con cuchillo estéril y se almacenaron 50 mL de endospermo líquido (agua de coco) a -80°C hasta su posterior procesamiento (Figura 8 A-B).

2.2.2. Extracción del proteoma del endospermo líquido de dos cultivares de cocotero.

El pH inicial del endospermo líquido (agua de coco) se determinó en el laboratorio con un potenciómetro Ohaus (normalmente oscila entre 5.3 a 5.7). A continuación, en tres tubos Nalgene estériles se agregaron 35 mL de agua de coco, se ajustó el pH de cada tubo a 6.0 con NaOH. Los tubos se agitaron suavemente durante 30 minutos a temperatura ambiente. Enseguida, se centrifugaron a $14,000 \times g$ durante 15 minutos a 4°C . El sobrenadante se recuperó y se transfirió a nuevos tubos Nalgene; la pastilla se dejó secar durante 30 minutos a temperatura ambiente. A los sobrenadantes recuperados se les ajustó el pH a 4, añadiendo ácido clorhídrico concentrado (HCl); los tubos se agitaron suavemente durante 30 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron a $14,000 \times g$ durante 15 minutos a 4°C y se recuperaron el sobrenadante y el precipitado, siguiendo el procedimiento descrito en el paso previo. Al sobrenadante se le ajustó el pH a 2 con HCl. Para el caso de la precipitación a pH 8 y pH 10, al sobrenadante recuperado se le añadió hidróxido de sodio (NaOH) concentrado y se siguió el procedimiento de incubación y centrifugación descrito previamente. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente. Las pastillas recuperadas de cada precipitación se marcaron como pH 2, 4, 6, 8, 10, y enseguida, cada uno de ellos se añadió y resuspendió con 500 μl de H_2O estéril. La resuspensión se almacenó a -20°C hasta su uso (Figura 8 B-C).

2.2.3. Cuantificación y análisis de proteínas por SDS-PAGE

La concentración de proteína en cada sobrenadante se determinó según el método de Bradford, (1976). El análisis del perfil de proteínas (30 μg) se realizó en gel de 12 % SDS-PAGE mediante electroforesis a 80 V por 2 horas a temperatura ambiente. Después de la electroforesis, los geles se incubaron toda la noche en tinción de azul de Coomassie y se destiñeron en una solución que contenía ácido acético al 10 %, metanol al 25 % y agua destilada estéril (Figura 8 D).

2.2.4. Proteómica

La preparación de las muestras para proteómica, el marcaje de TMT y el fraccionamiento de péptidos por nano-LC-MS/MS, la selección de precursor síncrono SPS-MS3, y los

análisis bioinformáticos, se realizaron siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo III de esta tesis (Figura 8 E-H).

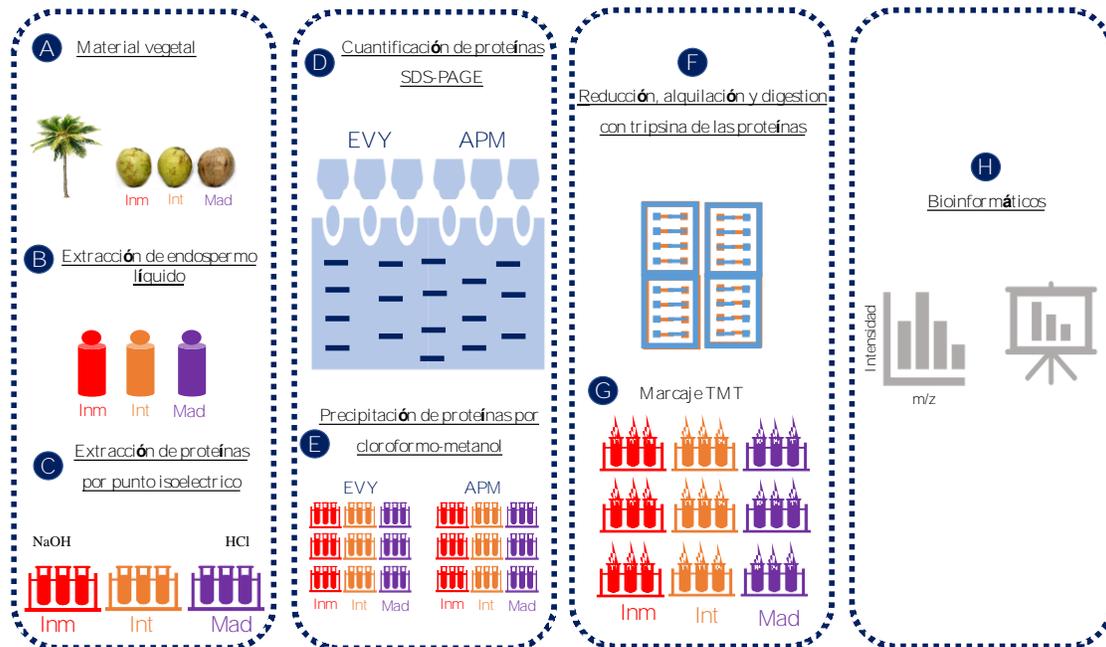


Figura 8. Flujo de trabajo experimental para la realización del análisis proteómico basado en TMT-SPS-MS3 en las proteínas del agua de coco de los cultivares EVY y APM.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Comparación de frutos de cocotero de EVY y APM

El fruto de cocotero es un fruto no climatérico que a lo largo de su maduración registra cambios a nivel fisiológico, morfológico y fisicoquímico. Dado que los cambios morfológicos son los más evidentes, nuestra clasificación de la maduración de los frutos de coco de los dos cultivares, fue dividida en tres estadios: inmaduros, intermedios y maduros (Figura 9 A, B). Cuando el coco está inmaduro, está lleno de agua y pesa más que en los otros estadios, en el intermedio pierde un poco de agua y finalmente en el estadio maduro pesa menos que los dos estadios anteriores

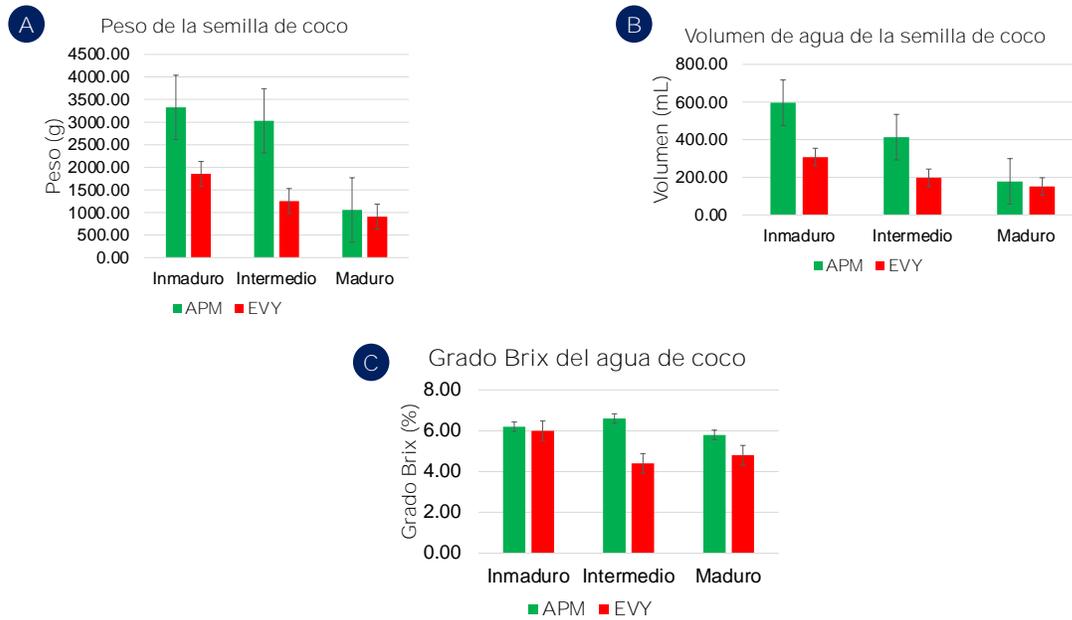


Figura 9. Comparación de frutos de cocotero de dos cultivares durante la maduración. A) Peso del fruto de coco en gramos (g) **B)** Volumen de agua del fruto de coco en mililitros (mL) **C)** Grados Brix del agua del fruto del coco en porcentaje (%).

2.3.2. Electroforesis de proteínas del endospermo líquido de los cultivares EVY y APM.

Los resultados mostraron que, en el endospermo líquido, las proteínas con pesos moleculares de 46 y 33 KDa son comunes en los tres estadios de maduración de los dos cultivares. Mientras que las proteínas con pesos moleculares de 114 KDa son exclusivas o más abundantes en los estadios intermedios y maduros del cultivar APM y el estadio intermedio del cultivar EVY. Las proteínas cuyo peso molecular es de 81 KDa están presentes solamente en el estadio inmaduro e intermedio del cultivar APM y el estadio inmaduro del cultivar EVY (Figura 10).

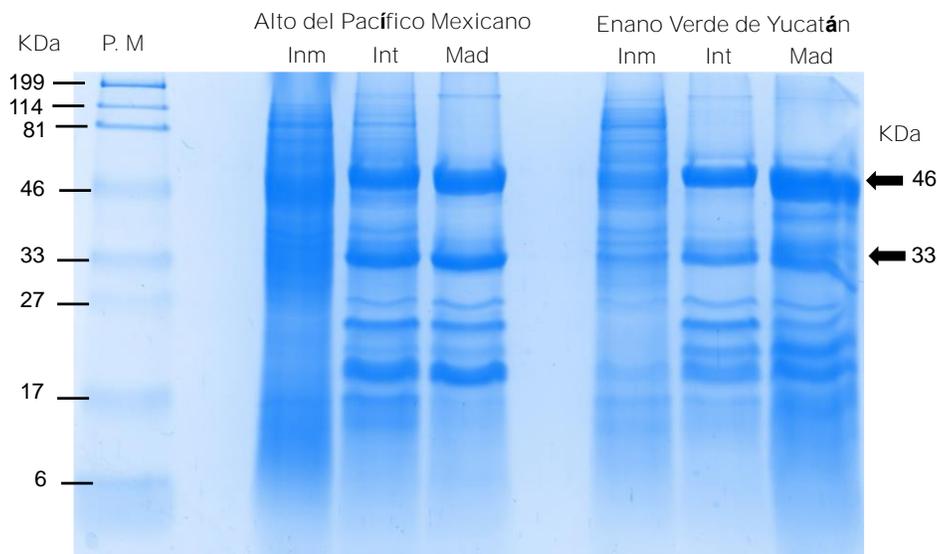


Figura 10. Perfil electroforético en geles de 12% SDS-PAGE de polipéptidos del endospermo líquido de los cultivares EVY y APM. A la izquierda los diferentes pesos moleculares, a la derecha pesos moleculares de polipéptidos encontrados en el endospermo líquido.

2.3.3. Análisis proteómico e identificación de proteínas utilizando etiquetas de masa en tándem (TMT)

Mediante el etiquetado TMT-SPS-MS3, en el endospermo líquido se encontraron 881 proteínas en EVY y 1125 en APM, respectivamente. El diagrama de Venn mostró la distribución de las proteínas de los diferentes estadios de maduración de los cultivares EVY y APM. En el cultivar APM, 781 proteínas fueron compartidas en los tres estadios de maduración. Al comparar las proteínas encontradas en los dos cultivares, hubo 436 que fueron compartidas entre estos dos cultivares y las tres etapas de maduración (Figura 11).

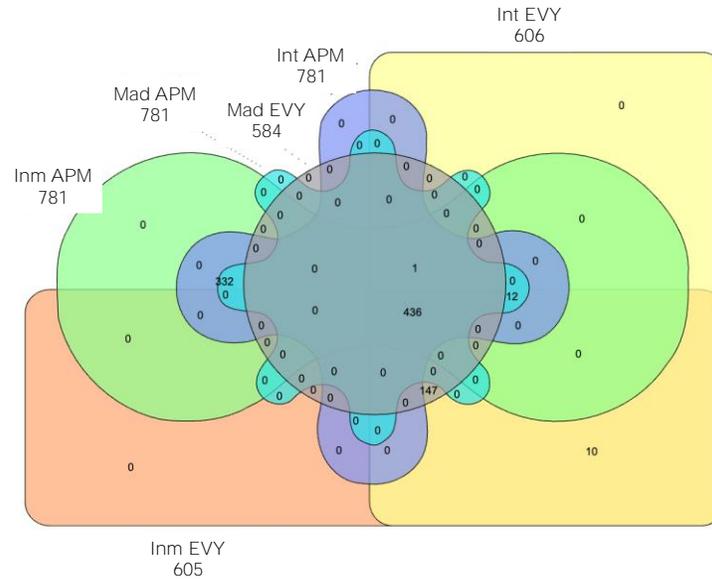


Figura 11. Representación proporcional en diagrama de Venn de las proteínas identificadas en cada etapa de maduración y en cada cultivar. En el cultivar APM, las réplicas biológicas de los diferentes estadios se marcaron de la siguiente manera: Inmaduro (Inm APM), Intermedio (Int APM), Maduro (Mad APM). El cultivar EVY fue el siguiente: Inmaduro (Inm EVY), Intermedio (Int EVY), Maduro (Mad EVY).

2.3.4. Análisis de componentes principales (ACP)

Las réplicas biológicas de las etapas inmadura, intermedia y madura del cultivar EVY y APM se analizaron mediante ACP. El análisis ACP mostró que cada una de las réplicas se agruparon de acuerdo a los diferentes estados de maduración de cada cultivar. Los diferentes estadios de maduración del APM se agruparon en el recuadro superior izquierdo, mientras que los estadios del cultivar EVY se diferenciaron claramente al agruparse en áreas diferentes a las del otro cultivar. Esto muestra una reproducibilidad biológica en la abundancia de proteínas. Por otra parte, la varianza acumulada de CP1 (48%) y CP2 (24,2%) permite explicar hasta el 72.2% de la variación entre las etapas analizadas (Figura 12). Los datos de ACP reagruparon los diferentes estadios y cultivares entre sí.

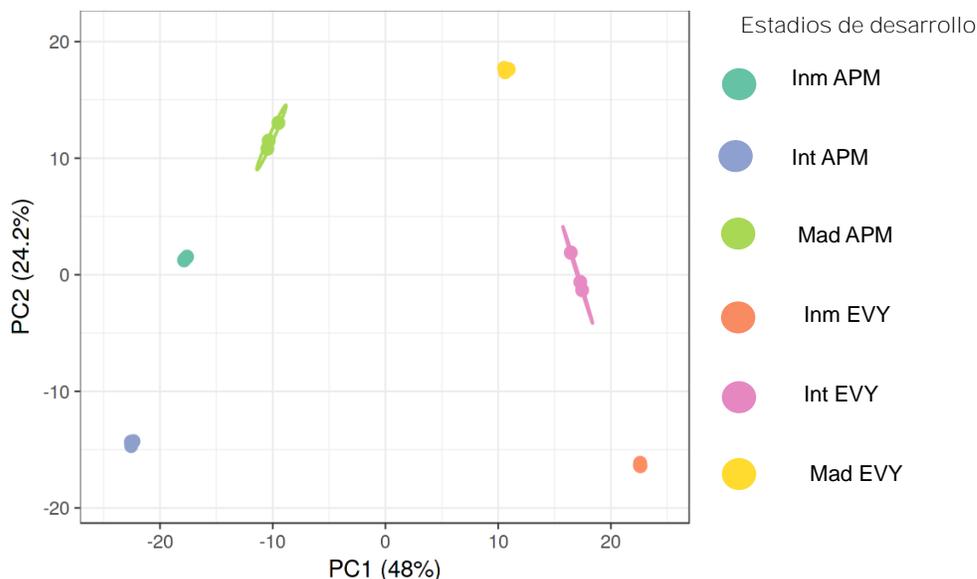


Figura 12. Análisis de componentes principales (ACP) de las tres etapas de maduración, inmaduro, intermedio y maduro, de los endospermos líquidos de dos cultivares de frutos de cocotero EVY y APM. Para cada etapa de maduración se realizaron tres réplicas. En el cultivar APM, las réplicas biológicas de los diferentes estadios se marcaron de la siguiente manera: Inmaduro (Inm APM), Intermedio (Int APM), Maduro (Mad APM). El cultivar EVY fue el siguiente: Inmaduro (Inm EVY), Intermedio (Int EVY), Maduro (Mad EVY).

2.3.5. Rutas KEGG

Cuando las anotaciones de las secuencias de las proteínas fueron cargadas y analizadas en la base de datos del Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (<https://www.genome.jp/tools/kofamkoala/>), se encontraron diferencias entre los cultivares EVY y APM. En las rutas metabólicas (KO01110) estuvieron involucradas 156 proteínas del cultivar APM, y 120 proteínas del cultivar EVY, respectivamente. En la biosíntesis de metabolitos secundarios (KO01110) 81 y 63 proteínas estuvieron involucradas. Adicionalmente, 59 y 47 proteínas, mantenían relación con el metabolismo microbioal en diversos ambientes (KO01120), 39 y 32 proteínas, con el metabolismo de carbono (KO01200). Además, 29 y 23 proteínas estaban relacionadas con la biosíntesis de aminoácidos (KO01230), otras 23 y 9 proteínas estaban relacionadas con la biosíntesis de cofactores (KO01240), otras 15 y 9 proteínas estuvieron relacionadas con el metabolismo del ácido 2-oxo-carboxílico (KO01210), 11 y 9 proteínas estuvieron relacionadas con el metabolismo de ácidos grasos (KO01212), y finalmente 11 y 10 proteínas están relacionadas con el metabolismo de azúcares de nucleótidos (KO01250) (Figura 13).

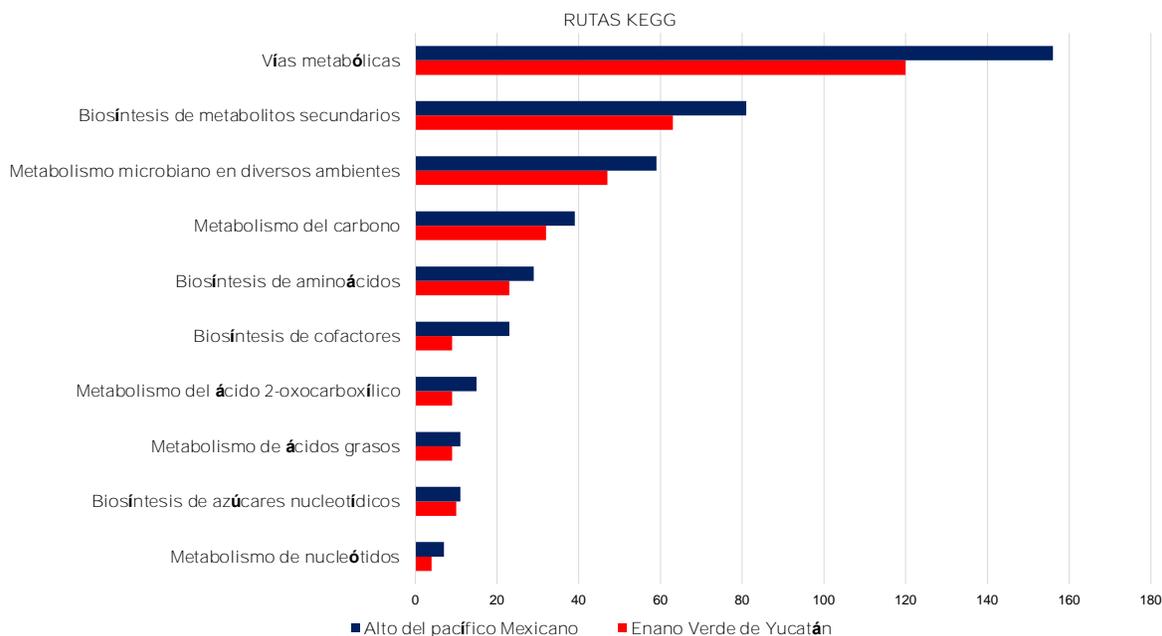


Figura 13. Rutas metabólicas deducidas a partir del KEGG en frutos de cocotero de los cultivares APM (Azul) y EVY (Rojo).

2.3.6. Proteínas acumuladas diferencialmente

Uno de los objetivos principales de la secuenciación del proteoma del endospermo líquido fue comparar los niveles de acumulación de las proteínas en las semillas de dos cultivares de cocotero en tres estadios de maduración. La Figura 14 ilustra el número de proteínas reguladas al alza o a la baja entre la comparación de los estadios. De las proteínas acumuladas diferencialmente, se pueden formar tres estadios de maduración: inmaduro ($\text{Log}_2\text{FC Int/Inm}$); intermedio ($\text{Log}_2\text{FC Mad/Int}$); y maduro ($\text{Log}_2\text{FC Mad/Inm}$). El estadio inmaduro es el único de los dos cultivares que tiene el mayor número de proteínas acumuladas al alza. La mayor parte de las proteínas fue regulada a la baja independientemente del estadio de maduración y del cultivar. Estos resultados indicaron que la identificación y cuantificación de estas proteínas acumuladas diferencialmente fue debida al cambio cuantitativo en su comportamiento debido a que están relacionadas con la maduración del agua del fruto de coco.

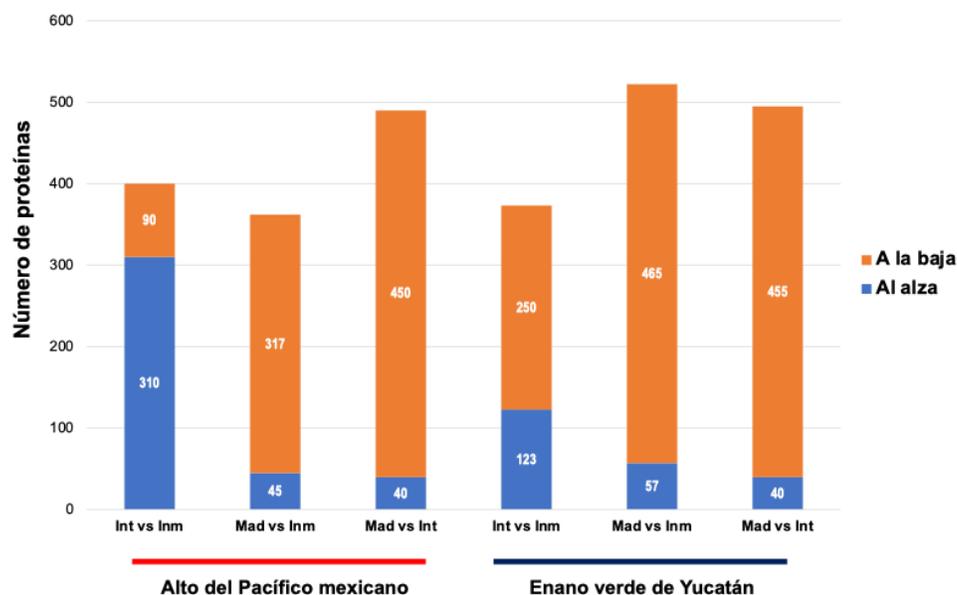


Figura 14. Cambios generales en la regulación de las proteínas de los frutos de cocotero de dos cultivares en tres estadios de maduración. Los diferentes estadios se describieron de la siguiente manera: inmaduro (Int/Inm); intermedio (Mad/Int) y maduro (Mad/Inm). Las proteínas que estuvieron acumuladas hacia arriba (barras azules) y hacia abajo (barras naranjas).

2.3.7. Proteínas del metabolismo de carbohidratos acumuladas diferencialmente (PAD) en el endospermo líquido de los cultivares EVY y APM

2.3.7.1. Glucólisis

A lo largo de la maduración, el comportamiento de las proteínas involucradas en la glucólisis cambió. En el endospermo líquido del cultivar EVY, las proteínas 6-fosfofructocinasa, difosfato:fructosa-6-fosfato 1-fosfotransferasa (Q9C9K3), triosa fosfato isomerasa (P4891), fosfoglicerato mutasa independiente de 2,3-bisfosfoglicerato (O04499), enolasa (P25696, Q9C9C4), fructosa bisfosfato aldolasa (Q9ZU52), D-glucopiranososa 6 fosfato (P34795, Q8H103) fueron reguladas a la baja. Por otra parte, las proteínas fosfoglicerato cinasa (Q9LD57), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (Q9FX54, Q1WIQ6) tuvieron un comportamiento antagónico, pues fueron acumuladas al alza. En cuanto a la glucólisis en el cultivar APM, se observó que la fosfoglicerato cinasa (Q9LD57), la piruvato cinasa (Q9FNN1, Q94KE3), D-glucopiranososa 6 fosfato (P34795) difosfato:fructosa-6-fosfato 1-fosfotransferasa (Q9C9K3), fueron acumuladas al alza. Las proteínas triosa fosfato isomerasa (P48491), piruvato cinasa (Q9FM97) mostraron una acumulación en el estadio

inmaduro y aumentaron su acumulación en los estadios intermedio y maduro. La única proteína que mostró el mismo comportamiento en los dos cultivares es la fosfoglicerato cinasa (Q9LD57) (Figura 15; Figura 33 anexos).

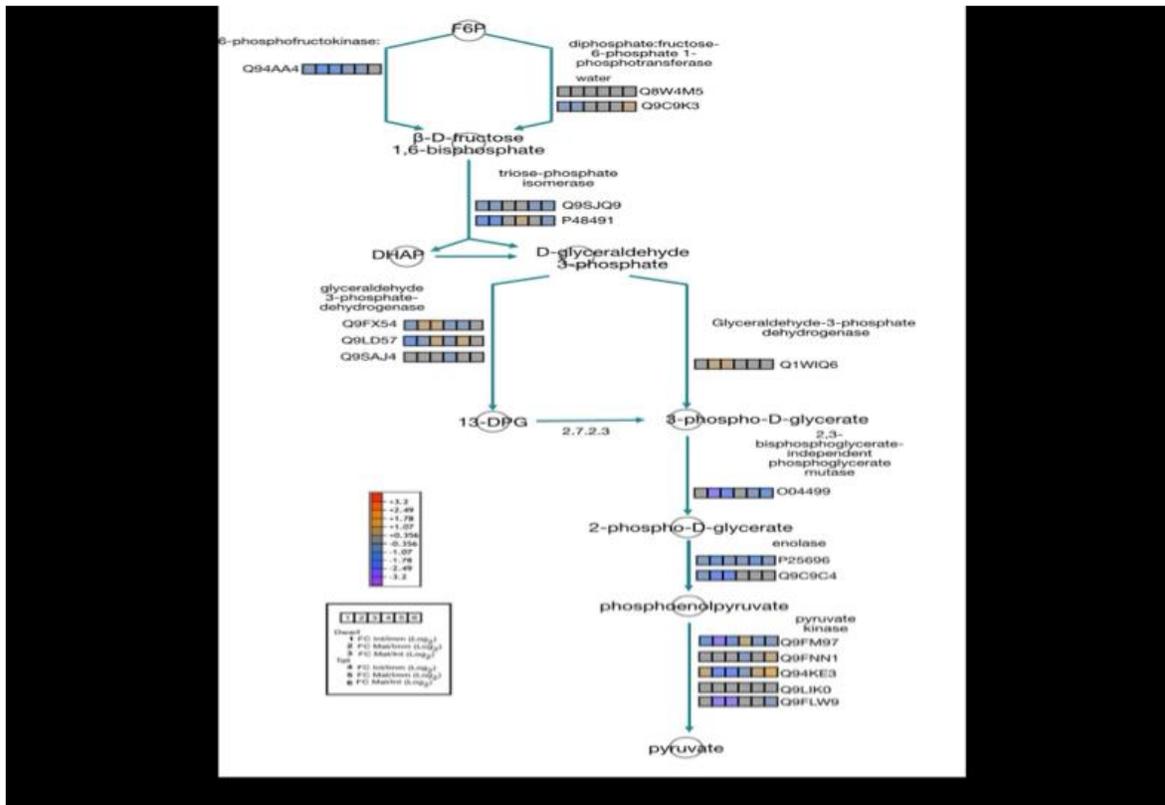


Figura 15. Glucólisis en el endospermo líquido en estadios inmaduro, intermedio y maduro de los cultivares EVY y APM.

2.3.7.2. Ciclo de Calvin-Benson

La fotosíntesis es primordial para la vida de las plantas. En el endospermo líquido del cultivar EVY, las proteínas fructosa bisfosfato aldolasa (Q9ZU52, Q9SJQ9), triosa fosfato isomerasa (P48491), transcetolasa (F4IW47), ribulosa bisfosfato carboxilasa (O03042) fueron reguladas a la baja mientras que la proteína fosfoglicerato cinasa (Q9LD57) fue acumulada al alza. En cuanto al endospermo líquido del cultivar APM, todas las proteínas fueron reguladas a la baja, a excepción de la ribosa 5 fosfato isomerasa (Q9F113) y la fosfoglicerato cinasa (Q9LD57) que fueron acumuladas al alza. La proteína fosfoglicerato cinasa (Q9LD57) mostró el mismo comportamiento tanto en el cultivar EVY como APM (Figura 16).

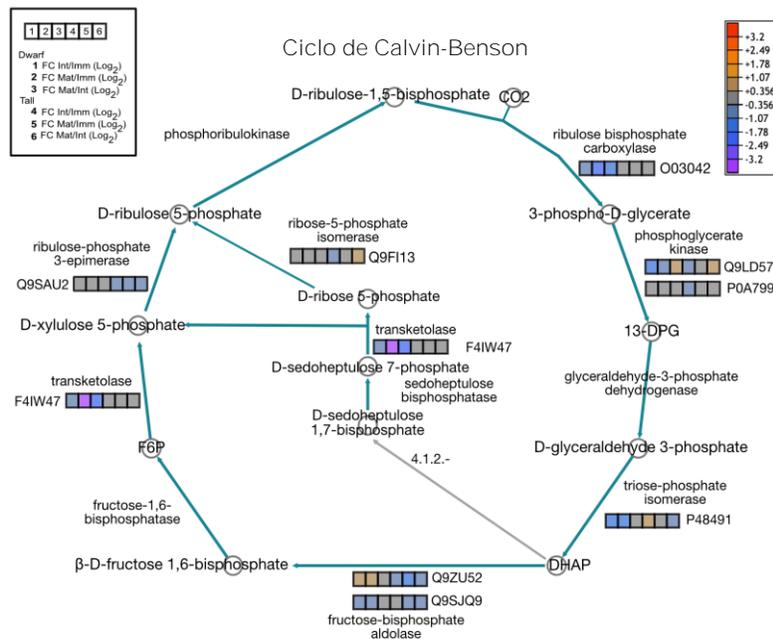


Figura 16. Ciclo de Calvin-Benson en el endospermo líquido en estadios inmaduro, intermedio y maduro de los cultivares EVY y APM.

2.3.7.3. Rutas de las pentosas fosfato

La ruta de las pentosas fosfato está relacionada con la glucólisis y la fotosíntesis. En el cultivar EVY, las proteínas transcetolasa (F41W47), 6 fosfogluconato deshidrogenasa (decarboxilante) (Q9FWA3, Q9FFR3), transaldolasa (F4IW47) fueron reguladas a la baja. Las proteínas transaldolasa (F4IC59), 6 fosfogluconolactosa (Q84WW2) tuvieron una acumulación en el estadio inmaduro y luego hubo un decremento en los estadios posteriores. En cuanto a las proteínas glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (Q9FJI5), transaldolasa (Q9LYR4), ribulosa fosfato 3 epímera (Q9SAU2) y probable ribulosa 5 fosfato isomerasa (Q9FI13), no mostraron cambios en los tres estadios de maduración. En el cultivar APM, la 6 fosfogluconolactona (Q84WW2), 6 fosfogluconato deshidrogenasa (decarboxilante) (Q9FWA3), transaldolasa (F4IC59) tuvieron una acumulación en los estadios tempranos y luego fueron reguladas a la baja en los estadios tardíos (Figura 17).

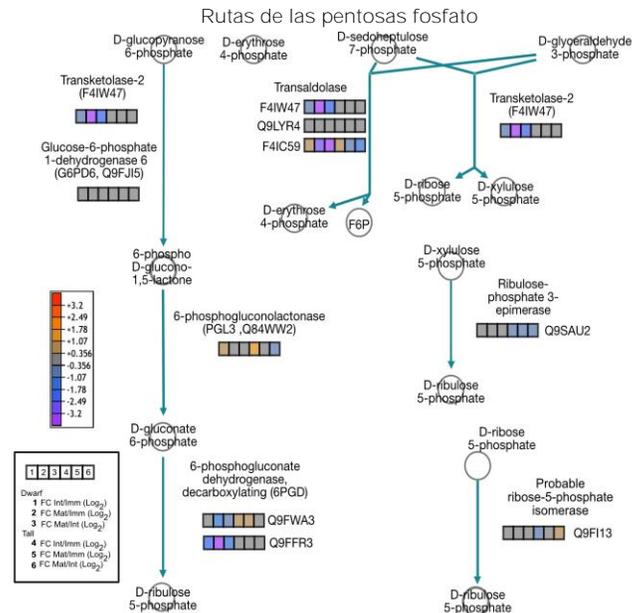


Figura 17. Rutas de las pentosas fosfato en el endospermo líquido en estadios inmaduro, intermedio y maduro de los cultivares EVY y APM.

2.3.7.4. Ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT)

El CAT tiene dos vías de iniciación, la primera, cuando el malato es oxidado a oxaloacetato mediante la malato deshidrogenasa, la segunda, cuando el oxaloacetato es el sustrato primario a ser condensado con el acetil-CoA mediante la proteína citrato sintasa y entonces ambos son canalizados a los intermedios del CAT. En el endospermo líquido del cultivar EVY, las proteínas citrato hidrolasi (formadora de cis-aconitato) (Q9SIB9) y la cis-aconitato hidratasa (Q9SIB9) no tuvieron cambios en la abundancia de proteína entre los tres estadios de maduración. Con respecto a la malato deshidrogenasa (P57106, Q9ZP06, Q9SN86), succinato:quinona oxidoreductasa (O82663) y la succinil-CoA sintetasa (O82662), dichas proteínas fueron reguladas a la baja. En el caso del cultivar APM, las proteínas citrato hidrolasi (formadora de cis-aconitato) (Q9SIB9) y la cis-aconitato hidratasa (Q9SIB9), malato deshidrogenasa (P57106, Q9SN86, PMDH1, pNAD-MDH) y la succinato:quinona oxidoreductasa (O82663), estas proteínas no tuvieron cambios en su abundancia entre los tres estadios de maduración. Las demás proteínas del cultivar APM fueron reguladas a la baja. La mayoría de las proteínas fueron reguladas a la baja en los dos cultivares, solamente la proteína citrato sintasa (P20115) fue acumulada al alza en el EVY (Figura 18).

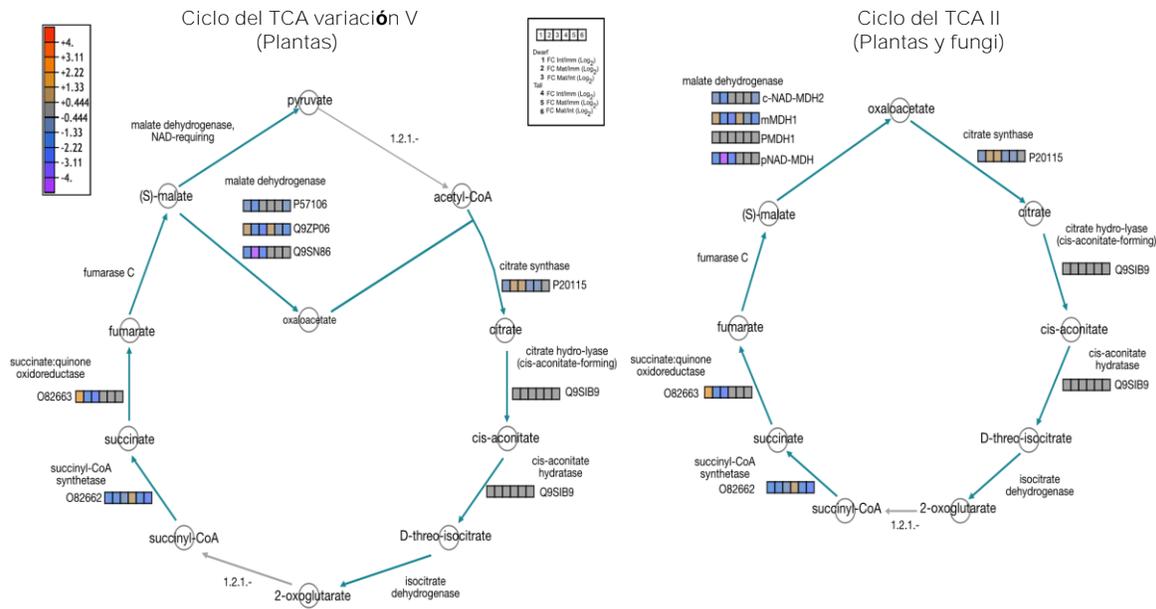


Figura 18. Ciclo del ácido tricarboxílico en el endospermo líquido en estadios inmaduro, intermedio y maduro de los cultivares EVY y APM. (A) CAT en plantas, variación V y en (B) plantas variación II y hongos.

2.4. DISCUSIÓN

Durante la maduración del fruto del coco, los cambios físicos y morfológicos resultan muy significativos, tanto que afectan el color y el peso del fruto; consecuentemente, en la semilla embebida en el fruto también se afecta el contenido de azúcar soluble y los grados brix en el endospermo líquido, entre otros parámetros. En este estudio, se utilizó TMT para identificar de manera cuantitativa, los cambios en abundancia de las proteínas, así como su potencial regulación, ambos factores relacionados con el metabolismo de la maduración del endospermo líquido del fruto de cocotero. Dado lo anterior, este análisis proteómico proporciona una perspectiva más amplia de la dinámica del proteoma durante la maduración del coco y desentraña e identifica a proteínas relacionadas con procesos metabólicos, biosíntesis de metabolitos secundarios, metabolismo del carbono, biosíntesis de aminoácidos, biosíntesis de cofactores, biosíntesis de ácidos grasos, entre otros.

Burns y colaboradores, (2020) reportaron que la maduración del fruto de coco se clasifica en 3 etapas: inmaduro (≤ 8 meses), intermedio (9-10 meses) y maduro (+11 meses). A su vez, Prades y colaboradores, (2012) reportaron que un coco inmaduro puede pesar entre 0.8 a 2 kg, resultados similares a los encontrados en los cultivares APM y EVY; no obstante, el fruto del cultivar Alto del Pacífico mexicano puede llegar a pesar hasta 3.5 Kg

(Figura 17 A). Kumar y colaboradores (2018), reportaron que a lo largo de la maduración hay una disminución en el volumen del agua de coco donde el fruto alcanza su mayor volumen a los 8 meses (estadio inmaduro). Este comportamiento se refleja en nuestro trabajo, donde el volumen de agua de coco pasó de 600 mL en el estadio inmaduro a 200 mL en el estadio maduro (cultivar APM) y de 200 mL a 160 en el cultivar EVY (Figura 17 A).

La composición del agua de coco varía con la etapa de maduración, la variedad y otros factores (Naik *et al.*, 2020). Chen y colaboradores, (2018) y Zhang y colaboradores, (2020), encontraron que la conductividad, el pH del agua de coco inmaduro almacenado, aumentaron a medida que pasa el tiempo de almacén. Prades y colaboradores (2012), relataron que, durante el proceso de maduración, el endospermo sólido crece y el agua de coco es reemplazada parcialmente por células que almacenan lípidos, lo que coincide con el aumento de las proteínas de almacenamiento en la maduración. A su vez, Solangi e Iqbal, (2011) comentaron que la grasa, la proteína, los sólidos solubles, la acidez incrementaron de manera constante con la madurez (Figura suplementaria 30). En nuestro estudio se han observado eventos similares (Ver Figuras en anexos) a lo largo de la maduración de los dos cultivares donde en el estadio inmaduro el coco está lleno de agua y pesa más que los estadios intermedio y maduro.

Por otra parte, en el ACP se introdujo los datos proteómicos que nos permite observar diferencias entre estadios inmaduro, intermedio y maduro. Estos resultados coinciden con las características morfológicas establecidas según los criterios de la maduración del cocotero: inmaduro, intermedio, maduro (Zheng *et al.*, 2019); las abundancias relativas de los diferentes cultivares y estadios se agruparon entre sí.

Este estudio proteómico del endospermo líquido mostró diferencias en la acumulación de las diferentes proteínas. La acumulación de los carbohidratos desempeña papel crucial en el desarrollo de las plantas (Li *et al.*, 2017). En el metabolismo de los carbohidratos, la glucólisis, el CAT y la cadena de transporte de electrones mitocondrial son esenciales para las funciones celulares. (Zhang *et al.*, 2021). La mayoría de las proteínas del metabolismo de los carbohidratos fueron reguladas a la baja. En la glucólisis, la fosfofructocinasa es la enzima que cataliza la conversión de fructosa en fructosa 6 fosfato. En los dos cultivares esta proteína fue regulada a la baja. Nilo-Polanco *et al.* (2021), reportaron que una disminución en la acumulación de fosfofructocinasa en frutas maduras de durazno, coincide con una mayor conversión de sacarosa en fructosa a través de la supresión de la síntesis de sacarosa y la fosforilación de fructosa. En cuanto al malato, éste se puede utilizar como sustrato respiratorio en el CAT o convertirse en piruvato mediante la

actividad de la enzima málica y también la conversión de malato en piruvato puede influir en el flujo glucolítico (Katz *et al.*, 2011).

La fotosíntesis juega un papel crucial en las plantas. Es un proceso metabólico complejo que ocurre en las hojas y aún está activo en los frutos verdes (Zhang *et al.*, 2022). En los organismos fotosintéticos y durante la maduración de la fruta, la RuBisCo está involucrada en el primer paso de la fijación de carbono. En este estudio, la RuBisCo fue regulada a la baja en las dos variedades, comportamiento similar al encontrado en los dos cultivares de durazno estudiados por Jiang y colaboradores (2020). Aunque no se sabe mucho sobre el proteoma del endospermo líquido, este trabajo dilucidó diferencias entre los diferentes estadios de maduración.

La proteómica del endospermo líquido en la semilla de cocotero es crucial para su maduración, ya que regula diversos procesos bioquímicos y metabólicos esenciales. Las proteínas presentes en este tejido no solo garantizan la disponibilidad de nutrientes clave para el desarrollo del embrión, sino que también protegen la semilla frente a factores de estrés y facilitan la activación de rutas metabólicas necesarias para la germinación. De este modo, el análisis de las proteínas del endospermo líquido ofrece una comprensión profunda de su papel fundamental en el crecimiento y la viabilidad de la semilla de cocotero.

CAPÍTULO III**3 El panorama proteómico durante la maduración del endospermo sólido de dos cultivares diferentes de coco revela una modulación contrastante de las vías metabólicas de carbohidratos y ácidos grasos**

Este capítulo es la traducción al español del artículo: Félix *et al.* (2023). Proteome Landscape during Ripening of Solid Endosperm from Two Different Coconut Cultivars Reveals Contrasting Carbohydrate and Fatty Acid Metabolic Pathway Modulation. *International Journal of Molecular Sciences*. 24:10431. <https://doi.org/10.3390/ijms241310431>

3.1. Resumen

Cocos nucifera L. es un cultivo que crece en los trópicos húmedos. Se agrupa en dos clases de variedades: enanas y altas; independientemente de la variedad, el endospermo del coco acumula carbohidratos en las primeras etapas de maduración y ácidos grasos en las etapas posteriores, aunque se desconocen los factores bioquímicos que determinan tal comportamiento. Se utilizó el etiquetado masivo en tándem con selección de precursores sincrónicos (TMT-SPS-MS3) para analizar los proteomas de los endospermos sólido y líquido de los cultivares de coco Enano verde de Yucatán (EVY) y Alto del Pacífico mexicano (APM). El análisis se realizó en etapas de desarrollo inmaduras, intermedias y maduras para comprender mejor la regulación del metabolismo de carbohidratos y lípidos. Los análisis proteómicos mostraron 244 proteínas en EVY y 347 en APM; de estas, 155 proteínas fueron compartidas entre ambos cultivares. Además, los proteomas relacionados con la glucólisis, la fotosíntesis, la gluconeogénesis y los asociados con la biosíntesis y elongación de los ácidos grasos fueron acumuladas al alza en el endospermo sólido de APM, mientras que en EVY fueron reguladas a la baja. Estos resultados respaldan que los metabolismos de carbohidratos y ácidos grasos difieren entre las etapas de desarrollo del endospermo sólido y entre las cultivares EVY y APM. Este es el primer estudio de proteómica que compara diferentes etapas de madurez en dos cultivares contrastantes de coco y además de clarificar aspectos de la proteómica de la maduración del coco, también podría ayudar a mejorar la comprensión del proceso de maduración de otras especies de palmas.

Palabras clave: proteómica; variedades de coco; endospermo sólido; etapas de maduración; metabolismo de carbohidratos y lípidos; TMT-SPS-MS3.

3.2. Introducción

El cocotero (*Cocos nucifera* L.) es una palmera milenaria cuyo uso es integral en las zonas tropicales y subtropicales (Niral *et al.*, 2021). El coco pertenece a la familia Arecaceae, que también incluye la palma aceitera (*Elaeis guineensis*) y la palmera datilera (*Phoenix dactylifera* L.); fuente de aceite (la primera) y de carbohidratos (la segunda) para las industrias alimentaria y farmacéutica (Burns *et al.*, 2020; Kong *et al.*, 2021).

La palma de cocotero muestra muchas variaciones morfológicas y genéticas, por ejemplo, el tamaño del árbol y del fruto; la polinización de las flores, pero se clasifican en dos grupos, según la morfología y los hábitos de crecimiento, las variedades “Altas” y las “Enanas” (Nartvaranant, 2019; Niral *et al.*, 2021). Además, existen los híbridos resultantes de la polinización cruzada entre altos y enanos o viceversa (Islas-Flores y Tzec-Simá, 2021; Sudha *et al.*, 2021). Las variedades altas comienzan a florecer entre 5 y 7 años después de la siembra y continúan produciendo inflorescencias y frutos hasta que tienen entre 80 y 100 años. Cuando son adultas, las palmeras altas alcanzan los 20-30 m de altura; produciendo frutos de tamaño mediano a grande con abundante endospermo sólido y alto contenido de aceite (Lantican *et al.*, 2019). En el caso de las variedades de palmeras enanas, comienzan a florecer y fructificar 3-4 años después de plantadas, y continúan produciendo hasta los 50 años. Como adultos, miden entre 8 y 10 m de altura y producen frutos de tamaño pequeño a mediano con cantidades moderadas de endospermo sólido y menos contenido de aceite que las variedades altas (Boonkaew *et al.*, 2018). La semilla del cocotero es una drupa, su forma varía de esférica a ovalada e incluye el endospermo sólido y el endospermo líquido ligeramente dulce (agua de coco) (Naik *et al.*, 2020).

El endospermo sólido, también llamado “carne de coco” y cuando se seca “copra”, es una fuente de aceite compuesto por triacilgliceroles (TAGs) con ácidos grasos de cadena larga, media y corta, donde predominan los ácidos grasos saturados de cadena media (AGSCM), es decir, ácido láurico (C12:0), ácido mirístico (C14:0) y ácido palmítico (C16:0), entre otros, y el contenido de ácidos grasos totales es mayor en la variedad alta que en la enana (Tenda *et al.*, 2022; Zheng *et al.*, 2019). El aceite de coco contiene altos niveles de ácido láurico y exhibe características como una mayor estabilidad oxidativa, bajos puntos de fusión y formación de emulsiones estables, todas muy apreciadas en las industrias alimentaria y química (Kumar, 2011; Reynolds *et al.*, 2019). Además, debido a su alto contenido de

antioxidantes como el tocoferol y el β -caroteno, el aceite de coco muestra diversos beneficios para la salud como protección antibacteriana, antiviral y cardiovascular (Yuniati *et al.*, 2021); así, el coco es uno de los cultivos más útiles para los humanos (Reynolds *et al.*, 2019).

El crecimiento y la maduración del fruto del coco están intrínsecamente relacionados con el desarrollo de los diferentes componentes de la semilla, es decir, endospermo, pericarpio y embrión. Sin embargo, a diferencia del endospermo líquido, el endospermo sólido de la fruta de coco no se acumula sincrónicamente con la maduración de la fruta porque comienza a acumularse alrededor de la periferia interna del saco embrionario al sexto mes después de la polinización. Las primeras células sólidas del endospermo tienen la apariencia de una matriz similar a una gelatina transparente de color crema y contienen muchos tipos de carbohidratos estructurales (Angeles *et al.*, 2018). Cuando los frutos están madurando, el endospermo sólido se vuelve más grueso, de color blanco y con una estructura más compacta; luego, las células del endospermo detienen su acumulación y comienzan a funcionar como reservorio de proteínas y triacilgliceroles (Angeles *et al.*, 2018).

Bourgis *et al.* (2011) analizaron los transcriptomas de las palmas de aceite y datilera, dos especies de *Arecaceae* con metabolismos contrastantes. Descubrieron que el alto contenido de aceite en *E. guineensis* se asoció con altos niveles de expresión transcripcional de genes biosintéticos de ácidos grasos, mientras que los niveles transcripcionales de enzimas de glucólisis fueron comparables en ambas especies. Naganeeswaran *et al.* (2020) realizaron un análisis transcriptómico de callos embriogénicos de *P. dactylifera* e identificaron 53251 transcritos. Las vías enriquecidas con KEGG estuvieron representadas predominantemente por vías metabólicas que incluyen carbohidratos y energía, de acuerdo con la acumulación casi exclusiva de carbohidratos en la palmera datilera. En el caso del coco, la semilla acumula carbohidratos en etapas tempranas de desarrollo, mientras que en etapas intermedias y maduras acumula ácidos grasos (Islas-Flores y Tzec-Simá, 2021). El análisis de transcriptómica es muy valioso, pero la expresión de la transcripción no se correlaciona necesariamente con la traducción de proteínas, por lo que también es necesario el análisis proteómico.

En el caso de los estudios de proteómica realizados en endospermo sólido de coco, D'Amato *et al.* (2012) reportaron un proteoma de 307 proteínas asociadas a la leche de coco, un derivado del endospermo sólido. Huang *et al.* (2016) usando electroforesis bidimensional basada en gel (2-DE) generaron un mapa proteómico de proteínas comunes

en los endospermos sólidos en 14 muestras de coco recolectadas en diferentes provincias de China, Tailandia y Vietnam. Encontraron al menos 200 puntos de polipéptidos, y al secuenciar algunas de estos polipéptidos mediante MALDI-TOF-TOF-MS (desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo) encontraron homología con la globulina 7S, la glutelina y una proteína cinasa similar a un receptor putativo. Recientemente, Ma *et al.* (2022) mediante shotgun identificaron 1686 proteínas en el endospermo sólido. La digestión *in silico* de globulinas y proteínas antioxidantes con pepsina y tripsina les permitieron predecir péptidos con actividad emulsionante y antioxidante. Desafortunadamente, la base de datos de esta investigación no está disponible al público, lo que impide un análisis posterior. Además, todos estos trabajos realizados en el endospermo sólido del coco, parecen incompletos porque carecen de información sobre las variedades y estadios de desarrollo de los frutos utilizados, ya que los cambios proteómicos están influenciados, al menos en parte, por dichos factores.

El coco es un fruto no climatérico, como las nueces, la castaña, las almendras, los pistachos, en los que la mayor atención se ha centrado en el desarrollo de tecnologías para la extracción de aceite, la prevención del enranciamiento y la estabilidad postcosecha, pero con pocos estudios enfocados en los procesos bioquímicos de maduración. El cocotero Enano verde de Yucatán (EVY) y el Alto del Pacífico mexicano (APM), son dos cultivares con características contrastantes debido a que el fruto del primero se utiliza principalmente para el consumo de agua, y el segundo para la producción de copra y extracción de aceite (Sudha *et al.*, 2021). Sin embargo, la base molecular y bioquímica de estas diferencias aún no se conoce.

Este estudio tuvo como objetivo investigar la regulación del metabolismo de carbohidratos y ácidos grasos, durante la maduración del fruto de coco para encontrar las proteínas involucradas en estos procesos metabólicos. Utilizando la selección de precursores sincrónicos de etiquetas de masa en tándem (TMT-SPS-MS³), se realizó un análisis proteómico en el endospermo sólido de coco, comparando el endospermo sólido de frutos de coco, inmaduros, intermedios y maduros de los cultivares Enano verde de Yucatán y Alto del Pacífico mexicano

Se identificaron 244 proteínas en el cultivar EVY y 347 en APM, y se encontraron enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos y carbohidratos en ambos cultivares. Las proteínas involucradas en las vías de la glucólisis y del metilglioxal se acumularon al alza en APM, pero se regularon a la baja en EVY. En cuanto al metabolismo de los lípidos, las proteínas se acumularon más en el APM que en el EVY a medida que avanza la

maduración, lo que coincide con el uso del APM destinado principalmente a la transformación industrial debido a su alto contenido de aceite.

Hasta donde sabemos, este es el primer informe proteómico integral que se enfoca en el proceso de maduración de endospermos sólidos de coco de dos variedades contrastantes, lo que contribuye a comprender el metabolismo de los lípidos y carbohidratos en el coco, pero también en otras semillas oleaginosas, que están poco estudiadas en términos de sus procesos de maduración.

3.3. Materiales y métodos

3.3.1. Recolección de material vegetal

Los cocos de los cultivares Enano verde de Yucatán y el Alto del Pacífico mexicano se cosecharon de una plantación ubicada a 20°24'03.95"N y 89°30'56.86"W en San Crisanto, Yucatán, México. La inflorescencia más joven está en la parte superior de la palma, más cerca del meristemo apical, y muestra una espata cerrada (etapa 0, ningún óvulo fertilizado en los ovarios). El cocotero produce una inflorescencia por mes, y los primeros óvulos fertilizados ocurren en la inflorescencia en la etapa 1, por lo que a partir de la etapa 0 de la inflorescencia, la edad de las inflorescencias y los frutos aumenta cada mes en dirección al suelo (Perera *et al.*, 2010; Oropeza *et al.*, 2011). Los estados de madurez de los frutos se clasificaron como inmaduros para frutos de 6 a 8 meses, intermedios para frutos de 9 a 10 meses y maduros para frutos de 11 a 14 meses. Los frutos se desinfestaron con agua destilada estéril, se descascarillaron manualmente, se cortó el endocarpio con cuchillo estéril y se almacenaron 20 g de endospermo sólido a -80°C hasta su posterior procesamiento.

3.3.2. Extracción del proteoma del endospermo sólido de coco

Las proteínas se extrajeron de acuerdo con Islas-Flores *et al.* (1998), con modificaciones. Brevemente, se trituró un gramo (1 g) de endospermo sólido hasta obtener un polvo fino con mortero estéril en nitrógeno líquido y luego se le añadió 1 ml de amortiguador que contenía Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 50 mM, 10 % de glicerol, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, β -mercaptoetanol 5 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM y $\frac{1}{4}$ de píldora de cóctel inhibidor de proteasa (Roche). Después de la homogenización, se centrifugó durante 30 minutos a 13000 rpm y 4°C, y el sobrenadante se almacenó a -20°C hasta su uso. Cada muestra de cada etapa de desarrollo se extrajo individualmente; las réplicas biológicas fueron por triplicado.

3.3.3. Cuantificación y análisis de proteínas por SDS-PAGE

La concentración de proteína en cada sobrenadante se determinó según el método de Bradford, (1976). El análisis de 30 µg de proteínas se realizó en gel SDS-PAGE al 12 % y se sometió a electroforesis a 80 V durante 2 h a temperatura ambiente. Después de la electroforesis, los geles se incubaron toda la noche en solución de azul de Coomassie y se destiñeron en una solución que contenía ácido acético al 10 %, metanol al 25 % y agua destilada estéril.

3.3.4. Preparación de muestras para proteómica

Para cada muestra se precipitaron 1200 µg de proteínas con cloroformo-metanol según Burgos-Canul *et al.* (2019). Cien microgramos (100 µg) de proteínas por muestra se redujeron durante 45 min a 60 °C con Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) 10 mM, se alquilaron con Iodoacetamida (IA) 30 mM durante 1 h a temperatura ambiente y oscuridad, y se redujeron con ditioneitol (DTT) 30 mM. Enseguida, las proteínas se precipitaron toda la noche a -20 °C en acetona fría y se centrifugaron a 10 000 x g durante 15 min a 4 °C. Las pastillas se secaron durante 15 min a temperatura ambiente y las proteínas se suspendieron en 100 µL de tampón de digestión que contenía bicarbonato de trietilamonio (TEAM) 50 mM y dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0.1 %, y se digirieron durante la noche a 37 °C con tripsina. 1:30 (p/p) (Promega, Madison WI, Trypsin Gold, grado espectrometría de masas). Luego, se agregó tripsina recién preparada 1:60 p/p y se incubó durante 4 h a 37 °C, y se detuvo la reacción de digestión a 80 °C (Hernández-Pérez *et al.*, 2019). Los péptidos digeridos con tripsina se desalaron y secaron a temperatura ambiente.

3.3.5. Marcaje de TMT y fraccionamiento de péptidos

Se añadieron etiquetas de masa en tándem (TMT), en este caso TMT-9plex, disuelto en acetonitrilo y se agitaron suavemente. Las muestras de péptidos se resuspendieron en tampón de bicarbonato de trietilamonio (TEAB) 100 mM durante 5 minutos y se conjugaron con la resuspensión de TMT-9plex a temperatura ambiente durante 1 h, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de EVY y APM se etiquetaron y analizaron por separado. Para cada cultivar, los péptidos de coco en estado inmaduro se marcaron con los reactivos 126, 127N, 128N; las proteínas de la etapa intermedia se marcaron con 128C, 129N, 129C, y las proteínas de la etapa madura se marcaron con 130N, 130C, 131. El marcaje de péptidos se detuvo con 5% de hidroxilamina, incubando a temperatura ambiente durante 15 min. Todas las muestras de la misma variedad se combinaron y fraccionaron usando cartuchos C18 de fase reversa de pH alto (Thermo Scientific). Las muestras

mezcladas se desalaron con cartuchos C18, se limpiaron con ZipTip y se deshidrataron en un CentriVap (Labconco Kansas, Missouri).

3.3.6. Nano-LC-MS/MS, selección de precursores sincrónicos SPS-MS³

Las muestras secas se disolvieron con ácido fórmico al 0.1 % en agua grado LC-MS (disolvente A) y se inyectaron 20 µl de esta solución en una plataforma nano-LC (sistema UltiMate 3000 RSLC, Dionex, Sunnyvale, CA) a través de una trampa nanoviper C18 (3 µm, 75 µm x 2 cm, Dionex) y se fraccionó en una columna EASY spray C-18 RSLC (2 µm, 75 µm x 25 cm) a un caudal de 300 nL/min.

El gradiente de la fase móvil fue de 10 min utilizando el solvente A y ácido fórmico al 0.1 % en acetonitrilo al 90 % (solvente B), 10 min solvente A, 7-20 % solvente B durante 25 min, 20 % solvente B durante 15 min, 20-25 % de disolvente B durante 15 min, 25-95 % de disolvente B durante 20 min y 8 min de disolvente A. El nano-LC se unió a un Orbitrap Fusion Tribid (Thermo-Fisher Scientific, San Jose, CA) espectrómetro de masas equipado con una fuente de nanoiones "EASY Spray" (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA). El espectrómetro de masas se hizo funcionar en un modo de ionización positiva con el voltaje de nanopulverización fijado en 3.5 kV y una temperatura de fuente de 280°C. Para la calibración externa se utilizaron cafeína, Met-Arg-Phe-Ala (MRFA) y Ultramark 1621.

Se realizaron escaneos completos de MS en el analizador Orbitrap a una resolución de 120 000 (FWHM), rango de escaneo de 350 a 1500 m/z, AGC de 2.0e5, tiempo máximo de inyección de 50 ms, umbral de intensidad de 5.0e3, exclusión dinámica 1 a los 70 s y tolerancia de masa de 10 ppm. Para el análisis de MS², se aislaron los 20 MS¹ más abundantes con estados de carga establecidos en 27. Los parámetros de fragmentación incluyeron CID con 35 % de energía de colisión y Q de activación de 0,25, AGC de 1,0e4, tiempo máximo de inyección de 50 ms, rango de masa de selección de precursor 400-1200 m/z, ancho de exclusión de iones precursores bajo de 18 m/z y alto de 5 m/z, TMT de pérdida de etiqueta isobárica y espectros de MS³ y iones de detección en trampa se adquirieron utilizando un aislamiento SPS de 10 muescas. Los precursores de MS³ se fragmentaron mediante HCD con un 65 % de energía de colisión y se analizaron con Orbitrap a una resolución de 60 000 con un rango de escaneo de 120-500 m/z, una ventana de aislamiento de 2 m/z, AGC 1.0e5 y un tiempo de inyección máximo de 120 ms con 1 microescaneo.

Los espectros adquiridos por MS/MS y (SPS)-MS³ se analizaron con el programa Proteome Discoverer 2.3 (Thermo Fisher Scientific Inc.). Los datos se procesaron mediante los motores de búsqueda Amanda, Mascot server (versión 2.4.1, Matrix Science, Boston, MA)

y el algoritmo Sequest HT; las búsquedas se realizaron contra las secuencias de proteínas de *Arabidopsis* y las de la familia Arecaceae descargadas de la base de datos del Centro Nacional de Investigación Biotecnológica (NCBI). Las secuencias se concatenaron en un solo archivo y se filtraron para eliminar los aminoácidos no determinados. Para reducir la redundancia de proteínas, las secuencias se colapsaron con el programa CDHIT (Li y Godzik, 2006) usando 0.98, 5, 0 para los parámetros -c, -n, -t, respectivamente. Se consideraron la especificidad de la proteasa trípica completa, dos escisiones perdidas, la carbamidometilación de la cisteína (+57.021 Da) y los residuos de TMT 9-plex N-terminal/lisina (+229.163 Da). La oxidación de metionina (+15.995 Da) y la desamidación en asparagina/glutamina (+0.984 Da) también se consideraron como modificaciones dinámicas.

La identificación de proteínas se llevó a cabo a menor resolución en la trampa lineal de iones con tolerancias de ± 10 ppm y $\pm 0,6$ Da. Los aciertos de péptidos se filtraron para un máximo del 1 % de tasa falsa de descubrimiento (FDR) utilizando el algoritmo Percolator (Käll *et al.*, 2007). Además, la cuantificación de TMT se realizó al nivel de MS³ en el analizador Orbitrap con el filtro de coaislamiento de precursores ajustado al 45%. Los datos están disponibles a través de ProteomeXchange con el identificador PXD036949 (<https://www.ebi.ac.uk/pride/>).

3.3.7. Análisis bioinformáticos

La abundancia de proteínas y péptidos se generó en la plataforma Proteome Discoverer 2.4. La normalización se llevó a cabo en base a la cantidad total de péptidos. El cambio de veces de la abundancia de proteínas se determinó en la relación Int/Inm, Mad/Inm y Mad/Int. Las proteínas diferenciales [\log_2 fold change (\log_2 FC) $> 1,5$ y $< 0,66$ (\log_2 FC $> 0,59$ y $< -0,59$)] se analizaron en función del enriquecimiento de ontología de genes de procesos biológicos (GO) utilizando la plataforma DAVID Bioinformatics Resources 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>) y los términos GO resultantes luego se resumieron al encontrar un subconjunto representativo con un algoritmo de agrupamiento simple que se basa en medidas de similitud semántica utilizando el software REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>). Utilizamos homólogos de proteínas de *Arabidopsis*, *E. guineensis* y *P. dactylifera* como bases de datos de referencia. Los datos de salida se presentaron utilizando Treemaps, que muestran una jerarquía de dos niveles de términos GO: cada rectángulo es un representante de un solo grupo y los representantes se unieron en "supergrupos" de términos relacionados. Se calcularon las abundancias de proteínas normalizadas basadas en ACP para visualizar las diferencias en las abundancias de

proteínas entre las condiciones. Las relaciones Log₂ FC Int/Inm, Mad/Inm y Mad/Int, valores significativos (*P value* -log₁₀) y una distancia Manhattan para un criterio de rastrillado de aciertos en la plataforma VolcanoR (<https://huygens.science.uva.nl/VolcanoR2/>) fueron calculados. Se utilizó la base de datos de rutas metabólicas de plantas (<https://plantcyc.org/>) y las muestras se calcularon utilizando la herramienta de visión general de células/visualizador ómico para generar diagramas de vías e intensidades de acumulación de proteínas basadas en las relaciones Int/Inm, Mad/Inm y Mad/Int.

3.4. RESULTADOS

3.4.1. Parámetros fisiológicos y fisicoquímicos del fruto del coco

Este estudio abarcó tres etapas de maduración del coco, inmaduras, intermedias y maduras de los cultivares Enano verde de Yucatán (EVY) y Alto del Pacífico mexicano (APM) (Figura 9 A, B). En ambos cultivares, las principales características morfológicas de los frutos de coco durante la maduración estuvieron asociadas al cambio de color y peso. En la etapa inmadura, los frutos son de color verde, en la etapa intermedia, verde amarillento y de color marrón pálido en la etapa madura. Las modificaciones de color estuvieron acompañadas de una reducción drástica de agua, lo que refleja el secado drástico del mesocarpio-exocarpio, la disminución en el volumen de agua de coco y la pérdida de peso en frutos maduros (Figura 19 A, B).

Ambos cultivares exhibieron características morfológicas similares durante la maduración del endospermo sólido (Figura 19 A, B). El endospermo sólido inmaduro fue gelatinoso y ligeramente transparente a blanquecino. En la etapa intermedia, el endospermo es más grueso y más duro que en la fruta inmadura. En la etapa madura, el endospermo sólido es blanco, más grueso y más duro que en las etapas anteriores (Figura 19 A, B).

Se observaron perfiles de proteínas en geles de 12% SDS-PAGE para cada uno de los diferentes estadios de madurez, de ambos cultivares, con pesos moleculares entre 17 a 199 kDa. Cuatro polipéptidos principales con pesos moleculares de 46, 33, 24,8 y 17 kDa estuvieron presentes en todas las etapas de ambos cultivares, pero también se observaron diferencias particulares. Un polipéptido de 30.7 kDa estuvo presente en las tres etapas de maduración en el cultivar EVY, mientras que solo se observó en el estado inmaduro del cultivar APM. Un polipéptido de 20.7 kDa fue más abundante en la etapa madura en el cultivar EVY (Figura 19 C). El análisis proteómico permitió la identificación de 244 y 347 proteínas en los cultivares EVY y APM, respectivamente (Figura 19 D, E). Ambos cultivares compartieron 155 proteínas, mientras que 89 proteínas fueron exclusivas del EVY y 192 fueron exclusivas del cultivar APM (Figura 19 E).

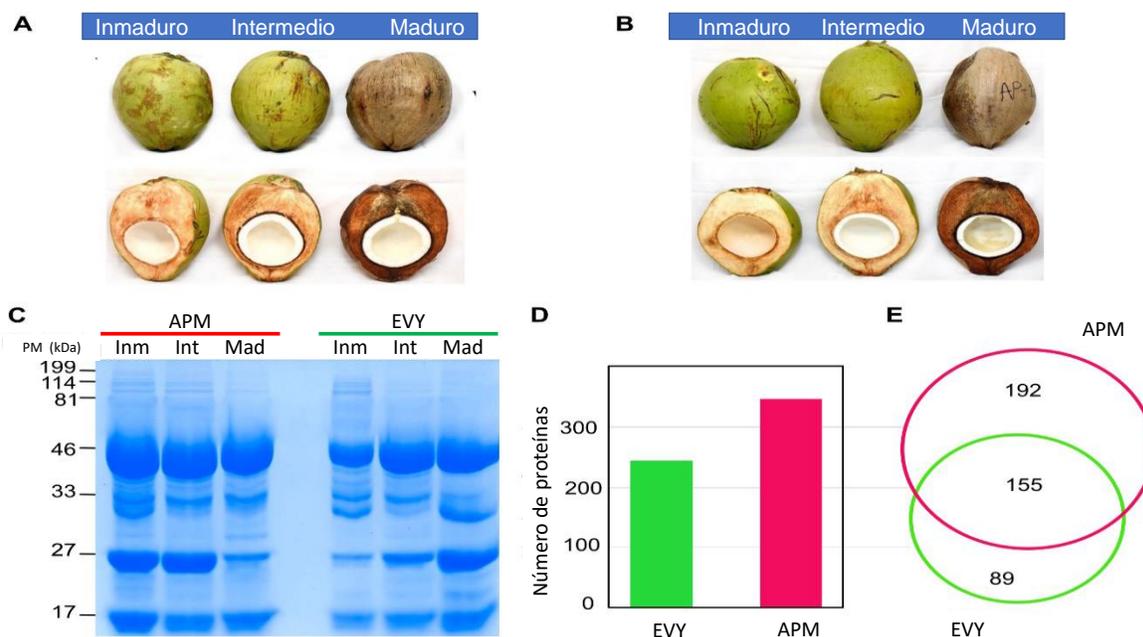


Figura 19. Maduración del coco y proteínas identificadas en los cultivares Enano verde de Yucatán (EVY) y Alto del Pacífico mexicano (APM). Cambios visuales de la maduración de frutos EVY (A) y APM (B). Perfil de proteína del endospermo sólido durante la maduración del EVY y APM en SDS-PAGE (C), el estándar de peso molecular de la proteína se indica en el lado izquierdo de la Figura. Número de proteínas identificadas por TMT-SPS-MS3 en EVY y APM (D). Representación proporcional en diagrama de Venn de las proteínas identificadas en cada variedad (E). (Félix *et al.*, 2023)

3.4.2. Panorama del proteoma del endospermo sólido de coco durante la maduración

Los grupos centrales de los cultivares APM y EVY se visualizaron en TreeMap para analizar las rutas metabólicas enriquecidas. El proceso glucolítico, incluido el metabolismo del malato, el plegamiento de proteínas, la proteína catalítica independiente de la ubiquitina, proteosoma junto con la respuesta al estrés, fueron los principales procesos biológicos enriquecidos en ambos cultivares (Figura 20 A, B, C). Además, el cultivar EVY exhibió un enriquecimiento de la biosíntesis de ácidos grasos, el replegamiento de proteínas y el desarrollo del embrión que terminó en la latencia de la semilla (Figura 20 B). La acumulación en APM se asoció particularmente con procesos biológicos como el ciclo del ácido tricarbóxico, el ciclo del glioxilato, el metabolismo del citrato y el malato, la interconversión del tetrahidrofolato, la biosíntesis de la clorofila, la fotosíntesis, la organización del citoesqueleto y el transporte de proteínas (Figura 20 C).

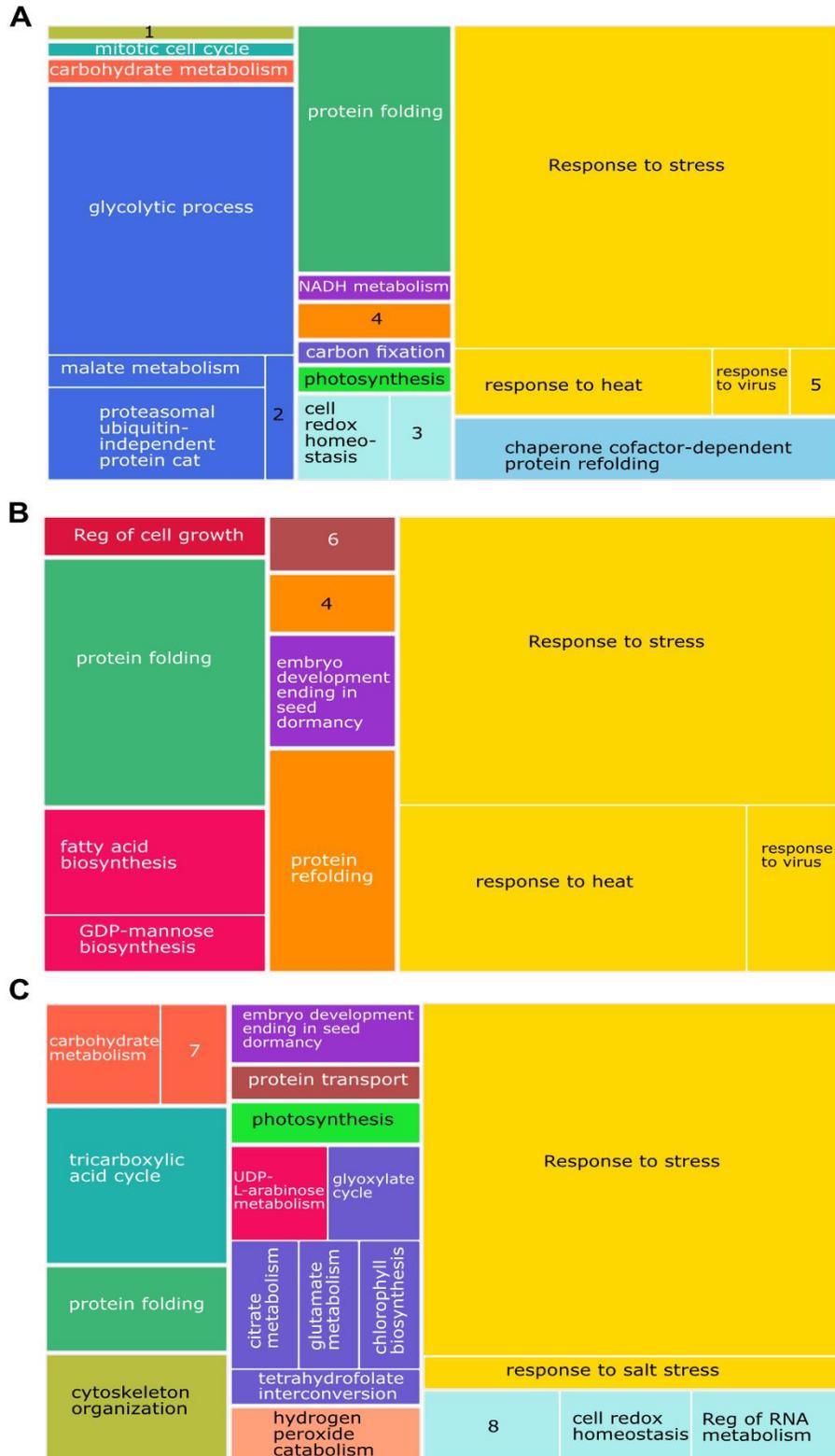


Figura 20. Enriquecimiento de los procesos biológicos encontrados en el endospermo sólido de coco visualizados como TreMap. Proteínas compartidas entre ambos cultivares (proteoma

central, **A**). Proteínas únicas identificadas en los cultivares EVY (**B**) y APM (**C**). Cada cuadro representa el peso del valor p dentro del diagrama de árbol. Los componentes (recuadros) del mismo color representan similitud semántica (similitud media permitida, 0,7). Los procesos biológicos más enriquecidos se muestran como componentes más grandes dentro del mapa. 1, organización del citoesqueleto de microtúbulos; 2, Metabolismo de la fructosa 1,6-bisfosfato; 3, Regulación de fusión no autofágica de vacuolas; 4, proceso basado en microtúbulos; 5, respuesta a la sustancia que contiene arsénico; 6, transporte retrógrado mediado por vesículas del, aparato de Golgi al retículo endoplásmico; 7, metabolismo de derivados de carbohidratos; 8, regulación negativa de la respuesta a la privación de agua. (Félix *et al.*, 2023)

3.4.3. Dinámica del proteoma del endospermo sólido de coco durante la maduración

La abundancia de la proteína normalizada de las réplicas biológicas de los estadios inmaduros, intermedios y maduros de los dos cultivares de coco se analizó mediante análisis de componentes principales (ACP). Las réplicas biológicas en estudio se agruparon según cada etapa de maduración y cultivar (Figura 21 A, E). En el cultivar EVY, la varianza acumulada de CP1 (59,8%) y CP2 (25,7%) permitió explicar hasta el 85,5% de la variación entre los estados de maduración analizados (Figura 21 A); en el APM, la varianza acumulada de CP1 (72,1%) y CP2 (18,4%), permitió explicar hasta el 90,5% de la variación (Figura 21 E). Se realizó un ACP adicional para comparar entre los dos cultivares y sus estadios de madurez; los ACP muestran diferencias entre los cultivares y entre sus diferentes etapas de maduración.

De acuerdo con el log₂-fold change (log₂ FC), se encontraron un total de 225 proteínas acumuladas diferencialmente (PAD) en EVY, mientras que se encontraron 251 en APM. Al comparar la proporción Mad/Int en EVY, las proteínas de la familia putativa FAM10, ANXD1, EF1B1 se regularon a la baja, mientras que ALAT2, EDA2, GEP148 se acumularon al alza. Al comparar Mad/Inm y Mad/Int en EVY, las proteínas HSP90-4, BCCP, TCPQ, DIS3, LPD2, PFK6 y ALAT2 se regularon a la baja en la etapa madura, mientras que proteínas como Enod1, AGAL2, GEA6, SCII-3 se acumularon al alza (Figura 21 B, C, D). En el cultivar APM, SUS4, SPD6 se regularon a la baja en las etapas intermedia y madura, mientras que la proteína GbG aumentó durante la maduración y finalmente LEA se acumuló en las etapas tardías (Figura 21 F, G, H).

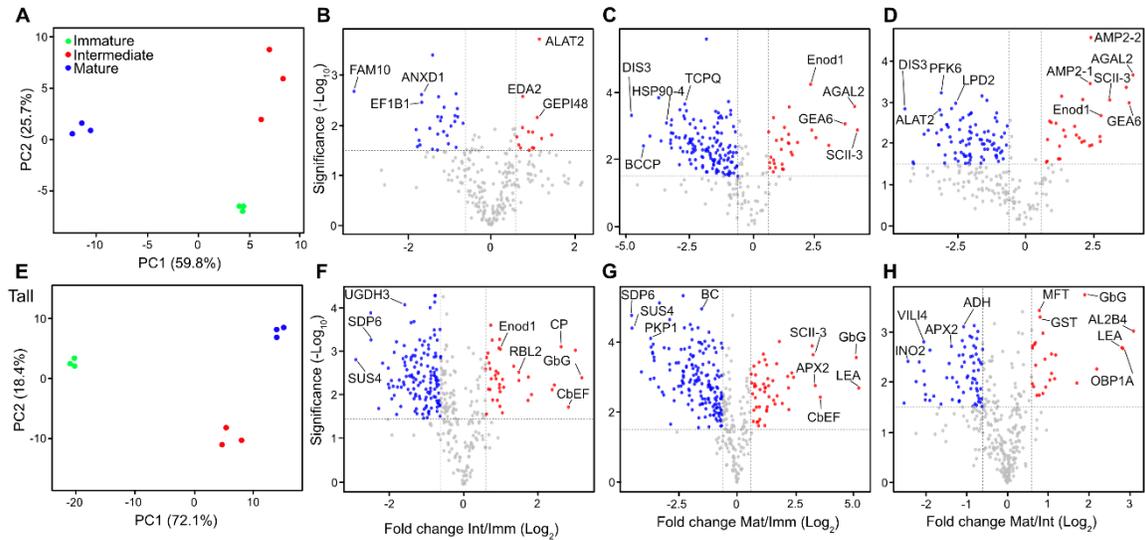


Figura 21. Análisis proteómicos comparativos durante la maduración del endospermo sólido.

Análisis de componentes principales (ACP) de la abundancia de proteínas de EVY (A). Proteínas diferenciales acumuladas significativamente están representadas en gráficos de volcanes en las relaciones Log₂ intermedias/inmaduras (B), maduras/inmaduras (C) maduras/intermedias (D). ACP de la abundancia de proteínas de APM (E). Las proteínas significativas acumuladas diferencialmente se representan como en F, G y H. El eje x corresponde al valor de log₂ FC, y el eje y muestra el P value-log₁₀. Los puntos en azul representan las proteínas reguladas hacia abajo (< 1/1,5 cambio de veces, FC) y los puntos en rojo representan las proteínas acumuladas al alza (≥ 1,5 FC). Alanina aminotransferasa 2 (ALAT2), L-ascorbato peroxidasa 2 (APX2), alfa-galactosidasa 2 (AGAL2), anexina D1 (ANXD1), aldehído deshidrogenasa familia 2 miembro B4 (AL2B4), biotina carboxilasa (BC), EF de unión a calcio -proteína de la familia de la mano (CbEF), carboxipeptidasa (CP), factor de elongación 1-beta 1 (EF1B1), factor de elongación putativo 1-alfa (EF1A4), proteína 1 similar a la nodulina temprana (Enod1), proteína similar a Em (GEA6), Dihidrolipoil deshidrogenasa 2 (LPD2), Inositol-3-fosfato sintasa isoenzima 2 (INO2), Probable fructocinasa-6 (PFK6), Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (SDP6), Proteína de choque térmico 90-4 (HSP90-4), Proteína de la familia de glutatión S-transferasa (GST), exonucleasa 2 similar a DIS3 putativa, UDP-glucosa 4-epimerasa (GEPI48), proteína de la familia FAM10 putativa, proteína similar a glucano endo-1,3-beta-glucosidasa (GbG), proteína similar a RHOMBOID 2 (RBL2), proteína abundante de embriogénesis tardía (LEA) de 11 kDa, exonucleasa 2 similar a DIS3 putativa, proteína MADRE de FT y TFL1 (MFT), proteína 1A asociada al cuerpo oleoso (OBP1A), proteína del complejo T 1 subunidad theta (TCPQ), piruvato cinasa 2 de plastidio (PKP1), piruvato cinasa de plastidio 2 (PKP1), sacarosa sintasa 4 (SUS4), serina carboxipeptidasa II-3 (SCII-3), supuesta serina proteasa (EDA2), UDP-glucosa 6-deshidrogenasa 3 (UGDH3), péptidos antimicrobianos similares a vicilina 2-2 (AMP2-2), Villin-4 (VILI4). (Félix *et al.*, 2023)

3.4.4. Desintoxicación de las vías de ROS y metilglioxal en cultivares APM y EVY

La desintoxicación de ROS fue más activa en APM que en EVY. Las proteínas como la superóxido dismutasa y la catalasa se acumularon significativamente en la etapa intermedia y tardía de la maduración de APM (Figura 22). Además, la glutatión S-transferasa DHAR2 perteneciente al ciclo del glutatión/ ascorbato, siguió una tendencia similar. Proteínas como la metilglioxal reductasa y la lactoilglutatión liasa, así como la L-ascorbato peroxidasa, involucradas en el ciclo del glutatión/ ascorbato, también tuvieron acumulación al alza en las dos últimas etapas de maduración en APM en comparación con EVY; evidenciando así la activación de las vías de degradación del metilglioxal I y III en el cultivar APM (Figura 22).

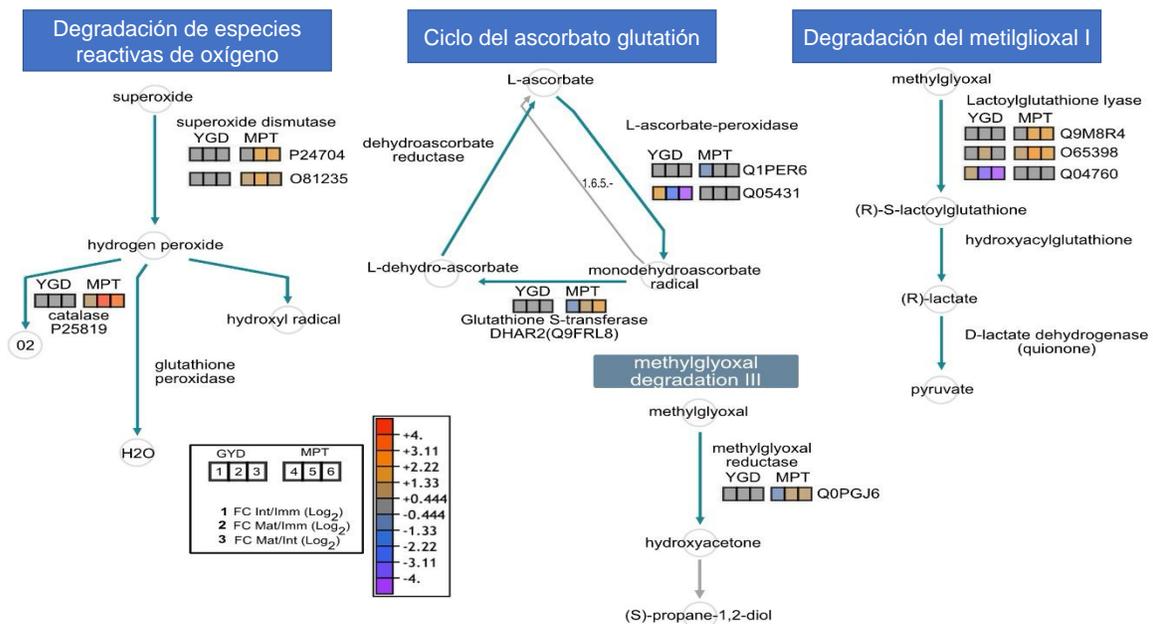


Figura 22. Representación visual de las proteínas diferenciales asociadas con enzimas relacionadas con especies reactivas de oxígeno (ROS) y vías de desintoxicación del metilglioxal en los cultivares EVY y APM. La reconstrucción de la ruta se llevó a cabo utilizando la herramienta de "resumen celular" en la plataforma de base de datos Plant Metabolic Network (PMN). (Félix *et al.*, 2023)

3.4.5. PADs involucradas en el metabolismo de carbohidratos en los cultivares EVY y APM

3.4.5.1. Glucólisis y gluconeogénesis

Las proteínas involucradas en la síntesis de acetaldehído fueron reguladas a la baja en los frutos inmaduros e intermedios en comparación con los frutos maduros de EVY, mientras que las proteínas involucradas en la gluconeogénesis y la síntesis de glucano, almidón,

sacarosa y nucleótidos de azúcar se acumularon ligeramente en el EVY inmaduro; sin embargo, estas proteínas fueron reguladas a la baja en frutos intermedios y maduros en comparación con frutos EVY inmaduros (Figura 23 A). En el caso del cultivar APM, las proteínas involucradas en la gluconeogénesis y la síntesis de glucano, glucógeno, almidón y sacarosa fueron reguladas a la baja en la etapa inmadura en comparación con frutos intermedios y maduros; solo las proteínas involucradas en la síntesis de acetaldehído mostraron una ligera acumulación en todas las etapas analizadas de frutos de APM, en comparación con frutos de EVY. Las proteínas involucradas en la gluconeogénesis, la síntesis de glucano, almidón, sacarosa y la síntesis de nucleótidos de azúcar aparecieron acumuladas en las etapas intermedia y madura del cultivar APM (Figura 23 A).

El análisis de las proteínas involucradas en la vía de la gluconeogénesis, mostró que la malato deshidrogenasa, 2,3-bisfosfoglicerato independiente, fosfoglicerato cinasa, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, fructosa bisfosfato aldolasa y glucosa 6 fosfato isomerasa, fueron reguladas a la baja en la etapa intermedia y madura del coco EVY (Figura 23 B). En el caso del cultivar MPT, todas estas proteínas iniciaron con baja cantidad en la etapa inmadura y aumentaron en las etapas intermedia y madura (Figura 23 B). La fosfoglicerato cinasa y la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa mostraron la mayor acumulación entre las proteínas involucradas en la vía de la gluconeogénesis en el coco APM, la primera en las etapas intermedia y madura y la última en la etapa intermedia, respectivamente (Figura 23 B).

El análisis de la vía de la glucólisis determinó una regulación descendente de 6-fosfofructocinasa, difosfato:fructosa-6-fosfato 1-fosfotransferasa, glucosa 6-fosfato isomerasa, triosa-fosfato isomerasa, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, fosfoglicerato mutasa independiente de 2,3-bisfosfoglicerato, fosfoglicerato cinasa, enolasa, fructosa bisfosfato aldolasa, piruvato cinasa, en el estadio maduro de EVY; todas las proteínas mostraron una disminución en la etapa madura en la glucólisis I, II o IV (Figura 23 C). En contraste, la triosa-fosfato isomerasa duplicó su cantidad en la etapa madura (Figura 23 B, C).

Con respecto a la glucólisis, en el cultivar APM, la mayoría de las enzimas glucolíticas aumentaron a medida que avanzó la maduración. La proteína 6-fosfofructocinasa, aumentó moderadamente en la etapa intermedia en comparación con la etapa inmadura y duplicó su cantidad en la etapa madura (Figura 23 C). En el caso de la difosfato:fructosa-6-fosfato 1-fosfotransferasa involucrada en la glucólisis IV, comenzó con un nivel bajo en la etapa inmadura, pero luego aumenta durante las etapas intermedia y madura. Asimismo, en EVY,

las proteínas que aumentan durante la progresión de la madurez son la triosa-fosfato isomerasa, la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, la fosfoglicerato mutasa independiente de 2,3-bisfosfoglicerato, la enolasa, la piruvato cinasa, la fosfoglicerato cinasa y la fructosa bisfosfato aldolasa, todas ellas comienzan con cantidades bajas en la etapa inmadura y luego aumentan en etapas intermedias y maduras, eventualmente duplicando la cantidad de proteína inicial (Figura 23 C). En resumen, la glucólisis I, II y IV fue más activa en las etapas intermedia y madura en el cultivar APM que en EVY.

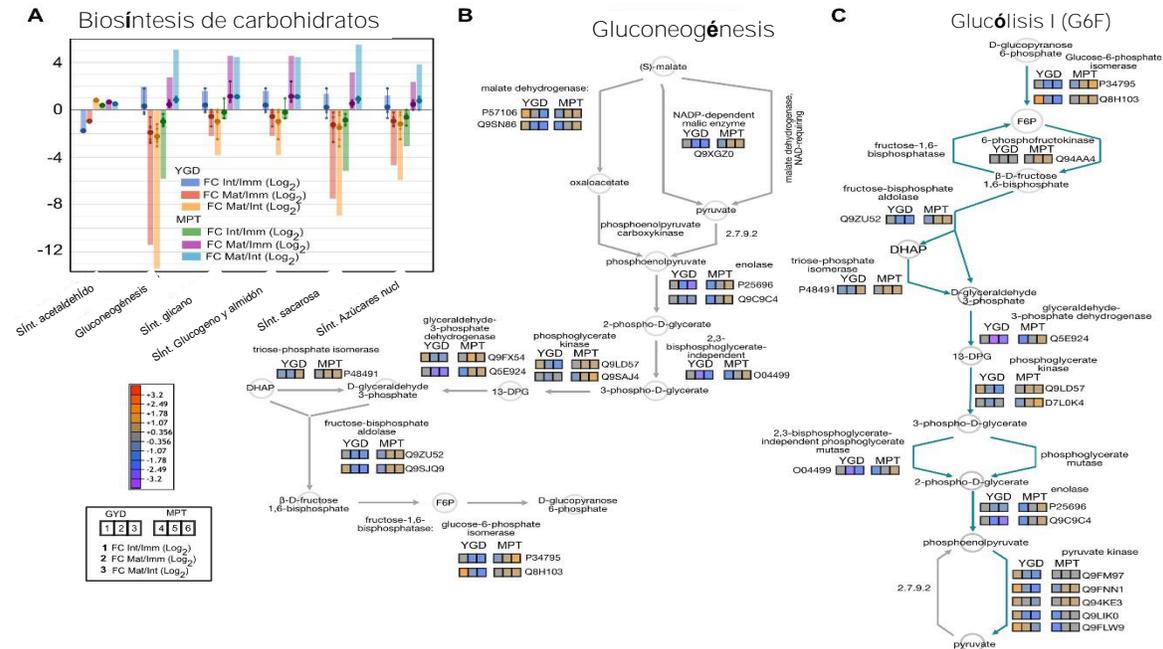


Figura 23. Representación visual de proteínas diferenciales asociadas a las principales rutas biosintéticas de carbohidratos. Patrón de acumulación de proteínas relacionadas con carbohidratos determinado por TMT-SPS-MS3. Los círculos pequeños indican los valores de log₂ FC de cada proteína; los círculos grandes son el promedio de los valores del log₂FC y las columnas indican la suma del log₂FC (A). Dinámica de las enzimas diferenciales identificadas en la gluconeogénesis I (B) y la glucólisis I (a partir de glucosa 6-fosfato) (C). La reconstrucción de la ruta se llevó a cabo mediante el uso de la herramienta de "resumen celular" en la plataforma de base de datos Plant Metabolic Network (PMN). (Félix *et al.*, 2023)

3.4.5.2. El ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT)

En EVY, las proteínas involucradas en el CAT (variación V), es decir, la citrato sintasa, citrato hidrolasa [formadora de cis-aconitato], la cis-aconitato hidratasa, succinato:quinona-oxidoreductasa y la malato deshidrogenasa no mostraron cambios en su abundancia durante la maduración del endospermo sólido (Figura 14 A, B). Por el contrario, la succinil-CoA sintetasa disminuyó desde la etapa inmadura a la madura, independientemente de si

estaba presente el CAT tipo V o II. En cuanto a la malato deshidrogenasa esta mostró una acumulación descendente en las etapas intermedia y madura en comparación con la etapa inmadura (Figura 24 A, B).

Cuando se analizaron las proteínas en el CAT en el endospermo del APM, se encontró que la citrato sintasa, la citrato hidrolasa (formadora de cis-aconitato), la cis-aconitato hidratasa eran inicialmente bajas en el estadio inmaduro, y luego aumentaron en el estadio intermedio y en el estadio maduro (Figura 24 A, B), mientras que la cantidad de succinato:quinona-oxidoreductasa se mantuvo estable durante todo el proceso de madurez, similar a lo observado en EVY. Algunas enzimas, por ejemplo, la malato deshidrogenasa, estuvieron activas solo en la etapa inmadura de EVY. En el caso de la citrato sintasa, ésta se acumuló en las etapas intermedia y madura del endospermo del coco APM.

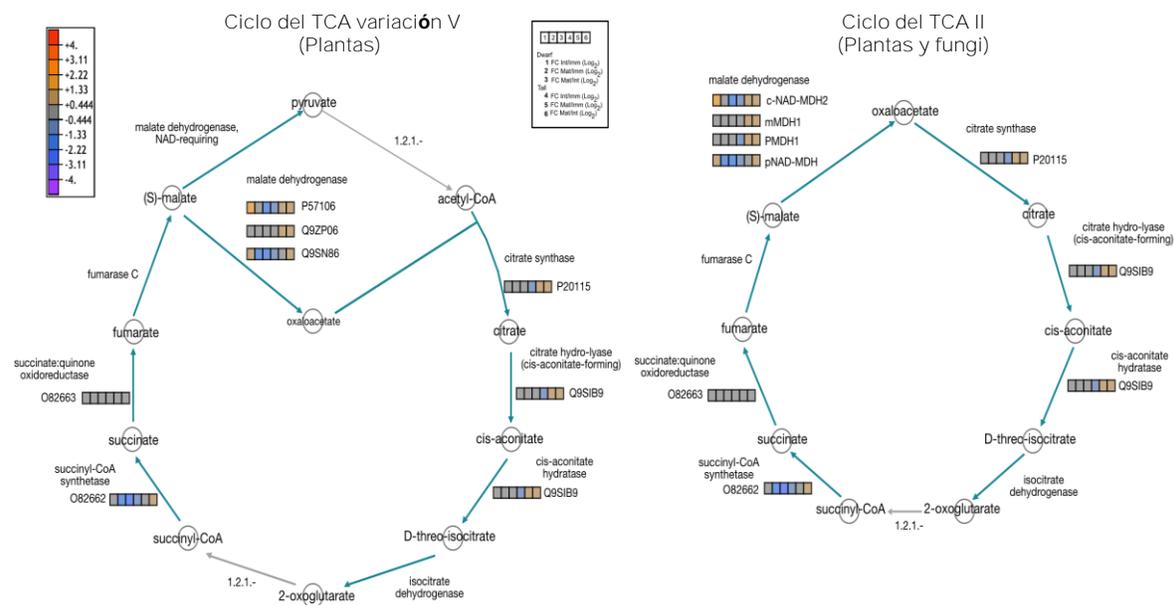


Figura 24. Representación visual de proteínas diferenciales asociadas al CAT. Dinámica de enzimas diferenciales identificadas en el CAT V (plantas, **A**) y II (plantas y hongos, **B**). (Félix *et al.*, 2023)

3.4.6. PADs involucradas en el metabolismo de los lípidos en los cultivares APM y EVY

Las proteínas acumuladas diferencialmente (PAD) involucradas en la iniciación de ácidos grasos fueron acumuladas al alza en la etapa inmadura del coco EVY mientras que fueron reguladas a la baja en las etapas intermedia y madura; las proteínas involucradas en la elongación de ácidos grasos y la síntesis de palmitato y estearato se acumularon en etapas

palmitato (**B**), y elongación de ácidos grasos saturados (**C**). La reconstrucción de la ruta se realizó mediante la herramienta de "resumen celular" en la base de datos de la plataforma Plant Metabolic Network (PMN). (Félix *et al.*, 2023)

3.4.7. Otras proteínas

Algunas proteínas fueron compartidas entre los dos cultivares y los tres estadios de maduración, de tal manera que mostraron comportamientos similares, tales como las proteínas embrionarias DC-8 (A0A8B8ZT31), péptidos antimicrobianos similares a vicilina 2-2 (A0A8B7BEE0), proteína de almacenamiento de semilla similar a vicilina (A0A8B7BPL4), factor de elongación 2 (AT1G56070), cadena alfa de tubulina (AT4G14960), cadena beta de tubulina (AT5G12250), proteína de choque térmico 83 (AT5G52640) y proteína abundante en embriogénesis tardía similar a 31 (A0A8B7CDB9), cuya acumulación aumentó durante la maduración de ambos cultivares.

Las PAD exclusivas encontradas en el cultivar EVY incluyeron una proteína putativa tipo hemo del citocromo c1-1 mitocondrial (AT5G40810), la ribonucleasa TUDOR 1 (AT5G07350), la subunidad alfa-1 del coatómero (AT1G62020), la proteína de unión ERBB-3 1 (AT3G51800), la adenilato cinasa 4 (AT5G50370) y la proteína hipotética COCNU_10G003830 (AT3G20050), que se acumularon a lo largo de maduración. Por el contrario, las PAD, como la actina-101 (AT5G09810), la enzima de choque térmico mitocondrial putativa de 70 kDa (AT5G09590), la subunidad alfa del proteasoma tipo 5 (AT3G14290), la formato deshidrogenasa mitocondrial putativa (AT5G14780), la aminotransferasa ALD1 (AT4G33680), la serina/treonina-proteína cinasa SAPK7 (AT1G10940) y la glutatión S-transferasa 3 (A0A8B7C1W8), aumentaron en la etapa intermedia pero disminuyeron en la etapa madura.

En el cultivar APM, las PAD incluyeron proteínas de unión a poliadenilato 5 (A0A8B7MTK7), acetilornitina desacetilasa (AT4G17830), isopentenil-difosfato delta-isomerasa I putativa (AT5G16440), gamma-aminobutirato transaminasa mitocondrial 1 (AT3G22200), actina-101 (AT5G09810), regulador de respuesta de dos componentes 24 (A0A8B7D411), que se acumularon durante la maduración. Por el contrario, las PAD como la proteína hipotética COCNU_08G003720 (AT3G01650), la proteína putativa de 65 kDa inducida por baja temperatura (A0A8B7C9J1), el coatómero beta⁻¹ putativo (AT1G79990), la proteína 7 que interactúa con FT (AT3G57880), la proteína putativa de maduración de semillas (AT3G10960), la proteína similar a la monocobre oxidasa SKU5 (AT4G12420) y la cinamoil-CoA reductasa 1 (AT2G33590) se acumularon al alza durante todo el proceso de maduración.

3.5. Discusión

Los cambios metabólicos vinculados a procesos fisiológicos, bioquímicos y moleculares asociados a la madurez de semillas y frutos están influenciados por señales endógenas y externas (Corpas y Palma, 2018). Los cambios incluyen modificaciones de la pared celular, acumulación y degradación de almidón y triacilgliceroles (TAGs), entre otros (Zhang *et al.*, 2017). Por otro lado, el color, la dureza/ablandamiento, el contenido de azúcar, se utilizan para monitorear el desarrollo y madurez de los frutos (Williams y Benkeblia, 2018). La mayoría de los estudios clasifican la madurez de los frutos en tres etapas principales; inmaduro, intermedio y maduro, como en *Persea americana* Mill. (Juárez-Escobar *et al.*, 2021), o desarrollo de endospermo, desarrollo de embriones, deshidratación y maduración de semillas como en *Brassica napus* L. (Zhou *et al.*, 2022).

La maduración de la semilla de coco ocurre en tres etapas; inmaduro, intermedio y maduro (Zheng *et al.*, 2019). Sin embargo, la maduración de la fruta del coco no sigue el mismo patrón que las demás frutas; el endospermo comienza a desarrollarse en el extremo opuesto al pedúnculo y al embrión; crece durante la maduración y aumenta la cantidad de diferentes proteínas en el endospermo sólido (Jackson *et al.*, 2004). En la etapa inmadura, el endospermo tiene una consistencia blanda y se endurece a medida que madura; el fruto pierde agua. En este estudio se compararon los cultivares de coco EVY y APM; el APM era más pesado y contenía un endospermo sólido más grueso que EVY. Según Farooq *et al.* (2021), el desarrollo del endospermo requiere grandes cantidades de energía, la cual proviene principalmente de la glucólisis.

La regulación del metabolismo de los ácidos grasos y los carbohidratos en el desarrollo del endospermo de las semillas oleaginosas es menos conocido que en las leguminosas (Reynolds *et al.*, 2019). En este trabajo, el análisis de enriquecimiento de los procesos biológicos identificó a la respuesta al estrés, particularmente al calor y virus, como el proteoma central más representado en los cultivares EVY y MPT. La identificación de respuestas al estrés entre los procesos biológicos enriquecidos es consistente con el hecho de que la palma de coco crece cerca de las áreas costeras, donde la radiación solar y el calor son altos (Nair, 2021).

La proteómica mostró diferencias metabólicas entre ambos cultivares. Con respecto al metabolismo de los carbohidratos, la glucólisis fue más activa en APM que en EVY. El aumento del flujo glucolítico da como resultado la acumulación de metilglioxal, un subproducto tóxico de la glucólisis (Allaman *et al.*, 2015). Esto explica porque la lactoilglutatio liasa y la metilglioxal reductasa, proteínas involucradas en la desintoxicación

del metilglioxal, se acumularon en exceso con el progreso de la maduración en coco APM, mientras que estas enzimas se mantuvieron estables en EVY. La acumulación de metilglioxal se correlaciona en muchas plantas con estrés oxidativo intracelular (Hoque *et al.*, 2016; Kalapos, 2008).

El ACP agrupó claramente las réplicas de los frutos inmaduros, intermedios y maduros de cada cultivar de coco, lo que apoyó la reproducibilidad de la recolección, el procesamiento y el análisis de la muestra. Los gráficos de volcanes permitieron analizar el Log 2FC y su importancia en la acumulación de proteína en Int/Inm, Mad/Inm y Mad/Int en los cultivares EVY y APM. En la etapa intermedia de EVY, fueron reguladas a la baja las proteínas involucradas en la actividad de replegamiento de chaperonas (FAM10), así como anexina D1 (ANXD1), una proteína unida a la membrana involucrada en la reducción del estrés oxidativo (Mortimer *et al.*, 2008), lo que sugiere que la transición de la etapa inmadura a la intermedia en este cultivar es un paso con baja actividad proteolítica y estrés oxidativo. Asimismo, en la etapa madura en comparación con la etapa inmadura, TCPQ, una subunidad de chaperonas que ayudan al correcto plegamiento de las proteínas nacientes (Zhao *et al.*, 2017), y HSP904, otra chaperona molecular que juega un papel contra diversos tipos de estrés (Lin *et al.*, 2018), fueron reguladas a la baja. Por lo tanto, la transición a la madurez en EVY se produjo con un estrés oxidativo bajo y, lo que es más importante, se asoció estrechamente con una disminución de las proteínas involucradas en la biosíntesis de lípidos.

En la etapa madura en comparación con la etapa intermedia en el cultivar EVY, se encontró que la madurez también está asociada a una disminución de las proteínas relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos, por ejemplo, la fosfo-fructocinasa-6 (PFK6) y la dihidrolipoil deshidrogenasa 2 (LPD2), coincidiendo con la disminución de proteínas involucradas en la gluconeogénesis, en la síntesis de glicanos, sacarosa y almidón, entre otras.

En el caso del cultivar MPT, la transición de la etapa inmadura a la etapa intermedia se asoció con la acumulación de proteínas involucradas en el desarrollo, por ejemplo, la familia de proteínas tipo EF-hand que se unen al calcio (CbEF), que es un interruptor que regula la transducción de señales por Ca^{2+} , y controla el crecimiento celular y el desarrollo de las plantas (Kundu *et al.*, 2022).

Las proteínas que más se acumularon en la etapa intermedia en comparación con la etapa inmadura en APM fueron la UDP-glucosa 6-deshidrogenasa 3 (UGDH3) y la sacarosa síntasa 4 (SUS4) estando la primera involucrada en la síntesis de hemicelulosa para la

síntesis de la pared celular vegetal (Jia *et al.*, 2021) y este último cataliza la escisión reversible de la sacarosa en fructosa y UDP-glucosa o ADP-glucosa, que podría canalizarse hacia la producción de energía o la síntesis de la pared celular (Stein y Granot, 2019). En APM, la diferenciación del endospermo sólido inmaduro a intermedio se acompaña de una disminución en la biosíntesis de hemicelulosa, lo que podría impedir el fortalecimiento de la pared celular, facilitando así la expansión celular.

En cuanto a APX2, ésta destoxifica el H₂O₂ en situaciones de estrés biótico y abiótico (Wu y Wang, 2019). APX2 se acumuló a la baja en la etapa madura, mientras que la glutatión S-transferasa (GST) se acumuló al alza (Figura 2.3 H), lo que demuestra que las proteínas antioxidantes están coordinadas en el endospermo del APM, para hacer frente a diferentes tipos de estrés. El suministro primario de mio-inositol es más necesario en la etapa intermedia que en la etapa madura ya que la proteína INO2 se acumuló en la última etapa. Esto concuerda con los reportes en *Arabidopsis thaliana* y *Glycine max*, donde la enzima INO2 es necesaria para el desarrollo normal del endospermo y el embrión (Abid *et al.*, 2009).

Los cultivares de coco EVY y APM también mostraron diferencias en la gluconeogénesis. Durante la gluconeogénesis y el ciclo de Calvin-Benson, las actividades fotosintéticas de las isoenzimas 1 y 3 de la fosfoglicerato cinasa fueron reguladas a la baja en el cultivar EVY; tal vez la disminución de la actividad fotosintética y la glucólisis sea una estrategia de ajuste metabólico para optimizar el crecimiento de la planta o del fruto (Rosa-Téllez *et al.*, 2018). Yang *et al.* (2020), reportaron que la mayoría de las PAD se asociaron con el metabolismo de los carbohidratos en otras variedades de coco en respuesta a la baja temperatura. En *Camellia oleifera*, Ye *et al.* (2021) encontraron que los metabolismos de carbohidratos y lípidos estaban entre las PAD, pero cada metabolismo integraba los resultados de todas las etapas, por lo que la dinámica de las PAD entre estas dos plantas no se puede comparar etapa por etapa.

La enolasa cataliza la conversión de 2-fosfoglicerato en fosfoenolpiruvato (PEP), un paso importante en todas las clases de glucólisis (I, II, IV). Hasan *et al.* (2019) encontraron que la enolasa se acumulaba durante el desarrollo del mesocarpio de la palma de aceite, relacionado con la producción de aceite en el mesocarpio. En otras frutas, como el arrayán chino (Chen *et al.*, 2016) y el albaricoque (D'Ambrosio *et al.*, 2013), la proteína enolasa también aumentó durante la maduración. En nuestro trabajo, se encontró que la enolasa se acumuló más en APM que en EVY durante la maduración de la semilla. Nuevamente, de acuerdo con el uso del endospermo sólido del APM para la producción de aceite. La

glucólisis fue más activa en APM que en EVY, y el piruvato puede canalizarse para apoyar la biosíntesis de lípidos en este caso.

En el caso de la malato deshidrogenasa (MDH), una enzima clave involucrada en el metabolismo de carbohidratos y lípidos, también se encontró una acumulación ascendente en el ciclo CAT en el cultivar APM, similar a las semillas de ricino, donde la glucólisis y CAT estaban entre los metabolismos más activos (Gu *et al.*, 2019). Del mismo modo, en *Brassica napus*, se acumuló al alza en el citosol y las mitocondrias de semillas con mayor contenido de aceite (Yu *et al.*, 2020), lo que respalda el papel clave de MDH en las semillas oleaginosas.

En las plantas, la síntesis de ácidos grasos ocurre en los plastidios, su descomposición en los peroxisomas, los glioxisomas y en menor grado en las mitocondrias, mientras que la elongación se da en el retículo endoplásmico (Fan *et al.*, 2017; Zulu *et al.*, 2018). Sin embargo, aunque la regulación compartimental de la biosíntesis de lípidos de las plantas es clara, la regulación temporal y espacial diverge entre las plantas, y el contenido de aceite en las semillas varía mucho en términos cuantitativos y cualitativos. Los estudios muestran que el ácido láurico se encuentra en un 65% en *C. nucifera* y en un 85 % en *E. guineensis* (Teng *et al.*, 2020), mientras que el ácido oleico predomina en *Arachis hypogaea* (45-56%), *Persea americana* (60%) y *Styrax tonkinensis* (60%) (Wu *et al.*, 2021). De acuerdo con los hallazgos anteriores, es necesario profundizar en las rutas metabólicas de los carbohidratos y lípidos de las oleaginosas, como el coco, ya que, dependiendo de las familias de plantas, pueden presentar diferencias en su regulación (Bourgis *et al.*, 2011). En el caso del cocotero Maskromo *et al.* (2020) y Tenda *et al.* (2022), han demostrado diferencias significativas en el contenido de ácidos grasos de las variedades altas y enanas, lo que permite plantear la hipótesis de que existe una correlación entre el contenido de ácidos grasos y la acumulación de proteínas relacionadas con ese metabolismo.

Las proteínas involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos se acumularon más en las etapas intermedia y madura del cultivar APM que en EVY, lo que sugiere una alta producción de acetil-CoA. Estos resultados están en concordancia con los usos de semilla de coco, APM para copra y extracción de aceite y EVY para consumo de agua (Prades *et al.*, 2012). La enzima 3-hidroxiacil-ACP deshidratasa, que transforma 3-hidroxiacil-ACP a enoil-ACP y enoil-ACP reductasa a acil-ACP en la biosíntesis de palmitato y elongación de ácidos grasos, mostró la mayor acumulación en el cultivar MPT, similar a lo reportado en *B. napus*, *Ricinus communis*, *Persea americana* y el mesocarpio de *E. guineensis* (Kilaru *et al.*, 2015).

Durante el desarrollo y germinación de la semilla, desde un punto de vista global, el proteoma ligado a actividades enzimáticas, como proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos y carbohidratos y el proteoma asociado a funciones estructurales o de almacenamiento (globulinas, vicilina y oleosinas, entre otros), son cruciales porque apoyan la forma y estructura celular o actúan como reservas de energía para el desarrollo de embriones y plántulas (Antonets *et al.*, 2020).

En nuestro trabajo, durante el perfilado de proteínas del endospermo sólido de coco en diferentes etapas de desarrollo de EVY y APM, vicilina, glutelina tipo A-1, globulina 11S, cocosina 1, la proteína 3 abundante en la embriogénesis tardía (LEA) y la de 70 kDa contra choque térmico se detectaron en el "proteoma central". Nuestros resultados coincidieron con los de García *et al.* (2005) quienes reportaron globulina 11S y vicilina 7S en el endospermo sólido de coco, la primera, denominada cocosina y conocida como la principal proteína de almacenamiento de semilla de coco. Además, Patil y Benjakul, (2018) reportaron glutelina, y Dave y colaboradores (2019), encontraron oleosinas, involucradas en la estabilización de cuerpos oleosos. Nuestros resultados evidenciaron que las proteínas de almacenamiento de coco y las proteínas de choque térmico se distribuyeron desde las etapas inmaduras hasta las maduras en los cultivares EVY y APM, lo que sugiere que su presencia es crucial para el desarrollo, la acumulación o la formación estructural del endospermo. La evidencia bioquímica en *Arabidopsis* sugiere que las proteínas de almacenamiento contribuyen al vigor de la germinación de las semillas y apoyan el crecimiento temprano de las plántulas; finalmente, podrían tener un papel en la longevidad de las semillas (Nguyen *et al.*, 2015). En cuanto a las proteínas de choque térmico, son clave en la maduración de la fruta, estabilizando las proteínas, ayudando al replegamiento de proteínas y protegiendo a las plantas contra el estrés ambiental (Hoque *et al.*, 2016).

3.6. Conclusión

El presente trabajo agrega nueva información al panorama proteómico asociado con el endospermo sólido de coco, enfocándose en el metabolismo de carbohidratos y lípidos en las etapas inmadura, intermedia y madura en dos cultivares de coco contrastantes, APM y EVY. El primero es un alto productor de lípidos y ácidos grasos, mientras que el segundo es un productor de lípidos menos eficiente, pero muy apreciado como frutos jóvenes (inmaduros) por el sabor de su agua de coco. Curiosamente, las proteínas involucradas en el metabolismo de los carbohidratos, por ejemplo, en la glucólisis, se acumularon más en la etapa madura de APM que en EVY; lo más probable es que esto ocurra para sintetizar precursores de ácidos grasos a través de enzimas como MDH y enolasa, cuyos productos

pueden canalizarse para la producción de ácidos grasos. El metabolismo de los carbohidratos fue mayor en la etapa inmadura de EVY, pero se redujo en las etapas intermedia y madura. La combinación del análisis proteómico con la metabolómica puede ayudar a dilucidar el destino de esos carbohidratos durante las etapas intermedia y madura del desarrollo del endospermo sólido. Las proteínas del endospermo sólido involucradas en el metabolismo de los ácidos grasos se acumularon más en la etapa madura de APM en comparación con EVY.

Al investigar la dinámica del proteoma en el metabolismo de carbohidratos y lípidos durante la maduración del endospermo sólido, nuestros resultados brindan hallazgos que contribuyen a una mejor comprensión de los eventos bioquímicos relacionados con la maduración del coco. Este trabajo amplía enormemente el conocimiento actual en torno a la biología fundamental de esta especie no climatérica que, en términos generales, es un grupo aún poco estudiado.

Capítulo IV

4. Discusión general y conclusiones

4.1. Discusión general

Con el fin de comprender el comportamiento de las proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos y ácidos grasos, observado en los endospermos líquido y sólido de los frutos de cocotero de los cultivares EVY y APM, en este capítulo se integran y discuten los resultados proteómicos obtenidos en dichos endospermos. Después de la polinización y fecundación de la flor femenina, el fruto del cocotero comienza a crecer y desarrolla una cavidad interna llena de líquido. Este líquido se origina a partir de la absorción de agua y minerales desde las raíces del cocotero, que luego son transportados a través del tronco y distribuidos hasta el fruto en formación. El endospermo líquido inicia su acumulación unos pocos días después de la fertilización del ovulo y no se detiene sino hasta que la semilla alcanza su madurez (Kumar *et al.*, 2018). Durante este proceso de maduración, a partir del endospermo líquido se origina el endospermo sólido, cuyas células se depositan en la cara interna de las células conocidas como testa (Agaton *et al.*, 1989). Una vez formados, ambos endospermos deben coordinarse a nivel proteómico para mantener los niveles de proteínas en estado activo-inactivo, detectar su abundancia-ausencia, así como su integración en el conjunto de actividades enzimáticas del metabolismo global de la semilla y su maduración (Dzialo *et al.*, 2016). En conjunto, dicha coordinación proteómica en el metabolismo del cocotero garantiza una semilla viable para la especie, en caso contrario; semillas con alteraciones en el proteoma o el metaboloma de los endospermos pueden generar semilla con escasa viabilidad (Kumar *et al.*, 2022). Durante la maduración de la semilla del cocotero, se acepta que debe existir una fina coordinación proteómica durante la acumulación y maduración del endospermo líquido, aunque hasta ahora poco se sabe al respecto.

ETAPA INMADURA

En la primera etapa del fruto de cocotero (menos de 8 meses), está mayormente constituido de agua de coco, ya que desde los 3 meses el fruto ya tiene agua y a los 6 meses empiezan a formar el endospermo sólido (Angeles *et al.*, 2018). En esta etapa, el endospermo líquido está rico en proteínas antioxidantes como Superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y peroxidasas (POD), que protegen contra el estrés oxidativo inicial. El análisis del comportamiento de las proteínas de la ruta glucolítica en los endospermos líquido y sólido de las semillas del cultivar EVY o APM mostró un comportamiento diferencial y contrastante (Figura 32, anexos). Es de hacer notar que la comparación de la acumulación de las

proteínas glucolíticas entre las semillas de los cultivares EVY y APM respaldan que la glucólisis está más activa en las etapas madura e intermedia del cultivar APM con respecto a EVY y que dichas proteínas son predominantes y más acumuladas en el endospermo sólido de dicho cultivar. Este comportamiento puede estar asociado con la conversión de carbohidratos (triosas o hexosas) a precursores de ácidos grasos, dado que se ha reportado que los cultivares altos acumulan mayor porcentaje de ácidos grasos en su endospermo sólido que los cultivares enanos (Bourgis *et al.*, 2011).

El hecho de que la citrato sintasa esté más acumulada en el endospermo líquido de EVY sugiere que en dicho tejido el citrato está siendo requerido posiblemente como molécula antioxidante (Schmidtman *et al.*, 2014). El desarrollo del fruto de cocotero es una condición de alto estrés mecánico y oxidativo y es posible que por ello otros estudios proteómicos han descrito la presencia de los componentes proteicos de detoxificación de las especies reactivas de oxígeno, tal es el caso de la superóxido reductasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX) y glutatión reductasa (Yang *et al.*, 2022). El hecho de que la acumulación de las proteínas del TCA estén poco acumuladas en el endospermo líquido del cultivar APM y más acumuladas en el endospermo sólido, puede estar reflejando una respuesta de coordinación metabólica debido a que en dicho tejido también se observó una mayor acumulación de proteínas de la glucólisis.

ETAPA INTERMEDIA

En la segunda etapa que es la intermedia (9-10 meses), empieza la solidificación del endospermo sólido. Hay una disminución progresiva del contenido de agua, y también se activan proteínas involucradas en la síntesis de almidones, proteínas de reserva y lípidos. Bourgis y colaboradores (2011) han reportado que en las primeras etapas el fruto del coco acumula mayormente carbohidratos, y en las etapas tardías acumula lípidos. Los azúcares permiten a las plantas coordinar el uso apropiado de la energía y esqueletos carbonados disponibles para soportar su desarrollo y crecimiento en un entorno en constante cambio. En esta etapa las proteínas sintasa de almidón y amilasa, juegan un papel importante por que regulan la conversión de azúcares en carbohidratos estructurales (Hernández-Bernal *et al.*, 2022). También la Acetil-CoA carboxilasa y sintasa de ácidos grasos, ellas favorecen la acumulación de lípidos en el endospermo sólido. Como empieza la solidificación del endospermo sólido, las proteínas de almacenamiento comienzan a depositarse en la matriz gelatinosa. Cuando se analizó el comportamiento del proteoma involucrado en la ruta de las pentosas fosfato entre los endospermos líquido y sólido de los cultivares EVY y APM se observó que la proteína transcetolasa-2 (F4IW47) fue detectada en los endospermos líquido

y sólido de ambos cultivares, donde mayormente se acumuló en los estadios intermedios. Cabe destacar que esta enzima también fue detectada en la ruta de fijación del CO₂. La detección de la transcetolasa-2 y la transaldolasa tanto en proceso de fijación del CO₂ como en la ruta de las pentosas fosfato no es de extrañar dado que ambas proteínas participan en la recuperación de carbohidratos en forma de triosas, hexosas y heptulosas, determinando así la economía celular y metabólica del carbono (Fúster-Fernández, 2022).

Etapas maduras

En la última etapa (más de 11 meses) es la maduración completa, donde el endospermo sólido es completamente duro. El agua de coco disminuye drásticamente. Las proteínas de reserva como las glutelinas y prolaminas se acumulan como fuente energética para la germinación. Una vez que las reservas de los endospermos son catabolizadas, sus productos resultantes funcionan como fuente de energía para el desarrollo de la semilla y la germinación del embrión, el cual originará un nuevo individuo (Thakur *et al.*, 2018).

Se ha observado que en el embrión que la mayoría de estas proteínas se incrementaron a lo largo de la maduración (Granados-Alegría *et al.*, 2024). Ya que el endospermo sólido se solidifica completamente muchas proteínas del endospermo sólido implicadas en la biosíntesis de triglicéridos se incrementaron. En la comparación del proteoma involucrado en la biosíntesis y elongación de ácidos grasos en los endospermos líquidos y sólidos de los cultivares EVY y APM se observó que la iniciación de la síntesis de ácidos grasos, la de palmitato, la de octanoil -ACP y la de estearato, fue menor todas las etapas de maduración del endospermo líquido y sólido de EVY y en el líquido de APM. En contraste, fue mayor en la etapa intermedia y madura del endospermo sólido del cultivar APM. Es de hacer notar que en el análisis de los endospermos líquidos de EVY y APM, muchas de las proteínas involucradas en el metabolismo de ácidos grasos no fueron detectadas porque no alcanzaron los niveles de acumulación que permitieran su comparación.

En el caso de las proteínas involucradas en la elongación de ácidos grasos, estas estuvieron más acumuladas al alza en el endospermo sólido del cultivar APM que en el del cultivar EVY y en los endospermos líquidos de ambos cultivares. La proteína 3-hidroxiacil – (ACP) deshidratasa y la 2,3,4-ácido graso saturado –(ACP) deshidrogenasa, estuvieron poco acumuladas en el estadio inmaduro y se acumularon al alza en la etapa intermedia y madura del cultivar APM mientras que en el cultivar EVY dichas proteínas fueron poco acumuladas en las tres etapas de desarrollo.

La coordinación entre la acumulación y activación de las actividades enzimáticas de los proteomas del endospermo líquido y sólido del cocotero, así como la acumulación de carbohidratos y ácidos grasos y lípidos es esencial para la futura transferencia de nutrientes hacia el embrión, tanto para su germinación como para el desarrollo temprano de la plántula (Kumar *et al.*, 2015). En el caso de los carbohidratos presentes en los endospermos líquidos y sólidos del cocotero, se ha observado que proteínas como las glucanasas (KAG1371059), endo-1,3-1,4-beta-D-glucanasa putativa (KAG1364081), endo-1,3(4)-beta-glucanasa 1 (KAG1339046) y la endo-1,3-beta-glucosidasa 13 glucano, aumentan a lo largo de la maduración. Estas proteínas ayudan a descomponer almidones y otros polisacáridos almacenados en los endospermos, transformándolos en azúcares simples que suministran energía para el desarrollo de la semilla (Félix *et al.*, 2023).

Por otra parte, las semillas oleaginosas, como es el caso de la de cocotero, éstas contienen una cantidad significativa de lipasas. Dichas proteínas actúan sobre diferentes compuestos éster, siendo los acilgliceroles sus principales sustratos (Savalas *et al.*, 2021). Dado que los endospermos líquido y sólido son ricos en grasas, las proteínas involucradas en el metabolismo de ácidos grasos y lípidos son prominentes (Kumar *et al.*, 2021), participando en la descomposición de los lípidos almacenados para proporcionar energía a la plántula en desarrollo.

En resumen, la coordinación catalítica entre las proteínas del endospermo líquido y sólido del cocotero es un factor clave para el desarrollo de la semilla. Las proteínas presentes en el agua de coco facilitan la activación y movilización de nutrientes del endospermo sólido al líquido y viceversa, mientras que las proteínas del endospermo sólido de manera coordinada con las del endospermo líquido, proporcionan los recursos estructurales y de almacenamiento necesarios para el crecimiento del embrión durante la germinación. Las proteasas y fosfatasa ácida, involucradas en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, también juegan un papel en la protección y activación de procesos metabólicos durante las primeras etapas de la germinación.

4.2. Conclusiones generales

Nuestro estudio resalta la importancia del enfoque proteómico TMT dado que aportó conocimientos novedosos sobre la bioquímica y la fisiología del desarrollo y la maduración de la semilla de cocotero. La maduración influye tanto en el endospermo sólido como en el líquido, pues se observó mayor turbidez en el agua del fruto maduro y mayor consistencia del endospermo sólido. Además de las diferencias visibles, los dos cultivares y los dos endospermos mostraron diferencias a nivel proteómico. En los perfiles de proteínas de los

endospermos sólido y líquido, en los geles, los cambios en la cantidad y abundancia fueron significativos entre los distintos estadios de maduración. Independientemente del estadio de maduración y de los endospermos, se observó una proteína cuyo peso molecular oscila entre 46 kDa. Adicionalmente, en este estudio se diseñó y aplicó el primer protocolo exitoso de extracción de proteínas del agua de coco y de obtención del primer proteoma comparativo detallado del endospermo líquido del coco.

Según los análisis proteómicos de TMT-SPS-MS3, se identificaron en el endospermo sólido de los cultivares Enano verde de Yucatán y Alto del Pacífico mexicano, 378 y 488 proteínas, respectivamente. Mientras que 881 y 1125 proteínas fueron encontradas en el endospermo líquido de los cultivares EVY y APM, respectivamente. El proteoma basal de los dos cultivares mostró mayor enriquecimiento (fold enrichment > 45) y mayor FDR ($\log_{10} > 30$) en el metabolismo de carbohidratos, mientras que el metabolismo de ácidos grasos fue menor. Los resultados constituyen conocimiento nuevo acerca de la composición proteómica y su dinámica durante la maduración del fruto de cocotero.

La proteómica de los endospermos sólido y líquido del fruto de cocotero está directamente relacionada con la maduración del fruto porque las proteínas de estos tejidos no solo contribuyen a la provisión de nutrientes esenciales y energía para el embrión, sino que también desempeñan funciones de protección frente al estrés y de regulación metabólica. En conjunto, estas funciones aseguran que la semilla esté preparada para germinar y desarrollar una plántula viable, optimizando las probabilidades de éxito durante el proceso de germinación.

REFERENCIAS

- Abid, G., Silue, S., Muhovski, Y., Jacquemin, J.-M., Toussaint, A., & Baudoin, J.-P. (2009). Role of myo-inositol phosphate synthase and sucrose synthase genes in plant seed development. *Gene*, 439(1-2), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2009.03.007>
- Agregán, R.; Echegaray, N.; López-Pedrouso, M.; Kharabsheh, R.; Franco, D.; Lorenzo, J.M. Proteomic Advances in Milk and Dairy Products. *Molecules* 2021, 26, 3832. <https://doi.org/10.3390/molecules26133832>
- Al-Amrani, S, Al-Jabri, Z., Al-Zaabi, A., Alshekaili, J., Al-Khabori, M. (2021). Proteomics: Concepts and applications in human medicine. *World J Biol Chem.* 12(5), 57-69. doi: 10.4331/wjbc.v12.i5.57.
- Aljohi, H. A., Liu, W., Lin, Q., Zhao, Y., Zeng, J., Alamer, A., Alanazi, I. O., Alawad, A. O., Al-Sadi, A. M., Hu, S., Yu, J. (2016). Complete sequence and analysis of coconut palm (*Cocos nucifera*) mitochondrial genome. *PLoS ONE* 11(10): e0163990. doi:10.1371/journal.pone.0163990
- Allaman, I., Bélanger, M., & Magistretti, P. J. (2015). Methylglyoxal, the dark side of glycolysis. *Frontiers in Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00023>
- Angeles, J., Lado, J., Pascual, E., Cueto, C., Laurena, A., & Laude, R. (2018). Towards the Understanding of Important Coconut Endosperm Phenotypes: Is there an Epigenetic Control? *Agronomy*, 8(10), 225. <https://doi.org/10.3390/agronomy8100225>
- Antonets, K.S.; Belousov, M.V.; Sulatskaya, A.I.; Belousova, M.E.; Kosolapova, A.O.; Sulatsky, M.I.; Andreeva, E.A.; Zykin, P.A.; Malovichko, Y.V.; Shtark, O.Y.; et al. Accumulation of Storage Proteins in Plant Seeds Is Mediated by Amyloid Formation. *PLoS Biol.* 2020, 18, e3000564, doi:10.1371/journal.pbio.3000564.
- Appaiah, P., Sunil, L., Kumar, P. K. P. (2014). Physico-chemical characteristics and stability aspects of coconut water and kernel at different stages of maturity. *J Food Sci Technol.* doi 10.1007/s13197-014-1559-4
- Assa, R. R., K. K. Jean-Louis, P. Alexia, N. Jean and K. 2010. Ernest Physicochemical characteristics of kernel during fruit maturation of four coconut cultivars (*Cocos nucifera* L.). *African Journal of Biotechnology* 9(14):2136-2144
- Bachor, R., M. Waliczek, P. Stefanowicz and Z. Szewczuk. 2019. Trends in the Design of New Isobaric Labeling Reagents for Quantitative Proteomics. *Molecules* 24:701. doi:10.3390/molecules24040701

- Bai, Q., Y. Huang and Y. Shen. 2021. The Physiological and Molecular Mechanism of Abscisic Acid in Regulation of Fleshy Fruit Ripening. *Frontiers in Plants Science* doi.org/10.3389/fpls.2020.619953
- Bai, X., T. Chen, Y. Wu, M. Tang and Z. F. Xu. 2021. Selection and Validation of Reference Genes for qRT-PCR Analysis in the Oil-Rich Tuber Crop Tiger Nut (*Cyperus esculentus*) Based on Transcriptome Data. *Int. J. Mol. Sci.* 22 :2569. <https://doi.org/10.3390/ijms22052569>
- Bandupriya, H. D. D. and J. M. Dunwell. 2015. Transcriptome analysis for discovering candidate genes involve in embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.) through 454 pyrosequencing. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka* 43(4): 319-336
- Barlina, R., Trivana, L. and Manaroinsong, E. (2019). Effect of immersion in calcium chloride solution on the characteristic of coconut chips during storage. *Cord* 35(1):11-20.
- Beevers, H. The Role of the Glyoxylate Cycle. Editor(s): P.K. Stumpf, *Lipids: Structure and Function*. Academic Press, 1980, pp 117-130,
- Boonkaew, T., Mongkolsiriwatana, C., Vongvanrungruang, A., Srikulnath, K., & Peyachoknagul, S. (2018). Characterization of GA20ox genes in tall and dwarf types coconut (*Cocos nucifera* L.). *Genes & Genomics*, 40(7), 735-745. <https://doi.org/10.1007/s13258-018-0682-4>
- Bourgis, F., Kilaru, A., Cao, X., Ngando-Ebongue, G.-F., Drira, N., Ohlrogge, J. B., & Arondel, V. (2011). Comparative transcriptome and metabolite analysis of oil palm and date palm mesocarp that differ dramatically in carbon partitioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(30), 12527-12532. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106502108>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bramer, L. S., J. I., P. D. Piehowski, K. D. Rodland and B.-J. M. Webb-Robertson. 2020. A review of imputation strategies for isobaric labeling-based shotgun proteomics. *J. Proteome Res.* DOI: 10.1021/acs.jproteome.0c00123
- Burgos-Canul, Y. Y., Canto-Canché, B., Berezovski, M. V., Mironov, G., Loyola-Vargas, V. M., Barba de Rosa, A. P., Tzec-Simá, M., Brito-Argáez, L., Carrillo-Pech, M., Grijalva-Arango, R., Muñoz-Pérez, G., & Islas-Flores, I. (2019). The cell wall proteome from two strains of *Pseudocercospora fijiensis* with differences in virulence. *World Journal of*

- Microbiology and Biotechnology, 35(7), 105. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2681-2>
- Burns, D. T., Johnston, E.-L., & Walker, M. J. (2020). Authenticity and the Potability of Coconut Water—A Critical Review. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 103(3), 800-806. <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qs008>
- Chen, W., G. Zhang, W. Chen, Q. Zhong, and H. Chen. 2018. Metabolomic profiling of matured coconut water during post-harvest storage revealed discrimination and distinct changes in metabolites. *RSC Advances* 8(55): 31396–31405. doi:10.1039/c8ra04213f
- Chen, Y.-Y., Zhang, Z.-H., Zhong, C.-Y., Song, X.-M., Lin, Q.-H., Huang, C.-M., Huang, R.-H., & Chen, W. (2016). Functional analysis of differentially expressed proteins in Chinese bayberry (*Myrica rubra Sieb. Et Zucc.*) fruits during ripening. *Food Chemistry*, 190, 763-770. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.023>
- Chin, C. F., E. Y. Teoh, M. J. Y. Chee, J. R. Al-Obaidi, N. Rahmad and T. Lawson. 2019. Comparative Proteomic Analysis on Fruit Ripening Processes in Two Varieties of Tropical Mango (*Mangifera indica*). *The Protein Journal* 38:704–715 <https://doi.org/10.1007/s10930-019-09868-x>
- Corpas, F. J., & Palma, J. M. (2018). Nitric oxide on/off in fruit ripening. *Plant Biology*, 20(5), 805-807. <https://doi.org/10.1111/plb.12852>
- Correa, S. M., A. R. Fernie, Z. Nikoloski, Y. Brotman. 2020. Towards model driven characterization and manipulation of plant lipid metabolism, *Progress in Lipid Research* <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2020.101051>
- Cui, J., E. Lamade and G. Tcherkez. 2020. Seed Germination in Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): A review of metabolic pathways and control mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences* 21:4227. doi:10.3390/ijms21124227
- D'Amato, A., Fasoli, E., & Righetti, P. G. (2012). Harry Belafonte and the secret proteome of coconut milk. *Journal of Proteomics*, 75(3), 914-920. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.10.009>
- D'Ambrosio, C., Arena, S., Rocco, M., Verrillo, F., Novi, G., Viscosi, V., Marra, M., & Scaloni, A. (2013). Proteomic analysis of apricot fruit during ripening. *Journal of Proteomics*, 78, 39-57. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.11.008>
- Dave, A.C.; Ye, A.; Singh, H. Structural and Interfacial Characteristics of Oil Bodies in Coconuts (*Cocos nucifera* L.). *Food Chem.* **2019**, 276, 129–139.

- De Bellis, L., A. Luvisi and A. Alpi. (2020). Aconitase: to be or not to be inside plant glyoxysomes, that is the question. *Biology* 9:162 doi:10.3390/biology9070162
- Deytieux, C., L. Geny, D. Lapailierie, S. Claverol, M. Bonneu and B. Doneche. (2007). Proteome analysis of grape skins during ripening. *Journal of Experimental Botany* 58(7):1851–1862. doi:10.1093/jxb/erm049
- Fan, H., Y. Xiao, Y. Yang, W. Xia, A. S. Mason, Z. Xia, F. Qiao, S. Zhao and H. Tang. (2013). RNA-Seq analysis of *Cocos nucifera*: transcriptome sequencing and de novo assembly for subsequent functional genomics approaches. *PLoS ONE* 8(3):e59997. doi:10.1371/journal.pone.0059997
- Fan, J., Yu, L., & Xu, C. (2017). A Central Role for Triacylglycerol in Membrane Lipid Breakdown, Fatty Acid β -Oxidation, and Plant Survival under Extended Darkness. *Plant Physiology*, 174(3), 1517-1530. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00653>
- Faraoni, P., E. Sereni, A. Gnerucci, F. Cialdai, M. Monici and F. Ranaldi. (2019). Glyoxylate cycle activity in *Pinus pinea* seeds during germination in altered gravity conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* 139:389–394
- Farooq, M. A., Zhang, X., Zafar, M. M., Ma, W., & Zhao, J. (2021). Roles of Reactive Oxygen Species and Mitochondria in Seed Germination. *Frontiers in Plant Science*, 12, 781734. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.781734>
- Faurobert M, Mihr C, Bertin N et al. Major proteome variations associated with cherry tomato pericarp development and ripening. *Plant Physiol* 2007; 143: 1327– 1346.
- Forlani, S., S. Masiero and C. Mizzotti. (2019). Fruit ripening: the role of hormones, cell wall modifications and their intersection with pathogens. *Journal of Experimental Botany* 70 (11):2993–3006. doi:10.1093/jxb/erz112
- Fuentes, L.; Figueroa, C.R.; Valdenegro, M. Recent Advances in Hormonal Regulation and Cross-Talk during Non-Climacteric Fruit Development and Ripening. *Horticulturae* 2019, 5, 45. <https://doi.org/10.3390/horticulturae5020045>
- Fúster Fernández, I. Application of Transketolase from *Geobacillus stearothermophilus* for Broad Synthesis of N-Arylhydroxamates and Development of a Novel High-Throughput Reactivity Assay (Doctoral dissertation, Dissertation, Darmstadt, Technische Universität Darmstadt, 2022).
- Galli V, Sanchez-Ballesta MT, El-kereamy A, Ayub RA and Jia W. (2021) Editorial: Hormonal Regulation of Non-climacteric Fruit Development and Maturation. *Front. Plant Sci.* 12: 690691. doi: 10.3389/fpls.2021.690691

- Garcia, R. N., Arocena, R. V., Laurena, A. C., & Tecson-Mendoza, E. M. (2005). 11S and 7S Globulins of Coconut (*Cocos nucifera* L.): Purification and Characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1734-1739. <https://doi.org/10.1021/jf0402173>
- Gómez-Tah, R.; Islas-Flores, I.; Félix, J.W.; Granados-Alegria, M.I.; Tzec-Simá, M.; Guerrero-Analco, J.A.; Monribot-Villanueva, J.L.; Canto-Canché, B. Untargeted Metabolomics Analysis of Liquid Endosperm of *Cocos nucifera* L. at Three Stages of Maturation Evidenced Differences in Metabolic Regulation. *Horticulturae* **2023**, 9, 866. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9080866>
- Gu, J.; Hou, D.; Li, Y.; Chao, H.; Zhang, K.; Wang, H.; Xiang, J.; Raboanatahiry, N.; Wang, B.; Li, M. Integration of Proteomic and Genomic Approaches to Dissect Seed Germination Vigor in *Brassica napus* Seeds Differing in Oil Content. *BMC Plant Biol.* **2019**, 19, 21.
- Halim, H. H., E. W. Dee, M. S. P. Dek, A. A. Hamid, A. Ngalim, N. Saari and A. H. Jaafar. 2018. Ergogenic attributes of young and mature Coconut (*Cocos nucifera* L.) water based on physical properties, sugars and electrolytes contents. *International Journal of Food Properties* 21(1): 2378–2389.
- Harries, H. C. (2012). Germination rate is the significant characteristic determining coconut palm diversity. *AoB Plants* pls 45; doi:10.1093/aobpla/pls045
- Harwood J L (2005) Fatty acid biosynthesis: *In: Plant Lipids: Biology, Utilization and Manipulation*. DJ Murphy (ed). Blackwell Publishing, Oxford. pp:27-66.
- Hassan, H.; Amiruddin, M.D.; Weckwerth, W.; Ramli, U.S. Deciphering Key Proteins of Oil Palm (*Elaeis Guineensis* Jacq.) Fruit Mesocarp Development by Proteomics and Chemometrics. *Electrophoresis* **2019**, 40, 254–265.
- Hernández-Bernal, A. F., J. Gregorio-Jorge, P. León. 2022. The role of Sugars as Signaling Molecules in Plants. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 25: 1-20
- Hernández-Pérez, A., Zamora-Briseño, J. A., Ruiz-May, E., Pereira-Santana, A., Elizalde-Contreras, J. M., Pozos-González, S., Torres-Irineo, E., Hernández-López, J., Gaxiola-Cortés, M. G., & Rodríguez-Canul, R. (2019). Proteomic profiling of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) hemocytes infected with white spot syndrome virus reveals the induction of allergy-related proteins. *Developmental & Comparative Immunology*, 91, 37-49. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.10.002>
- Hong,W.-J.;Jiang,X.;Choi, S.-H.; Kim, Y.-J.; Kim, S.-T.; Jeon, J.-S.; Jung, K.-H. A Systemic View of Carbohydrate Metabolism in Rice to Facilitate Productivity. *Plants* 2021, 10, 1690. <https://doi.org/10.3390/plants10081690>

- Hoque, T. S., Hossain, M. A., Mostofa, M. G., Burritt, D. J., Fujita, M., & Tran, L.-S. P. (2016). Methylglyoxal: An Emerging Signaling Molecule in Plant Abiotic Stress Responses and Tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01341>
- Huang J, Chen X, He A, Ma Z, Gong T, Xu K and Chen R. 2021. Integrative morphological, physiological, proteomics analyses of jujube fruit development provide insights into fruit quality domestication from wild jujube to cultivated jujube. *Frontiers in Plant Science* 12:773825. doi: 10.3389/fpls.2021.773825
- Huang, J., Liu, X., Lan, Q., Lai, X., Luo, Z., & Yang, G. (2016). Proteomic profile of coconuts. *European Food Research and Technology*, 242(3), 449-455. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2556-1>
- Huang, Y. Y., A. J. Matzke, and M. Matzke. (2013). Complete sequence and comparative analysis of the chloroplast genome of coconut palm (*Cocos nucifera*). *PLoS One* 8: e74736. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074736>
- Ignacio, I.-F., & Miguel, T.-S. (2021). Research opportunities on the coconut (*Cocos nucifera* L.) using new technologies. *South African Journal of Botany*, 141, 414-420. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.05.030>
- Islas-Flores, I., Oropeza, C., & Hernández-Sotomayor, S. M. T. (1998). Protein Phosphorylation during Coconut Zygotic Embryo Development. *Plant Physiology*, 118(1), 257-263. <https://doi.org/10.1104/pp.118.1.257>
- Izzeddin, A. A., Elsharif, A. A., Abu-Naser, S. S. (2019). An expert system for coconut diseases diagnosis. *International Journal of Academic Engineering Research* 3(4):8-13
- Jackson, J. C., Gordon, A., Wizzard, G., McCook, K., & Rolle, R. (2004). Changes in chemical composition of coconut (*Cocos nucifera*) water during maturation of the fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(9), 1049-1052. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1783>
- Ji, Y. and Wang, A. (2021). Recent Advances in Phytohormone Regulation of Apple-Fruit Ripening. *Plants* 10:2061 <https://doi.org/10.3390/plants10102061>
- Jia, T., Ge, Q., Zhang, S., Zhang, Z., Liu, A., Fan, S., Jiang, X., Feng, Y., Zhang, L., Niu, D., Huang, S., Gong, W., Yuan, Y., & Shang, H. (2021). UDP-Glucose Dehydrogenases: Identification, Expression, and Function Analyses in Upland Cotton (*Gossypium hirsutum*). *Frontiers in Genetics*, 11, 597890. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.597890>
- Jiang, B., S. Ou, L. Xu, W. Mai, M. Ye, H. Gu, T. Zhang, C. Yuan, C. Shen, J. Wang and K. Liu. (2019). Comparative proteomic analysis provides novel insights into the regulation mechanism underlying papaya (*Carica papaya* L.) exocarp during fruit ripening process. *BMC Plant Biology* 19:238. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1845-4>

- Juarez-Escobar, J., Guerrero-Analco, J. A., Zamora-Briseño, J. A., Elizalde-Contreras, J. M., Bautista-Valle, M. V., Bojórquez-Velázquez, E., Loyola-Vargas, V. M., Mata-Rosas, M., & Ruíz-May, E. (2021). Tissue-specific proteome characterization of avocado seed during postharvest shelf life. *Journal of Proteomics*, 235, 104112. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104112>
- Kalapos, M. P. (2008). The tandem of free radicals and methylglyoxal. *Chemico-Biological Interactions*, 171(3), 251-271. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2007.11.009>
- Käll, L., Canterbury, J. D., Weston, J., Noble, W. S., & MacCoss, M. J. (2007). Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nature Methods*, 4(11), 923-925. <https://doi.org/10.1038/nmeth1113>
- Katz, E., M. Fon, Y. J. Lee, B. S. Phinney, A. Sadka and E. Blumwald. (2007). The citrus fruit proteome: insights into citrus fruit metabolism. *Planta* 226:989–1005 DOI 10.1007/s00425-007-0545-8
- Khan, W. A., H. Chun-Mei, N. Khan, A. Iqbal, S.-W. Lyu and F. Shah. (2017). Bioengineered Plants Can Be a Useful Source of Omega-3 Fatty Acids. *BioMed Research International* <https://doi.org/10.1155/2017/7348919>
- Kilaru, A., Cao, X., Dabbs, P. B., Sung, H.-J., Rahman, Md. M., Thrower, N., Zynda, G., Podicheti, R., Ibarra-Laclette, E., Herrera-Estrella, L., Mockaitis, K., & Ohlrogge, J. B. (2015). Oil biosynthesis in a basal angiosperm: Transcriptome analysis of *Persea Americana* mesocarp. *BMC Plant Biology*, 15(1), 203. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0586-2>
- Kong, E. Y. Y., J. Biddle, M. Foale, B. Panis and S. W. Adkins. (2021). The potential to propagate coconut clones through direct shoot organogenesis: A review. *Scientia Horticulturae* 289:10400 doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110400
- Kou, X., Feng, Y., Yuan, S., Zhao, X., Wu, C., Wang, C., Xue, Z. Different regulatory mechanisms of plant hormones in the ripening of climacteric and non-climacteric fruits: a review. *Plant Mol Biol* 107, 477–497 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11103-021-01199-9>
- Kuhn, N.; Ponce, C.; Arellano, M.; Time, A.; Sagredo, B.; Donoso, J.M.; Meisel, L.A. Gibberellic Acid Modifies the Transcript Abundance of ABA Pathway Orthologs and Modulates Sweet Cherry (*Prunus avium*) Fruit Ripening in Early- and Mid-Season Varieties. *Plants* 2020, 9, 1796. <https://doi.org/10.3390/plants9121796>

- Kumalasari, I. D., I. Santosa and E. Sulistiawati. 2020. Coconut Oil Production with Various Roasting temperatures and dried grated coconut as a by-product. *Earth and Environmental Science* 515 012026 doi:10.1088/1755-1315/515/1/0120263
- Kumalasari, I. D., Santosa, I. and Sulistiawati, E. (2020). Coconut Oil Production with Various Roasting temperatures and dried grated coconut as a by-product. *Earth and Environmental Science* 515(012026) doi:10.1088/1755-1315/515/1/0120263.
- Kumar, S. N. (2011). Variability in Coconut (*Cocos nucifera* L.) Germplasm and Hybrids for Fatty Acid Profile of Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(24), 13050-13058. <https://doi.org/10.1021/jf203182d>
- Kundu, P., Nehra, A., Gill, R., Tuteja, N., & Gill, S. S. (2022). Unraveling the importance of EF-hand-mediated calcium signaling in plants. *South African Journal of Botany*, 148, 615-633. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.04.045>
- Lantican, D. V., Strickler, S. R., Canama, A. O., Gardoce, R. R., Mueller, L. A. and Galvez, H. F. (2019). De novo genome sequence assembly of dwarf coconut (*Cocos nucifera* L. 'Catigan Green Dwarf') provides insights into genomic variation between coconut types and related palm species. *Genes Genomes Genetics* 9:2377-2393.
- Law, S. V., F. Abu Bakar, D. Mat Hashim, A. Abdul Hamid. (2011). Popular fermented foods and beverages in Southeast Asia. *Int Food Res J* 18:475–484
- Lee P. Y., N. Saraygord-Afshari and T. Y. Low. (2019). The evolution of two-dimensional gel electrophoresis- from proteomics to emerging alternative applications. *Journal of Chromatography A* 460763–. doi:10.1016/j.chroma.2019.460763
- Li H., X. Liang, B. Zhou, X. Chen, Y. Hong, R. Zhou, S. Li, H. Liu, Q. Lu, H. Liu and H. Wu. 2020. A proteomic analysis of peanut seed at different stages of underground development to understand the changes of seed proteins. *PLoS ONE* 15(12): e0243132. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243132>
- Li, J., J. G. V. Vranken, L. P. Vaites, et al. (2020). TMTpro reagents: a set of isobaric labeling mass tags enables simultaneous proteome-wide measurements across 16 samples. *Nature Methods* doi:10.1038/s41592-020-0781-4
- Lin, X., Wu, X., & Liu, X. (2018). Temperature stress response of heat shock protein 90 (Hsp90) in the clam *Paphia undulata*. *Aquaculture and Fisheries*, 3(3), 106-114. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2018.04.003>

- Lin, Y., Y. Wang, Z. Ji and X. Le. (2020). Isolation, purification, and identification of coconut protein through SDS-PAGE, HPLC, and MALDI-TOF/TOF-MS. *Food Analytical Methods* <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01743-1>
- Ma, J., Pan, C., Chen, H., Chen, W., Chen, W., Zhang, M., & Zhong, Q. (2022). Insight of the Functional and Biological Activities of Coconut (*Cocos nucifera* L.) Protein by Proteomics Analysis and Protein-Based Bioinformatics. *Molecules*, 27(9), 2987. <https://doi.org/10.3390/molecules27092987>
- Manohar, A. N. C., D. V. Lantican, M. P. Dancel, D. E. M. Cardona, A. C. M. Ibarra, C. R. Gulay, A. O. Canama, R. R. Gardoce and H. F. Galvez. (2019). Genome-guided molecular characterization of oil genes in coconut (*Cocos nucifera* L.). *Philippine Journal of Science* 148 (S1): 183-198.
- Maronedze, C., Gehring, C. and Thomas, L. (2014). Dynamic changes in the date palm fruit proteome during development and ripening. *Horticulture Research* 1:14039 doi:10.1038/hortres.2014.39
- Martinez-Esteso, M.J, Selles-Marchart S., Lijavetzky D., Pedreno M.A., Bru-Martinez R. A DIGE-based quantitative proteomic analysis of grape berry flesh development and ripening reveals key events in sugar and organic acid metabolism. *J Exp Bot* 2011; 62: 2521–2569.
- Maskromo, I.; Karouw, S.; Pandin, D.S.; Mahayu, W.M.; Santosa, B.; Alouw, J.C. Physicochemical Properties of Kebumen Entog Dwarf Coconut. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **2020**, 418, 012037.
- Mortimer, J. C., Laohavisit, A., Macpherson, N., Webb, A., Brownlee, C., Battey, N. H., & Davies, J. M. (2008). Annexins: Multifunctional components of growth and adaptation. *Journal of Experimental Botany*, 59(3), 533-544. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm344>
- Muccilli, V., C. Licciardello, D. Fontaninic, M. P. Russo, V. Cunsolo, R. Saletti, G. R. Recupero and S. Foti. (2009). Proteome analysis of *Citrus sinensis* L. (Osbeck) flesh at ripening time. *Journal of proteomics* 73:134 – 152.
- Mukherjee, S. (2019). Recent advancements in the mechanism of nitric oxide signaling associated with hydrogen sulfide and melatonin crosstalk during ethylene-induced fruit ripening in plants. *Nitric Oxide*, 82, 25–34. doi:10.1016/j.niox.2018.11.003
- Muñoz-Pérez, J. M., G. P. Cañas, L. López and T. Arias. (2019). Genome-wide diversity of northern South America cultivated Coconut (*Coconut nucifera* L.) uncovers

- diversification times and targets of domestication of coconut globally. bioRxiv 2019; 825398.
- Naganeeswaran, S., Fayas, T. P., & Rajesh, M. K. (2020). Dataset of transcriptome assembly of date palm embryogenic calli and functional annotation. *Data in Brief*, 31, 105760. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2020.105760>
- Naik, M., Sunil, C. K., Rawson, A. and Venkatachalapathy, N. (2020). Tender coconut water: a review on recent advances in processing and preservation. *Food Reviews International* 1-22.
- Nair, K. P. (2021). The Coconut Palm (*Cocos nucifera* L.). En K. P. Nair, *Tree Crops* (pp. 79-128). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-62140-7_3
- Naphatthalung, J., P. Chairuk, K. Kanokwiroon, N. Radenahmad and C. Jansakul. (2019). Effects of six weeks consumption of coconut milk oil on vascular functions and fasting blood glucose and lipid profile in middle-aged male rats. *Functional Foods in Health and Disease* 9(11):719-734
- Nartvaranant, P. (2019). Genetic variations for «Nam Hom» coconut (*Cocos nucifera* L.) grown in the western region of Thailand using AFLP markers. *Journal of Thai Interdisciplinary Research*, 14, 12. <https://doi.org/10.14456/JTIR.2019.3>
- Nejat, N., D. M. Cahill, G. Vadamalai, M. Ziemann, J. Rookes and N. Naderali. (2015). Transcriptomics-based analysis using RNA-Seq of the coconut (*Cocos nucifera*) leaf in response to yellow decline phytoplasma infection. *Mol Genet Genomics* 290:1899–1910 doi 10.1007/s00438-015-1046-2
- Nguyen, T.-P.; Cueff, G.; Hegedus, D.D.; Rajjou, L.; Bentsink, L. A Role for Seed Storage Proteins in *Arabidopsis* Seed Longevity. *J. Exp. Bot.* **2015**, 66, 6399–6413.
- Niral, V., Jerard, B. A., & Rajesh, M. K. (2021). Germplasm Resources: Diversity and Conservation. En M. K. Rajesh, S. V. Ramesh, L. Perera, & C. Kole (Eds.), *The Coconut Genome* (pp. 27-46). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-76649-8_3
- Nitiwattananon, A. and S. Thanachasai. 2019. Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction techniques for extraction of phenolic compounds from coconut husk. *Applied Mechanics and Materials* 891:83-89.
- O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250:4007–4021

- Ojobor, C. C., Anosike, C. A. and Ezeanyika, L. U. S. (2018). Evaluation of phytochemical, proximate and nutritive potentials of *Cocos nucifera* (coconut) seeds. *Journal of Experimental Research* 6(2):11-18.
- Ojobor, C. C., C. A. Anosike and L. U. S. Ezeanyika. 2018. Evaluation of phytochemical, proximate and nutritive potentials of *cocos nucifera* (coconut) seeds. *Journal of Experimental Research* 6(2):11-18.
- Oropeza, C., Cordova, I., Chumba, A., Narváez, M., Sáenz, L., Ashburner, R., & Harrison, N. (2011). Phytoplasma distribution in coconut palms affected by lethal yellowing disease. *Annals of Applied Biology*, 159(1), 109-117. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2011.00480.x>
- Patil, U. and Benjakul, S. (2017). Characteristics of albumin and globulin from coconut meat and their role in emulsion stability without and with proteolysis. *Food Hydrocolloids* 69:220–228.
- Patil, U.; Benjakul, S. Coconut milk and coconut oil: their manufacture associated with protein functionality. *J. Food Sci.*, 2018, 1-9.
- Pedreschi, R., V. Uarrota, C. Fuentealba, J. E. Alvaro, P. Olmedo, B. G. Defilippi, C. Meneses and R. Campos-Vargas. 2019. Primary metabolism in avocado fruit. *Front. Plant Sci.* 10:795. doi: 10.3389/fpls.2019.00795
- Perby, L. K., S. Richter, K. Weber, A. J. Hieber, N. Hess, C. Crocoll, H. K. Mogensen, M. Pribil, M. Burow, T. H. Nielsen and A. Mustroph. 2021. Cytosolic phosphofructokinases are important for sugar homeostasis in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany* 129: 37–52
- Perera, P. I. P., Hoche, V., Weerakoon, L. K., Yakandawala, D. M. D., Fernando, S. C., & Verdeil, J.-L. (2010). Early inflorescence and floral development in *Cocos nucifera* L. (Arecaceae: Arecoideae). *South African Journal of Botany*, 76(3), 482-492. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.03.006>
- Prades, A., M. Dornier, N. Diop, J. P. Pain. (2012). Coconut water uses, composition and properties: a review. *Fruits* 67(2):87–107.
- Preece, R. L., Han, S. Y. S. and Bahn, S. (2018). Proteomic approaches to identify blood-based biomarkers for depression and bipolar disorders. *Expert Review Of Proteomics* 15(4): 325–340
- Preetha, P. P., V. G. Devi and T. Rajamohan. 2012. Hypoglycemic and antioxidant potential of coconut water in experimental diabetes. *Food Funct.* 3:753–757.

- Prinsi, B., A. S. Negri, C. Fedeli, S. Morgutti, N. Negrini, M. Cocucci and L. Espen. (2011). Peach fruit ripening: A proteomic comparative analysis of the mesocarp of two cultivars with different flesh firmness at two ripening stages. *Phytochemistry* 72:1251–1262
- Purkayastha, M. D., D. Kalita, N. K. Mahnot, C. L. Mahanta, M. Mandal and M. K. Chaudhuri. 2012. Effect of l-ascorbic acid addition on the quality attributes of micro-filtered coconut water stored at 4 C. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16(69–79) doi.org/10.1016/j.ifset.2012.04.007
- Rajashri, K., B. S. Roopa, P. S. Negi, N. K. Rastogi. 2019. Effect of ozone and ultrasound treatments on polyphenol content, browning enzyme activities, and shelf life of tender coconut water. *Journal of Food Process Preserv.* 44:e14363 doi.org/10.1111/jfpp.14363
- Rajesh M. K., Chowdappa, P., Behera, S. K., Kasaragod, S., Gangaraj, K. P., Kotimoole, C. N., Nekrakalaya, B., Mohanty, V., Sampgod, R. B., Banerjee, G., Das, A. J., Niral, V., Karun, A., Mahato, A. K., Gaikwad. K., Singh, N. K., Keshava, Prasad, T. S. (2020) Assembly and annotation of the nuclear and organellar genomes of a dwarf coconut (Chowghat Green Dwarf) possessing enhanced disease resistance. *OMICS: J Integrative Biol* 24(12):726–742
- Reynolds, K. B., D. P. Cullerne, A. E. Tahchy, V. Rolland, C. L. Blanchard, C. C. Wood, S. P. Singh and J. R. Petrie. (2019). Identification of genes involved in lipid biosynthesis through de novo transcriptome assembly from *Cocos nucifera* developing endosperm. *Plant Cell Physiol.* 60(5):945–960 doi:10.1093/pcp/pcy247
- Rosa-Téllez, S., Anoman, A. D., Flores-Tornero, M., Toujani, W., Alseek, S., Fernie, A. R., Nebauer, S. G., Muñoz-Bertomeu, J., Segura, J., & Ros, R. (2018). Phosphoglycerate Kinases Are Co-Regulated to Adjust Metabolism and to Optimize Growth. *Plant Physiology*, 176(2), 1182-1198. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01227>
- Saini, R. K. and Keum, Y.-S. 2018 Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance — A review. *Life Sciences*, 203: 255-267.
- Schmidtman, E., A. C. König, A. Orwat, D. Leister, M. Hartl, I. Finkemeier. 2014. Redox Regulation of Arabidopsis Mitochondrial Citrate Synthase. *Molecular Plant*, 7(1):156 - 169
- Schubert, O. T., H. L. Röst, B. C. Collins, G. Rosenberger and R. Aebersold. (2017). Quantitative proteomics: challenges and opportunities in basic and applied research. *Nature Protocols* 12(7):1289-1294

- Shen, Z-J., Xu S-X, Huang, Q-Y, Li Z-Y, Xu Y-D, Lin C-S and Huang Y-J. 2022. TMT proteomics analysis of a pseudocereal crop, quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.), during seed maturation. *Frontiers in Plant Science* 13:975073. doi: 10.3389/fpls.2022.975073
- Stein, O., & Granot, D. (2019). An Overview of Sucrose Synthases in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 10, 95. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00095>
- Sudha, R., Niral, V., & Samsudeen, K. (2021). Botanical Study and Cytology. En M. K. Rajesh, S. V. Ramesh, L. Perera, & C. Kole (Eds.), *The Coconut Genome* (pp. 13-25). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-76649-8_2
- Sun, Z., D. Chen, L. Zhu, Y. Zhao, Z. Lin, X. Li. and W. Dai. 2022. A comprehensive study of the differences in protein expression and chemical constituents in tea leaves (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) with different maturity using a combined proteomics and metabolomics method. *Food Research International* 157:111397
- Tan, S. N., J. W. H. Yong and L. Ge. (2014). Analyses of Phytohormones in Coconut (*Cocos Nucifera* L.) Water Using Capillary Electrophoresis-Tandem Mass Spectrometry. *Chromatography*, 1(4) : 211–226. doi:10.3390/chromatography1040211
- Tenda, E., Miftahorrhachman, & Kumaunang, J. (2022). Profile of amino acids and fatty acids of some Indonesia tall coconut varieties. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 974(1), 012133. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/974/1/012133>
- Teng, M., Y. J. Zhao, A. L. Khoo, T. C. Yeo, Q. W. Yong and B. P. Lim. (2019). Impact of coconut oil consumption on cardiovascular health: a systematic review and meta-analysis. *Nutrition in Clinical Care* 1-11. doi: 10.1093/nutrit/nuz074 *Engineering* 44(1):12–21. doi:10.1006/mben.2001.0204
- Teng, M., Zhao, Y. J., Khoo, A. L., Yeo, T. C., Yong, Q. W., & Lim, B. P. (2020). Impact of coconut oil consumption on cardiovascular health: A systematic review and meta-analysis. *Nutrition Reviews*, 78(3), 249-259. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuz074>
- Terrier N, Ageorges A, Abbal P, Romieu C. Generation of ESTs from grapeberry at various developmental stages. *J Plant Physiol* 2001; 158: 1575–1583.
- Thaiphanit, S. and P. Anprung. (2016). Physicochemical and Emulsion Properties of Edible Protein Concentrate from Coconut (*Cocos Nucifera* L.) Processing By-Products and the Influence of Heat Treatment. *Food Hydrocoll* 52, 756–765.
- Tuhumuri, E., R. P. Sancayaningsih, B. Setiaji and S. Usman. 2020. The implementation and effect of sasi on coconut (*Cocos nucifera* L.) harvest products in southern Buru, Indonesia. *Oilseeds & fats Crops and Lipids* 27(3):2-8.

- Ullah, A., H. Manghwar, M. Shaban, A. H. Khan, A. Akbar, U. Ali, E. Ali and S. Fahad. (2018). Phytohormones enhanced drought tolerance in plants: a coping strategy. *Environmental Science and Pollution Research* 25:33103–33118 doi:10.1007/s11356-018-3364-5
- Williams, R. S., & Benkeblia, N. (2018). Biochemical and physiological changes of star apple fruit (*Chrysophyllum cainito*) during different “on plant” maturation and ripening stages. *Scientia Horticulturae*, 236, 36-42. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.03.007>
- Wu, B., & Wang, B. (2019). Comparative analysis of ascorbate peroxidases (APXs) from selected plants with a special focus on *Oryza sativa* employing public databases. *PLOS ONE*, 14(12), e0226543. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226543>
- Wu, Q., Chen, C., Wang, X., Zhang, Z., Yu, F., & Guy, R. D. (2021). Proteomic analysis of metabolic mechanisms associated with fatty acid biosynthesis during *Styrax tonkinensis* kernel development. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(14), 6053-6063. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11262>
- Wu, Q., H. Yuan, L. Zhang, Y. Zhang. (2012). Recent advances on multidimensional liquid chromatography–mass spectrometry for proteomics: From qualitative to quantitative analysis—A review. *Analytica Chimica Acta* 731:1-10
- Wu, Y. and H. Bin. (2009). Simultaneous determination of several phytohormones in natural coconut juice by hollow fiber-based liquid–liquid–liquid microextraction-high performance liquid chromatography 1216(45):7657–7663. doi:10.1016/j.chroma.2009.09.008
- Xiao, K., J. Chen, Q. He, Y. Wang, H. Shen and L. Sun. (2020). DNA Methylation Involved in Pepper (*Capsicum annuum* L.) Fruit Ripening Regulation and Interacts with Phytohormones. *Journal of Experimental Botany* 71(6):1928–1942 doi:10.1093/jxb/eraa003
- Xiao, S. and M.-L. Chye. (2011). New roles for acyl-CoA-binding proteins (ACBPs) in plant development, stress responses and lipid metabolism. *Progress in Lipid Research* 50:141–151.
- Xiao, Y., P. Xu, H. Fan, L. Baudouin, W. Xia, S. Bocs, J. Xu, Q. Li, A. Guo, L. Zhou, J. Li, Y. Wu, Z. Ma, A. Armero, A. E. Issali, N. Liu, M. Peng and Y. Yang. 2017. The genome draft of coconut (*Cocos nucifera*). *GigaScience* 6:1–11.
- Yang Y., Bocs S., Fan H., Armero A., Baudouin L., Xu P., Xu J., This D., Hamelin C., Iqbal A., Qadri R., Zhou L., Li J., Wu Y., Ma Z., Issali A. E., Rivallan R., Liu N., Xia W., Peng M. and Xiao Y. (2021). Coconut genome assembly enables evolutionary analysis of palms

- and highlights signaling pathways involved in salt tolerance. *Communications Biology* 4(105) <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01593-x>
- Yang, Y., M. A. Saand, W. B. Abdelaal, J. Zhang, Y. Wu, J. Li, H. Fan, F. Wang. (2020). iTRAQ-based comparative proteomic analysis of two coconut varieties reveals aromatic coconut cold-sensitive in response to low temperature. *Journal of Proteomics* 220:103766. doi:10.1016/j.jprot.2020.103766
- Ye, Z.; Yu, J.; Yan, W.; Zhang, J.; Yang, D.; Yao, G.; Liu, Z.; Wu, Y.; Hou, X. Integrative ITRAQ-Based Proteomic and Transcriptomic Analysis Reveals the Accumulation Patterns of Key Metabolites Associated with Oil Quality during Seed Ripening of *Camellia oleifera*. *Hortic. Res.* **2021**, 8, 157.
- Yong, J. W. H., L. Ge, Y. F. Ng and S. N. Tan. (2009). The Chemical Composition and Biological Properties of Coconut (*Cocos nucifera* L.) Water. *Molecules* 14:5144-5164 doi:10.3390/molecules14125144
- Yoon, J., L.-H. Cho, W. Tun, J.-S. Jeon and G. An. (2020). Sucrose signaling in higher plants. *Plant Science*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110703>
- Yousefi, K.; Abdullah, S.N.A.; Hatta, M.A.M.; Ling, K.L. Genomics and Transcriptomics Reveal Genetic Contribution to Population Diversity and Specific Traits in Coconut. *Plants* **2023**, 12, 1913. <https://doi.org/10.3390/plants12091913>
- Yu, A., Li, F., Liu, A. (2020). Comparative proteomic and transcriptomic analyses provide new insight into the formation of seed size in castor bean. *BMC Plant Biology*, 20(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-2249-1>
- Yuniati, R., Subchan, P., Riawan, W., Khrisna, M. B., Restiwijaya, M., Dyan Kusumaningrum, N. S., & Nur, M. (2021). Topical ozonated virgin coconut oil improves wound healing and increases HSP90 α , VEGF-A, EGF, bFGF, and CD34 in diabetic ulcer mouse model of wound healing. *F1000Research*, 9, 580. <https://doi.org/10.12688/f1000research.22525.3>
- Zhang D, Liu T, Sheng J, Lv S and Ren L. 2021. TMT-Based quantitative proteomic analysis reveals the physiological regulatory networks of embryo dehydration protection in Lotus (*Nelumbo nucifera*). *Frontiers in Plant Science* 12:792057. doi: 10.3389/fpls.2021.792057
- Zhang, S., A. Ghatak, M. M. Bazargani, P. Bajaj, R. K. Varshney, P. Chaturvedi, D. Jiang and W. Weckwerth. 2021. Spatial distribution of proteins and metabolites in developing

- wheat grain and their differential regulatory response during the grain filling process. *The Plant Journal* 107:669–687
- Zhang, W., X. Li, L. Li, Y. Tang, W. Qi, X. Liu, L. Qiao, W. Wang and X. Jia. (2017). A label-free quantitative proteomic investigation reveals stage-responsive ripening genes in apricot fruits. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* DOI: 10.1080/14620316.2016.1265469
- Zhang, Y., W. Chen, H. Chen, Q. Zhong, Y. Yun, and W. Chen. (2020). Metabolomics analysis of the deterioration mechanism and storage time limit of tender coconut water during storage. *Foods* 9:46. doi:10.3390/foods9010046
- Zhao, X., Xiu, J., Li, Y., Ma, H., Wu, J., Wang, B., & Guo, G. (2017). Characterization and Expression Pattern Analysis of the T-Complex Protein-1 Zeta Subunit in *Musca domestica* L (Diptera). *Journal of Insect Science*, 17(4). <https://doi.org/10.1093/jisesa/iex063>
- Zheng, Y., Y. Jin, Y. Yuan, D. Feng, L. Chen, D. Li and P. Zhou. (2019). Identification and function analysis of a type 2 diacylglycerol acyltransferase (DGAT2) from the endosperm of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Gene* 702:75–82.
- Zhou, Z., Lin, B., Tan, J., Hao, P., Hua, S., & Deng, Z. (2022). Tandem Mass Tag-Based Quantitative Proteomics Reveals Implication of a Late Embryogenesis Abundant Protein (BnLEA57) in Seed Oil Accumulation in *Brassica napus* L. *Frontiers in Plant Science*, 13, 907244. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.907244>
- Zulu, N. N., Zienkiewicz, K., Vollheyde, K., & Feussner, I. (2018). Current trends to comprehend lipid metabolism in diatoms. *Progress in Lipid Research*, 70, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.03.001>

ANEXOS

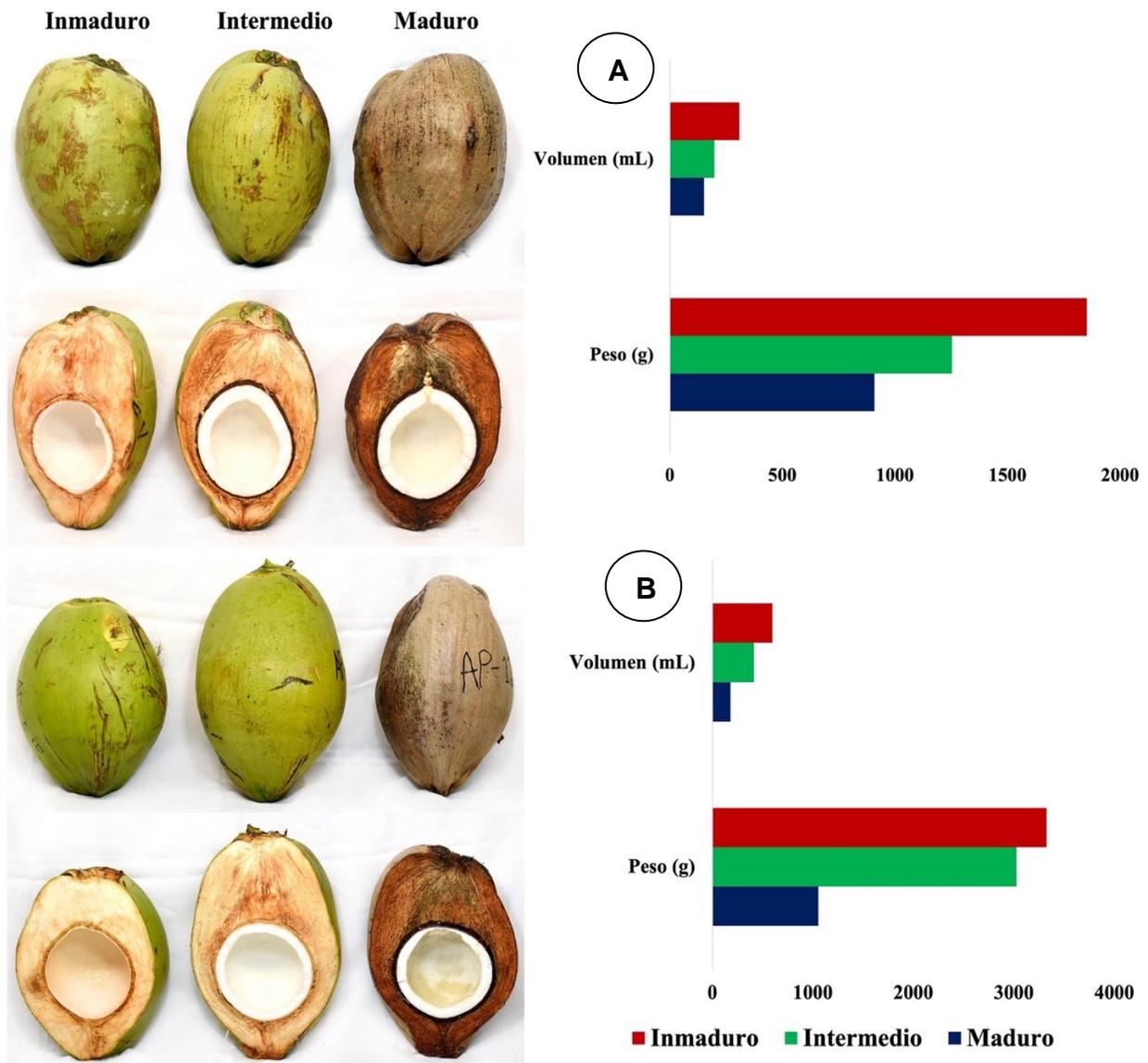


Figura 26. Perfil de dos cultivares de coco durante la maduración, volumen de agua (mL) y peso fresco (g). A) Enano verde de Yucatán B) Alto del Pacífico mexicano. Frutos inmaduros: (6-8 meses) después de la polinización (MDP); Intermedios: (9-10 MDP); Maduros: (11-14 MDP)

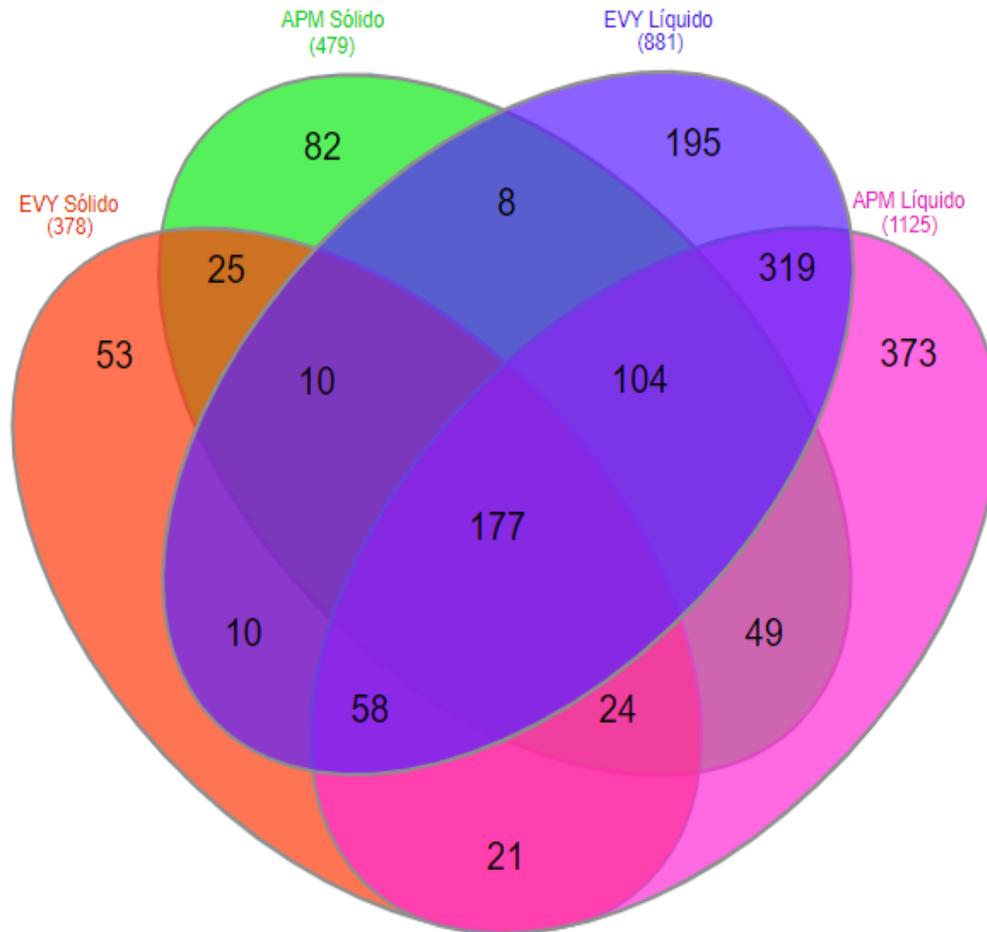


Figura 27. Análisis de Venn para la distribución de las proteínas en los diferentes cultivares y los dos endospermos. Endospermo sólido enano Verde de Yucatán (mamey), endospermo líquido enano Verde de Yucatán (azul), endospermo sólido alto del pacífico mexicano (verde), endospermo líquido alto del pacífico mexicano (rosa)

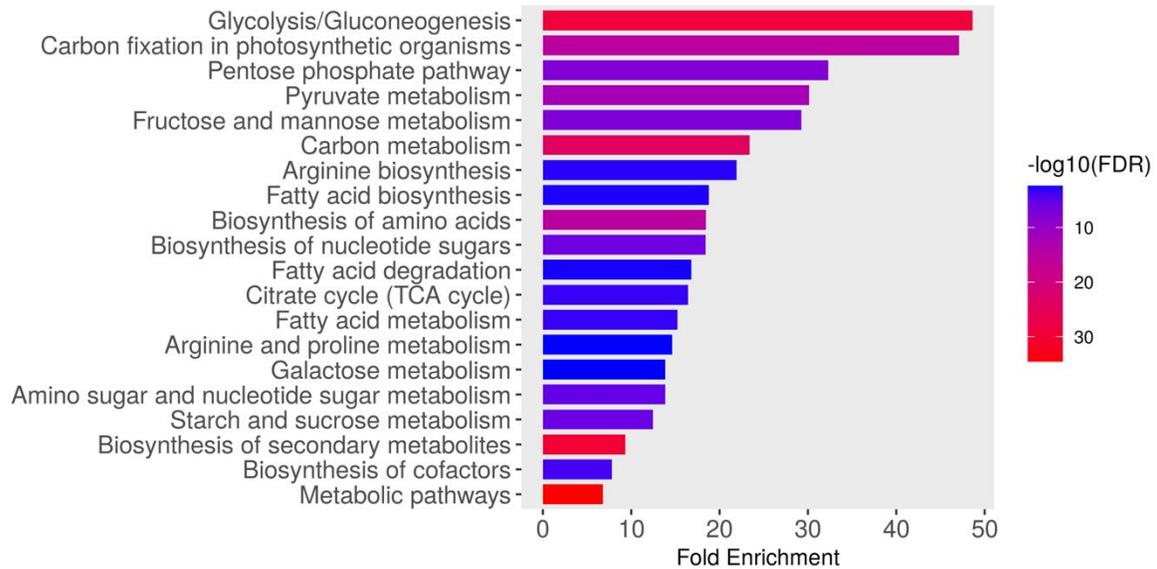


Figura 28. Ontología de genes de las proteínas compartidas entre los endospermos sólido y líquido de los cultivares EVY y APM en los tres estadios de maduración.



Figura 29. Perfil del endospermo sólido y líquido del coco en el estadio maduro.

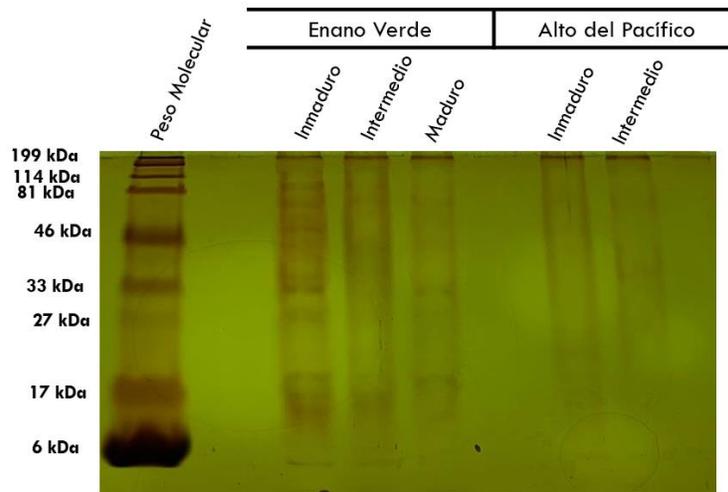


Figura 30. Perfil electroforético en SDS-PAGE de 12% de polipéptidos de dos cultivares teñido en plata. Enano verde de Yucatán y Alto del Pacífico mexicano. A la izquierda los diferentes pesos moleculares

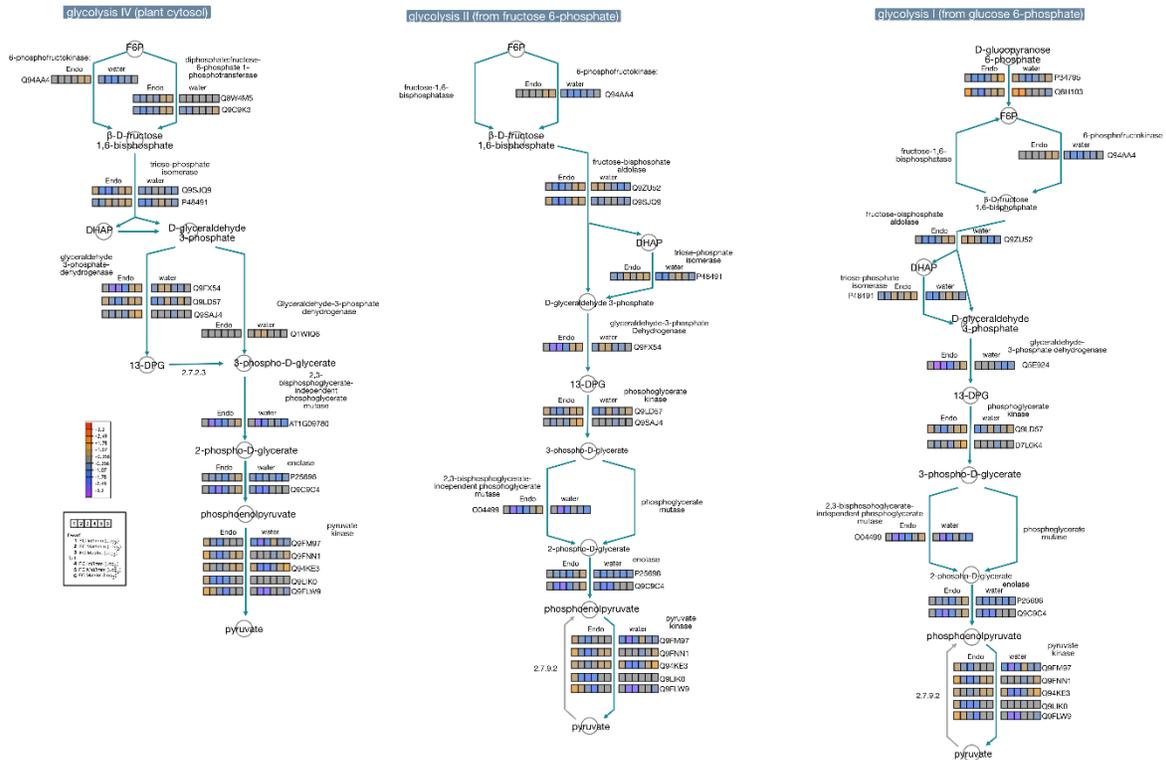


Figura 32. Comparación de la glucólisis de los endospermos sólido y líquido en estadios inmaduro, intermedio y maduro de los cultivares EVY y APM. (A) Proteínas citosólicas implicadas en la glucólisis IV; (B) glucólisis II a partir de fructosa 6-fosfato; (C) glucólisis I a partir de glucosa 6-fosfato.

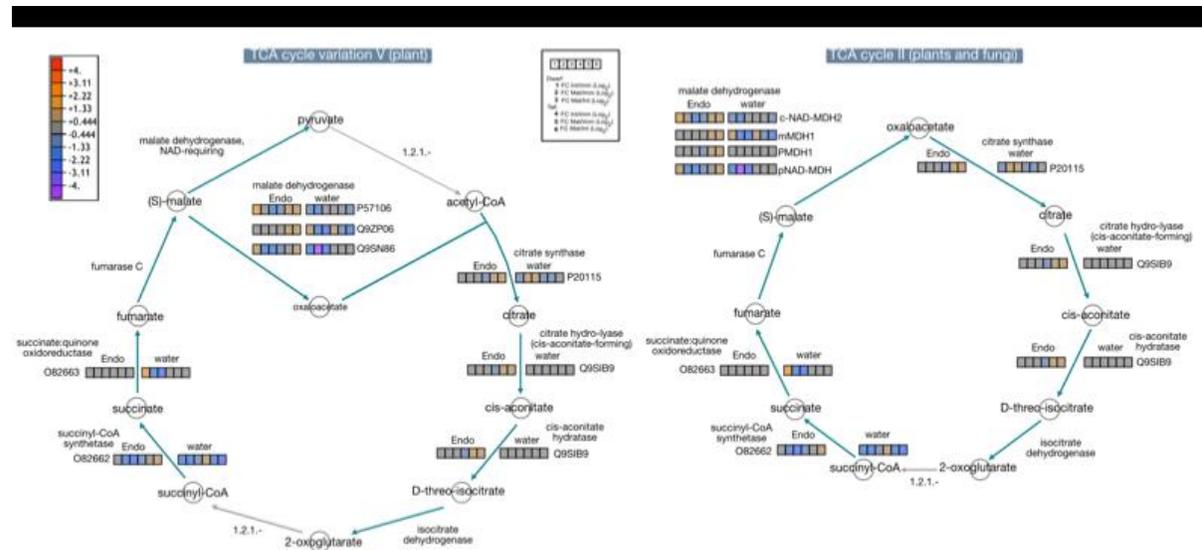


Figura 33. Comparación del TCA de los endospermos sólido y líquido en estadios inmaduro, intermedio y maduro de los cultivares EVY y APM. (A) TCA variación V; (B) TCA ciclo II.

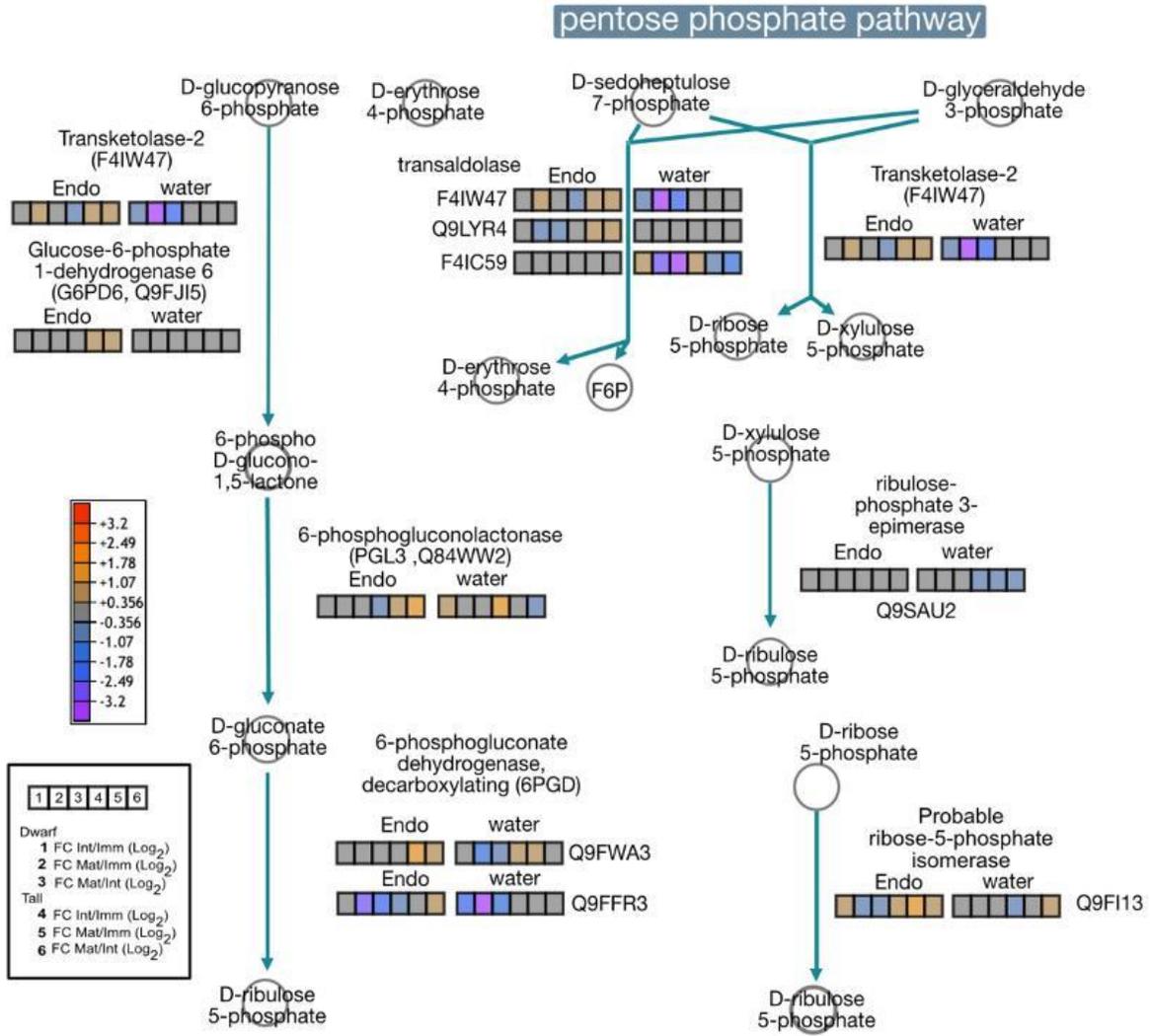


Figura 34. Comparación de las rutas de las pentosas fosfato de los endospermos sólido y líquido en estadios inmaduro, intermedio y maduro de los cultivares EVY y APM.

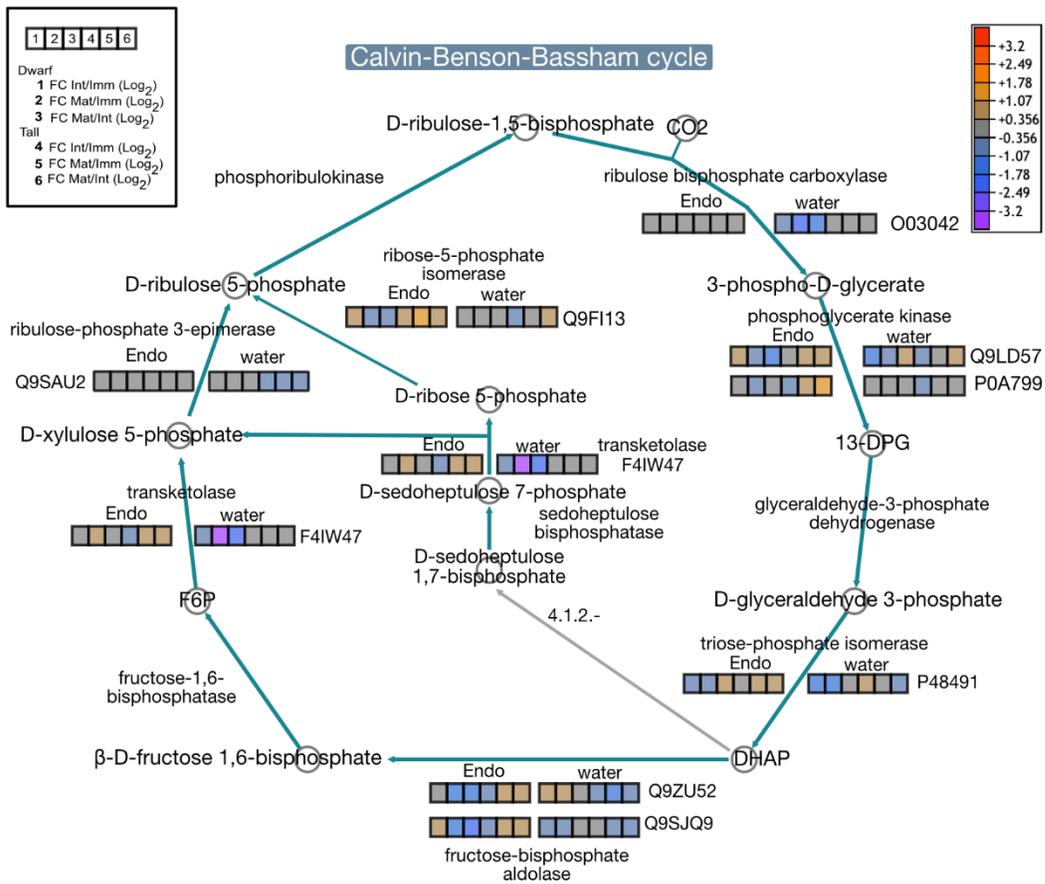


Figura 35. Comparación del ciclo de Calvin-Benson de los endospermos sólido y líquido en estadios inmaduro, intermedio y maduro de los cultivares EVY y APM.