

Tesis Doctoral

# Caracterización de genes codificantes de glicosidasas de pared celular relacionadas al crecimiento y a la maduración de prunoideas

Di Santo, Mariana Carolina

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Di Santo, Mariana Carolina. (2011). Caracterización de genes codificantes de glicosidasas de pared celular relacionadas al crecimiento y a la maduración de prunoideas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Di Santo, Mariana Carolina. "Caracterización de genes codificantes de glicosidasas de pared celular relacionadas al crecimiento y a la maduración de prunoideas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

# **CARACTERIZACIÓN DE GENES CODIFICANTES DE GLICOSIDASAS DE PARED CELULAR RELACIONADAS AL CRECIMIENTO Y A LA MADURACIÓN DE PRUNOIDEAS**

Tesis presentada para optar al Título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires  
en el área de Química Biológica

Mariana Carolina Di Santo

Director: Gabriel Oscar Sozzi

Director asistente: Eduardo Antonio Pagano

Consejero de estudios: Juan Carlos Calvo

Lugar de trabajo: Cátedra de Bioquímica, Facultad de Agronomía Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2011

# CARACTERIZACIÓN DE GENES CODIFICANTES DE GLICOSIDASAS DE PARED CELULAR RELACIONADAS AL CRECIMIENTO Y A LA MADURACIÓN DE PRUNOIDEAS

## RESUMEN

La arabinosa es el principal azúcar neutro no celulósico de la pared celular de durazno (*Prunus persica* (L.) Batsch) y de ciruela japonesa (*Prunus salicina* Lindl), observándose una pérdida neta de arabinosa tanto durante la maduración y el ablandamiento como en etapas previas a dicho proceso. Las  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas y  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas/ $\beta$ -D-xilosidasas son enzimas responsables de estas modificaciones en la pared celular. En este trabajo se caracterizaron genes codificantes de glicosidasas de pared celular de *Prunus persica* [L.] Batsch y de *Prunus salicina* Lindl. Se obtuvieron clones completos de ADNc desconocidos de durazno (*PpARF1*) y de ciruela japonesa (*PsARF/XYL*). Además, el gen *PsARF/XYL* fue clonado y secuenciado. *PsARF/XYL* presentó dos variantes de ARNm maduro, uno completamente splicado y otro con un intrón terminal retenido, probablemente debido a splicing alternativo. La proteína deducida a partir de este último, resulta en un péptido truncado en su porción carboxi-terminal que podría alterar su funcionalidad pero que no implica la pérdida de los aminoácidos del sitio activo. También se obtuvieron secuencias parciales de un gen de ciruelo japonés denominado *PsARF1* (por su homología con *PpARF1*) el cual fue incluido en los análisis de expresión génica. Reacciones de RT-PCR para el gen *PsARF/XYL* en distintas fases de la ontogenia y maduración del fruto reveló una expresión diferencial de los dos transcriptos alternativamente splicados. Aunque *PsARF1* se expresa durante el climaterio, se inhibe fuertemente ante tratamientos con etileno. En todos los casos analizados, los transcriptos se detectaron en otros tejidos de la planta, tanto vegetativos como reproductivos. Los resultados sugieren fuertemente que la expresión de estos genes de pared celular se encuentra regulada a nivel transcripcional y postranscripcional en distintos tejidos y estados de desarrollo y que el etileno, hormona de la maduración en frutos climatéricos, podría participar en esa regulación.

**Palabras claves:**  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa,  $\beta$ -D-xilosidasa, *Prunus persica*, *Prunus salicina*, maduración, ablandamiento, etileno, expresión génica, splicing.

# CHARACTERIZATION OF GENES ENCODING CELL WALL GLYCOSIDASES RELATED TO GROWTH AND RIPENING OF PRUNOIDEAS

## ABSTRACT

Arabinose is the major non-cellulosic neutral sugar in the peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) and Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl) cell wall and a net loss of arabinose residues occurs during ripening and softening and even in stages prior to this process. The  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase/ $\beta$ -D-xylosidases are enzymes responsible for these changes in the cell wall. In this work we characterized genes encoding cell wall glycosidases of *Prunus persica* [L.] Batsch and *Prunus salicina* Lindl. We obtained unknown full cDNA clones of peach (*PpARF1*) and Japanese plum (*PsARF/XYL*). In addition, the gene *PsARF/XYL* was cloned and sequenced. *PsARF/XYL* presented two variants of the mRNA, a completely spliced and another terminal intron retained probably due to alternative splicing. The protein deduced from the latter, resulting in a truncated peptide at its carboxy-terminal portion that could affect their functionality but that does not involve the loss of active site amino acids. Partial sequences of a gene called *PsARF1* of Japanese plum (given its homology with *PpARF1*) were also obtained, which was included in the analysis of gene expression. *PpARF1* expression was detected in mesocarp throughout development and ripening at different levels. RT-PCR reactions for gene *PsARF/XYL* at different ontogenic and fruit ripening stages showed a differential expression of two alternatively spliced transcripts. Although *PsARF1* is expressed during the climacteric stage, it is strongly inhibited when ethylene treatment is applied. In all cases analyzed, transcripts were detected in other vegetative and reproductive tissues. The expression of both *PsARF/XYL* transcripts was detected in flower organs, roots and leaves. Results strongly suggest that the expression of these cell wall genes is regulated at the transcriptional and postranscriptional level in different tissues and developmental stages and that ethylene, the ripening hormone in climacteric fruit, could be involved in the regulation of these enzymes.

**Keywords:**  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase,  $\beta$ -D-xylosidase, *Prunus persica*, *Prunus salicina*, ripening, softening, ethylene, gene expression, splicing.

## Agradecimientos

*Por orden alfabético:*

*A mi tutor, el Dr. Juan Carlos Calvo, un gran Profesor, generoso y amable, que me brindó una importante guía durante el transcurso de esta tesis. A mi codirector, el Dr. Eduardo Pagano, por la confianza y el apoyo incondicional, por los consejos y fundamentalmente por darme este querido lugar en la cátedra de bioquímica. A mi director, el Dr. Gabriel Sozzi, por valorar mi capacidad para ser parte de este proyecto y darme la oportunidad de realizar esta tesis. Al Lic. Gustavo Trincherro por darme su conocimiento y su tiempo generosamente, jamás lo olvidaré.*

*A demás quisiera agradecer enormemente:*

*A los integrantes de la cátedra de Fruticultura de la FAUBA, sin los cuales esta tesis nunca se hubiera llevado a cabo. Al Dr. Alfredo Curá por los consejos y la ayuda experimental. A la FAUBA, expreso mi gratitud por haberme dado este lugar tan grato para desarrollar mi trabajo y a Agronomitos por cuidar maravillosamente a mis hijos. A la FCEyN, por los recuerdos, parecidos a los de un hogar que siempre se extraña y por acompañarme, en esta carrera de doctorado. A los docentes de la FCEyN, por la admiración que me generaban en mis épocas de estudiante y la consiguiente necesidad de trabajar para ser mejor. Al CONICET por su apoyo permanente en mi formación y en la concreción de esta tesis. A mis compañeros y amigos del laboratorio: Natasha, Verónica, Alina, Patricia, Andrés, Jesica, Vanesa, Lucía, Alberto, Agustín, Daniela, Melina, Pedro, Francisco, Gloria, Soledad, Romina, Florencia, Matías, Ivana, Juan, Silvina y Javier. Gracias por su compañía y las charlas compartidas. Sin ustedes hubiera sido imposible llevar adelante mis días. Los quiero mucho!!!.*

*En especial, quiero agradecer:*

*A mis padres Omar y Mariana, por apoyarme durante tantos años de estudio, por la paciencia, por verme de esa forma tan especial, por quererme tanto. Gracias por el ejemplo para ser y vivir. Gracias por tantas innumerables cosas...A mis hermanos Carina, Laura y Jorge que son un regalo de la vida, lo mejor es poder compartir toda mi vida con ustedes. Gracias por ayudarme más de una vez. A mi esposo Juan por el inmenso apoyo, por ser el motor de mi vida, mis ilusiones, mi felicidad. Gracias por estar orgulloso de mis logros que son nuestros. A mis hijos Luchi y Facu, que tuvieron que perder muchas horas de mamá para poder llegar a este punto pero que estoy segura capitalizarán en el futuro todo mi esfuerzo puesto en el estudio y la vocación.*

*Mi mayor y más bello descubrimiento es verlos crecer...*

*Con todo mi amor...*

**A Lucía y Facundo**

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>2</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>4</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>5</b>
<b>INDICE</b> .....	<b>6</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>11</b>
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>13</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>13</b>
1.1 El cultivo de Prunoideas en Argentina .....	13
1.2 Características generales de los frutos .....	14
1.2.1 Drupas.....	15
1.2.1.1 Características de crecimiento .....	15
1.3 El etileno y la maduración en frutos climatéricos.....	17
1.4 Parámetros de madurez utilizados durante la postcosecha .....	20
1.5 Estructura y composición de la pared celular vegetal .....	21
1.6 El metabolismo de la pared celular y el ablandamiento del fruto.....	23
1.7 Enzimas que modifican la pared celular en Prunoideas .....	26
1.8 $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas y $\beta$ -D-xilosidasas de pared celular .....	27
1.9 Genes de interés .....	28
1.10 Regulación de genes vegetales mediante splicing alternativo (SA).....	29
1.10.1 Generalidades .....	29
1.10.2 Propiedades de los intrones vegetales.....	32

1.10.3 Función de las secuencias ricas en U en el reconocimiento de los intrones .....	32
1.10.4 Modelos de definición de exones versus modelos de definición de intrones .....	33
1.10.5 La retención de intrón es la forma más común de SA en plantas.....	34
1.10.6 Ejemplos de SA en plantas .....	34
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>36</b>
<b>OBJETIVOS E HIPÓTESIS .....</b>	<b>36</b>
2.1 Objetivo general.....	36
2.2 Objetivos específicos.....	36
2.3 Hipótesis.....	37
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>38</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
3.1 Material vegetal .....	38
3.2 Medición de la producción de etileno .....	39
3.3 Determinaciones de firmeza y color del fruto .....	40
3.4 Tratamiento de los frutos con 1-MCP y etileno .....	40
3.5 Determinación de la actividad de $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa .....	41
3.6 Extracción de ARNm, cuantificación y fabricación de ADNc.....	41
3.7 Diseño de cebadores y condiciones de PCR para la clonación de ADNc PpARF1 .....	42
3.8 Diseño de cebadores y condiciones de PCR para la clonación de PsARF/XYL .....	43
3.9 Electroforesis en geles de agarosa y tinción de ácidos nucleicos.....	45
3.10 Purificación de bandas a partir de geles de agarosa.....	45
3.11 Obtención de bacterias competentes.....	45
3.12 Ligación de los productos de PCR y transformación de bacterias .....	46



3.13 PCR de Colonias.....	46
3.14 Extracción de plásmidos y purificación .....	47
3.15 Análisis bioinformático de las secuencias .....	47
3.16 Extracciones de ADN genómico .....	48
3. 17 RT-PCR semicuantitativa .....	49
3.18 RACE 3' (Amplificación rápida de extremos 3' de ADNc).....	50
3.19 RACE 5' (Amplificación rápida de extremos 5' de ADNc).....	51
3.19.1 Síntesis de ADNc RACE 5' .....	52
3.19.2 'Tailing' homopolimérico de ADNc RACE 5' .....	53
3.19.3 PCR del ADNc- poli(C) .....	53
3.19.4 PCR anidada RACE 5' .....	53
3.20 Análisis densitométrico de bandas .....	54
3.21 Tratamientos con DNasa I .....	54
<b>3.22 Extracción de ARN total .....</b>	<b>54</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>56</b>
<b>Clonación y caracterización de ADNc PpARF1 de Prunus persica (L.) Batsch 'Springcrest'</b>	
4.1 Obtención de la secuencia de ADNc PpARF1.....	56
4.2 Análisis bioinformático de la secuencia de ADNc PpARF1.....	58
4.3 Análisis filogenético de PpARF1 .....	60
4.4 Análisis de la actividad de $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa.....	62
4.5 Expresión de los genes PpARF1 y PpARF/XYL de Prunus persica.....	65
4.5.1 Patrón de expresión temporal en mesocarpo .....	65
4.5.2 Patrón de expresión espacial en el fruto .....	67

4.5.3 Patrón de expresión en otros tejidos.....	68
<b>CAPÍTULO 5 .....</b>	<b>70</b>
<b>Clonación del gen PsARF/XYL de Prunus salicina Lindl. ‘Gigaglia’ y de dos variantes de ADNc</b>	
5.1 Reacciones de RT-PCR para la clonación de ADNc PsARF/XYL.....	70
5.2 Secuenciación y análisis de los fragmentos de RT-PCR.....	71
5.4 Tratamientos con DNasa I.....	76
5.5 RACE 3’ para las dos variantes de ARNm ‘Vn’ y ‘Vri’.....	77
5.6 RACE 5’ y obtención de las secuencias completas de ADNc.....	81
5.7 Clonación del gen PsARF/XYL de Prunus salicina ‘Gigaglia’ .....	84
5.8 Organización genómica de PsARF/XYL de Prunus salicina ‘Gigaglia’ .....	85
5.9 Análisis de las proteínas deducidas a partir de las variantes de ADNc.....	90
<b>CAPÍTULO 6.....</b>	<b>93</b>
<b>Análisis de la expresión de los genes PsARF1 y PsARF/XYL de Prunus salicina Lindl ‘Gigaglia’</b>	
6.1 Patrón de expresión temporal en mesocarpo .....	93
6.2 Patrón de expresión espacial de PsARF/XYL y PsARF1 en el fruto.....	98
6.3 Patrón de expresión en otros tejidos.....	99
6.4 Efecto del 1-MCP y del etileno en frutos pre-climatéricos .....	101
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>104</b>
<b>CAPÍTULO 7.....</b>	<b>104</b>
7.1 La actividad de $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa se incrementa durante la maduración de durazno y varía topográficamente dentro del fruto.....	104
7.2 El gen PpARF1 de durazno codifica una glicosilhidrolasa (GH) perteneciente a la familia 51.....	105
7.3 Se pueden aislar al menos dos variantes de ADNc para el gen <i>PsARF/XYL</i> de ‘Gigaglia’ .....	106

7.4 El gen <i>PsARF/XYL</i> de ciruelo japonés codifica una GH de la familia 3 y su estructura es similar a una $\beta$ -glucosidasa putativa de <i>Ricinus communis</i> .....	108
7.11 Las variantes de ADNc de <i>PsARF/XYL</i> provienen probablemente de transcritos alternativamente spliceados.....	109
7.5 Los genes <i>PpARF1</i> y <i>PpARF/XYL</i> de durazno se expresan diferencialmente durante el crecimiento y la maduración del fruto.....	111
7.6 La expresión de los genes <i>PpARF1</i> y <i>PpARF/XYL</i> de durazno y de sus homólogos en ciruelo japonés varía con la localización del tejido en el fruto .....	113
7.7 Los genes <i>PpARF1</i> y <i>PpARF/XYL</i> y sus homólogos de ciruelo japonés se expresan en tejidos vegetativos y reproductivos .....	114
7.8 Las dos variantes de ARNm del gen <i>PsARF/XYL</i> se expresan durante el crecimiento del fruto y en otros tejidos .....	115
7.9 La variante totalmente splicada de ARNm del gen <i>PsARF/XYL</i> se induce durante el climaterio y al aplicar etileno.....	117
7.12 El gen <i>PsARF/XYL</i> podría codificar proteínas activas con diferente afinidad al sustrato o ser regulado negativamente por SA .....	120
<b>CAPÍTULO 8.....</b>	<b>123</b>
<b>Consideraciones finales.....</b>	<b>123</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>125</b>

## ABREVIATURAS

---

<b>AAP</b>	Abriged Anchor Primer
<b>ABA</b>	Ácido abscísico
<b>ACC</b>	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN copia
<b>Amp</b>	Ampicilina
<b>ARF</b>	$\alpha$ -L-arabinofuranósido arabinofuranohidrolasa
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>Asp</b>	Aspartato
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>AUAP</b>	Abridged Universal Amplification Primer
<b>BSA</b>	seroalbúmina bovina
<b>CBD</b>	Carbohydrate Binding Domain
<b>CDTA</b>	1,2-diaminociclohexano-N,N,N,N-ácidotetraacético
<b>cv.</b>	Cultivar
<b>dCTP</b>	deoxicitidín trifosfato
<b>Ddpf</b>	Días después de plena floración
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>DNAsa</b>	Desoxirribonucleasa
<b>dNTP</b>	deoxinucleósido trifosfato
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>dUTP</b>	deoxiuridín trifosfato
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ESE</b>	Exonic splicing enhancer
<b>Glu</b>	Glutamato
<b>GH</b>	Glicosilhidrolasa
<b>GSP</b>	Gen Specific Primer
<b>ha</b>	hectárea
<b>IPTG</b>	Isopropil-1-tio- $\beta$ -D-galactósido
<b>kDa</b>	kiloDalton

<b>LB</b>	medio de cultivo Luria Bertani
<b>1-MCP</b>	1-Metil-Ciclopropeno
<b>MET</b>	Metionina
<b>nm</b>	nanómetro
<b>ORF</b>	Open Reading Frame
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>pl</b>	punto Isoeléctrico
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>ppm</b>	partes por millón
<b>PTC</b>	Premature stop codon
<b>RACE</b>	Rapid Amplification of cDNA Ends
<b>RNAsa</b>	ribonucleasa
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>RT</b>	Reverse Transcriptase
<b>SA</b>	Splicing Alternativo
<b>SAM</b>	S-adenosil metionina
<b>SDS</b>	dodecil sulfato de sodio
<b>ss</b>	splice site
<b>SST</b>	Sólidos Solubles Totales
<b>TAE</b>	buffer Tris-Acetato-EDTA
<b>TE</b>	buffer Tris-EDTA
<b>TdT</b>	deoxinucleotidil transferasa terminal
<b>UAP</b>	Universal Amplification Primer
<b>UTR</b>	Untranslated region
<b>Xgal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido
<b>XIL</b>	xylan 1,4- $\beta$ -xylosidase
<b>hnRNP</b>	heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein
<b>NMD</b>	Nonsense-mediated RNA decay
<b>snRNP</b>	small nuclear Ribonucleoprotein Particles

# CAPÍTULO 1

---

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 El cultivo de Prunoideas en Argentina

Si bien la “fruticultura de carozo” no es la actividad frutícola más importante a nivel nacional - encabezada por la producción de cítricos y de Maloideas – el cultivo de Prunoideas se extiende ampliamente en las regiones argentinas de Cuyo (principalmente Mendoza), del Litoral (en especial Buenos Aires) y en la región sur (en particular en el Valle del Río Negro y Neuquén). A demás, existen superficies cultivadas en el norte del país (Misiones y Jujuy) y en localidades como el valle de Los Antiguos en la provincia de Santa Cruz (producción de cerezas). Se proyecta un incremento en la superficie cultivada con duraznos y ciruelos esperándose para el año 2015 más de 37.000 y de 33.000 ha respectivamente (Sozzi, 2007).

Las exportaciones de durazno han experimentado un incremento importante en los últimos años, ya que además de la oferta a los países del Mercosur, se suman las demandas del Reino Unido, de España y de los Países Bajos. El duraznero se cultiva en regiones climáticamente diversas, pero la mayor concentración se presenta en las provincias de Mendoza, Buenos Aires, Santa Fe, Río Negro y Córdoba. En los últimos años, se han incorporado otras zonas al panorama productivo como Corrientes y Salta. Estas provincias se han concentrado en el desarrollo de cultivares de maduración temprana y extra-temprana. Entre las especies frutales de clima templado, el duraznero es uno de los que presenta mayor riqueza varietal y, en la Argentina, se ve potenciado por la gran superficie y tierras con clima que favorece su producción en diferentes momentos del año.

La superficie cultivada con ciruelos se expandió notablemente en los últimos años, especialmente en las provincias de Mendoza y de Río Negro, donde se han radicado grandes emprendimientos y se han ampliado los ya existentes, con lo cual se logró una mayor capacidad de producción y de almacenamiento. Esta especie cuenta con una amplia gama de variedades de maduración temprana a tardía. Ofrece frutos jugosos,

medianos a grandes, de color rojo oscuro a ambar según los cultivares, alto contenido de azúcar y baja acidez. En su mejoramiento, se pone énfasis en lograr tolerancia al estrés mecánico generado durante el transporte y a largos períodos de conservación en frío. Entre los desafíos productivos más generalizados que enfrenta el sector se encuentran ciertas deficiencias en la calidad de la fruta, la marcada limitación en el tiempo admisible de conservación frigorífica de duraznos y ciruelas japonesas por desórdenes fisiológicos (un problema de alcance mundial) que limita las exportaciones a mercados de ultramar, la relativamente escasa oferta de pies de injerto y de variedades adaptadas a cada zona de producción que den lugar a fruta de calidad de exportación y las pérdidas producidas por adversidades meteorológicas (heladas y granizo), a las que se suman los problemas fitosanitarios y las plagas cuarentenarias (Sozzi, 2007).

## **1.2 Características generales de los frutos**

Los frutos son una parte esencial de la dieta humana y de la nutrición, suplementando vitaminas, minerales, fibras, lípidos y otros compuestos bioactivos para la promoción de la salud y la prevención de enfermedades. Algunos frutos, tales como damascos, duraznos, manzanas y bayas no solo son ricos en nutrientes esenciales sino también en fibras y azúcares naturales.

Los frutos son normalmente cosechados luego de alcanzar su madurez fisiológica, cuando el desarrollo se ha completado y el crecimiento cesa. Luego, el fruto madura adquiriendo características organolépticas de consumo. Durante este proceso el fruto experimenta profundos cambios de textura, color, sabor y aroma. Los cambios texturales que ocurren durante la maduración de la mayoría de los frutos están relacionados con los cambios de estructura y composición de la pared celular (Harker *et al.*, 1997). Estos cambios incluyen modificaciones de la estructura y de la composición de los polisacáridos constituyentes que han sido correlacionadas con la expresión de un conjunto de hidrolasas y transglucosidasas, y con la potencial alteración de interacciones covalentes y no covalentes entre las distintas clases de polisacáridos.

Los polisacáridos de la pared celular se clasificaron en: pectinas, glicanos de matriz y celulosas. Otros constituyentes adicionales de la pared, menores por la proporción de su participación más no por su importancia metabólica, incluyen un amplio rango de proteínas enzimáticas, compuestos hidrofóbicos y moléculas inorgánicas.

Se ha observado en la pared celular solubilización y despolimerización de polisacáridos de la mayoría de los frutos frescos, pero el grado y el tiempo que tardan estos procesos en ocurrir pueden variar entre especies e incluso entre cultivares distintos de una misma especie, causando diferentes tasas de ablandamiento.

### **1.2.1 Drupas**

Las drupas están compuestas por un mesocarpo grueso y carnoso y un endocarpo cuyo tejido se caracteriza por ser pétreo, duro, conformado por varias capas de esclereidas, constituyendo la parte del fruto que alcanza primero el tamaño máximo. El epicarpo es el tejido externo vulgarmente conocido como “piel” (Chalmers y Van Den Ende, 1975), cuya función principal es la de protección frente al estrés causado por diferentes tipos de agentes bióticos y abióticos.

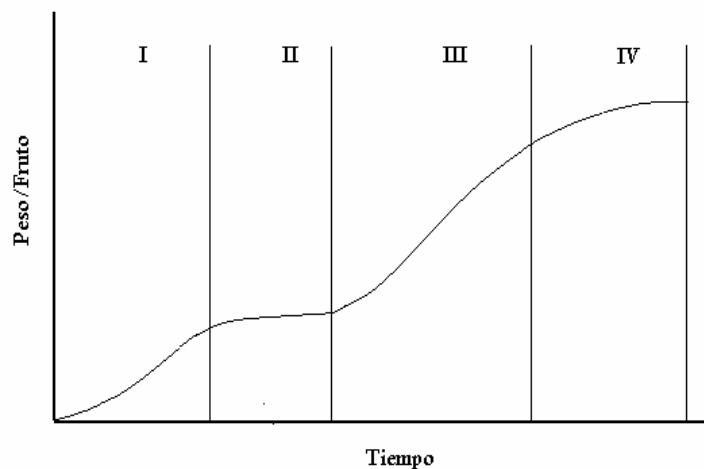
El duraznero (*Prunus persica* (L.) Batsch), debido a su fruto, es la especie de la subfamilia *Prunoideae* más valorada en la fruticultura. El mejoramiento genético de las especies del género *Prunus* incluye el logro de un fruto de alta calidad con una larga vida de almacenamiento (Srinivasan *et al.*, 2005). *Prunus salicina* Lindl, también llamado ciruelo japonés, es un pequeño árbol originario de China del cual existen diferentes variedades cultivadas y cuyos frutos son consumidos frescos mayoritariamente debido a sus características de sabor y a que sus propiedades no lo hacen apto para la conservación industrial. El ciruelo japonés despertó un interés particular debido al creciente número de variedades nuevas que permiten la diversificación, tanto del momento de cosecha como de las características de la fruta.

#### **1.2.1.1 Características de crecimiento**

Los frutos de carozo poseen un patrón de crecimiento que se describe como dos curvas sigmoideas sucesivas. Este tipo de patrón se caracteriza por dos etapas de rápido crecimiento separadas por una fase intermedia en la cual el crecimiento del fruto es muy escaso. Durante la primera etapa de rápido crecimiento (fase I o etapa de crecimiento exponencial), el ovario y su contenido crecen de forma más que proporcional, salvo el embrión y el endosperma, principalmente como resultado de la división celular. Este período inmediatamente posterior a la floración es crítico para el tamaño final del fruto.



Cualquier estrés ambiental (calor, frío, deficiencias hídricas o de nutrientes) tienden a acortar esta fase y a afectar el tamaño final del fruto (Sozzi, 2007). La segunda etapa (fase II) que semeja un “plateau”, se caracteriza por el crecimiento del embrión y el endosperma, la esclerificación (“endurecimiento”) del endocarpo, y un escaso crecimiento de la pared del ovario. En esta etapa, el fruto incrementa su tamaño lentamente, pero el embrión crece rápidamente dentro del carozo en vías de esclerificación. En la tercera etapa (fase III) tiene lugar un crecimiento rápido del mesocarpo que promueve un rápido incremento en el tamaño y peso del fruto. Le sigue una cuarta etapa (fase IV) en que se produce la maduración del fruto (Sozzi, 2007). En la **Fig. 1.1** se muestra un esquema de las fases de desarrollo del fruto considerando el peso fresco del mismo y en la **Fig. 1.2** se muestran la flor y del fruto de duraznero en desarrollo. Si bien las curvas de crecimiento en drupas siguen este patrón típico, la extensión de estas fases varía según el fruto.



**Fig. 1.1:** Esquema de una curva de crecimiento típica de una drupa en desarrollo. Se indican las distintas fases de crecimiento; I: Fase de división celular, II: Esclerificación del endocarpo, III: Expansión celular, IV: maduración.



**Fig. 1.2:** Flor y fruto de durazno en desarrollo (adaptado de <http://www.inia.cl>). El fruto se encuentra en la fase I de crecimiento.

Zuzunaga *et al.* (2001) describieron los patrones de crecimiento de dos cultivares de ciruela japonesa: 'Golden Japan' y 'Santa Rosa'. En ambos cultivares el crecimiento del fruto siguió una curva sigmoidea doble. El fruto alcanzó su tamaño final en 'Santa Rosa' a las 10 semanas y en 'Golden Japan' a las 11 semanas. Durante el período completo, la tasa de crecimiento del fruto fue significativamente más alta en 'Santa Rosa' (5,46 g por semana), que en 'Golden Japan' (3,38 g por semana). Durante el desarrollo de esta tesis se realizó un seguimiento ontogénico de ciruela japonesa 'Gigaglia', cultivar autóctono y poco difundido, de maduración temprana, que resultó en curvas de crecimiento similares.

En duraznos de la variedad 'Springcrest', se describió el patrón de crecimiento de los frutos resultando, como en otras especies de Prunoideas, una curva sigmoidea doble (Tonutti *et al.*, 1997). Se determinó un primer estado S1 que corresponde a 34 días después de plena floración (Ddpf) momento donde ocurre la aparición del fruto y el final de la fase de crecimiento exponencial inicial, S2 corresponde a 39 Ddpf - fase estacionaria de crecimiento-, S3 temprano y S3 tardío corresponden a 48 Ddpf y 67 Ddpf respectivamente - fases de expansión celular -, S4 corresponde a 74 Ddpf cuando el fruto alcanza su tamaño final pero se encuentra inmaduro (etapa preclimática).

### **1.3 El etileno y la maduración en frutos climatéricos**

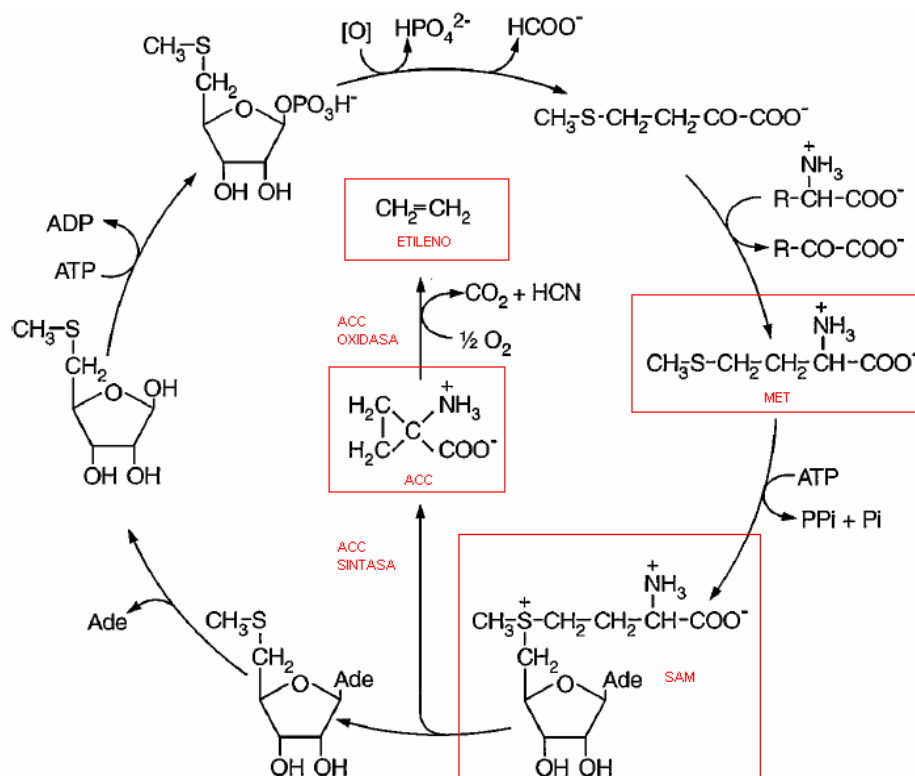
El etileno es considerado "la hormona de la maduración" en un importante grupo de frutos denominados "climatéricos". Los duraznos y ciruelas generalmente se clasifican como frutos climatéricos, dado que se caracterizan por la producción autocatalítica de etileno y un incremento de la tasa respiratoria durante la maduración, aunque existen

excepciones en las que este comportamiento no se observa. Muchos de los procesos ocurridos durante la maduración y el ablandamiento del fruto son regulados por el etileno. Esta hormona se obtiene a partir de una ruta de biosíntesis relativamente simple en la cual el aminoácido metionina (MET) se convierte en S-adenosil metionina (SAM) por adición de adenina (**Fig. 1.3**). Este paso requiere ATP y es catalizado por la enzima SAM sintetasa. A su vez, la SAM se convierte en ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), por acción de la enzima ACC sintasa. La ACC sintasa existe en varias isoformas codificadas en cada especie por una familia multigénica. La producción de ACC es el paso regulatorio clave de la ruta de la biosíntesis de etileno, por lo cual es una reacción altamente regulada. La presencia de etileno en sí aumenta la actividad de ACC sintasa provocando una producción autocatalítica del etileno. En el paso final de síntesis de etileno, el ACC es oxidado por la enzima ACC oxidasa para formar  $C_2H_4$ , por lo cual esta reacción depende de la presencia de oxígeno. Al igual que la enzima ACC sintasa, la ACC oxidasa es codificada por una familia multigénica. El nivel de la actividad de ACC oxidasa se incrementa fuertemente en frutos climatéricos en maduración y en respuesta a la exposición al etileno (Yang y Oetiker, 1998).

En general, se asume que los cambios asociados con la maduración de los frutos climatéricos, tales como las modificaciones en el color, el aroma, la textura y el sabor, son controlados por el aumento de la producción de etileno (Lelièvre *et al.*, 1997). En frutos no climatéricos, el etileno tiene una implicación baja durante la maduración y se cree que tanto las poliaminas como el ácido abscísico (ABA) podrían desempeñar un papel importante en el desarrollo y la maduración de estos frutos (Zuzunaga *et al.*, 2001). Aunque los duraznos y ciruelas generalmente se clasifican como frutos climatéricos, se han observado, sin embargo, dos comportamientos distintos de maduración al analizar diferentes cultivares. Abdi *et al.* (1997), encontraron que los cultivares de ciruela japonesa 'Beauty' y 'Gulfruby' mostraban patrones típicos de maduración de los frutos climatéricos, con un pico en la producción de etileno y de  $CO_2$ , mientras que los cultivares 'Shiro' y 'Rubyred' exhibieron un fenotipo con "climaterio suprimido", sin ningún aumento en la tasa de respiración o en la producción de etileno relacionados a la maduración.

Zuzunaga *et al.* (2001), describieron un cultivar de ciruelo japonés de climaterio suprimido ('Golden Japan') con baja emisión de etileno durante el crecimiento y la

maduración del fruto. En contraste, la emisión de etileno se incrementaba en ciruelas ‘Santa Rosa’ luego de 9 semanas de crecimiento (variedad climatérica) y, de forma concomitante, evidenciaban cambios de color y en el índice de maduración (calculado como la relación entre los sólidos solubles totales y la acidez del fruto). No obstante, la firmeza comenzaba a decaer antes del comienzo del pico autocatalítico de etileno, lo cual podía indicar que el etileno no estimulaba la actividad de las enzimas que degradan la pared celular. En ciruelas ‘Santa Rosa’, los niveles de ACC (precursor en la biosíntesis de etileno), tenían un comportamiento similar al etileno, aumentando a partir de la semana 8 de crecimiento. El aumento de la producción de etileno fue precedido por un aumento en los niveles de ACC, lo que indica un aumento de la actividad de la enzima ACC sintasa y probablemente en la actividad de la ACC oxidasa también, como se ha demostrado que ocurre en otros frutos climatéricos (Yang y Oetiker, 1998).



**Fig. 1.3:** Ruta de biosíntesis del etileno y el ciclo de la metionina. MET, metionina; ACC, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico; Ade, adenina; SAM, S-adenosil-L-metionina (adaptado de Bleecker y Kende, 2000).

## 1.4 Parámetros de madurez utilizados durante la postcosecha

El momento de la cosecha es un factor muy importante para determinar la calidad del fruto y su aceptación por parte de los consumidores. La cosecha de los frutos en una etapa temprana de madurez puede dar lugar a un producto que tiene buen aspecto, pero es pobre en sabor y aroma. Por otra parte, la fruta cosechada tardíamente madura con tanta rapidez que no llega en buen estado a los puestos de venta. Por lo tanto, para garantizar la óptima calidad de la fruta en postcosecha, es necesario contar con ciertos índices que permitan establecer la etapa de madurez del fruto con precisión (Abdi *et al.*, 1997).

Una serie de parámetros como el color de la piel, la textura de la mesocarpo, los sólidos solubles totales (SST), la acidez, los metabolitos volátiles responsables del aroma y la producción de etileno y CO<sub>2</sub>, se utilizan para determinar la madurez de la fruta en cosecha (Crisosto, 1994). Sin embargo muchos de estos parámetros varían entre cultivares, la producción de la zona y también entre temporadas (Kader y Mitchell, 1989). Los SST y la acidez titulable cambian con la posición en el árbol, con la variedad y entre temporadas (Crisosto, 1994; Abdi *et al.*, 1997). La calidad del fruto resulta de una combinación única de características organolépticas (Crisosto *et al.*, 2002) aunque la firmeza, usualmente medida con un penetrómetro, es el mejor indicador del grado de maduración del fruto y una buena forma de estimar el tiempo potencial de conservación sin deterioro del producto (Srinivasan *et al.*, 2005). Aunque no se considera la firmeza más importante que el sabor o el aroma de los frutos, los factores que controlan los cambios de firmeza fueron estudiados más exhaustivamente. Esto se debe a que, un ablandamiento prematuro del fruto asegura un rápido deterioro del mismo durante el almacenamiento, aumentando su susceptibilidad a daños mecánicos o a daños provocados por patógenos.

En algunas variedades de frutas de carozo, los cambios en el color de la piel pueden ser indicadores útiles de la maduración (Kader y Mitchell, 1989). Sin embargo, muchas variedades de ciruela desarrollan su pigmentación temprano en el crecimiento y por lo tanto, este atributo puede ser de poco valor en la determinación del momento de cosecha. En ciruelas japonesas 'Gigaglia', se determinó una correlación positiva entre la

pérdida de firmeza y los cambios de color, ocurriendo ambos sucesos de forma concomitante con la producción de etileno climatérico (Ponce *et al.*, 2010).

## **1.5 Estructura y composición de la pared celular vegetal**

Las células vegetales en crecimiento deben su forma a una pared extensible formada por una matriz compleja de polisacáridos y proteínas. La pared actúa como un exoesqueleto que otorga a la célula vegetal su forma y le permite soportar altas presiones de turgencia. Participa en la adhesión, en señales célula-célula, en defensa y en numerosos procesos de diferenciación y crecimiento (Crosgrave, 1997). La importancia de la pared celular se revela en el inmenso número de genes que estarían involucrados en la biogénesis, ensamblado y modificación de la misma (Carpita *et al.*, 2001).

La pared primaria se ha caracterizado usualmente como una estructura polimérica en la que se insertan microfibrillas de celulosa cristalina, en una matriz compleja de polisacáridos altamente hidratada, con pequeñas cantidades de proteínas estructurales intercaladas en ella (**Fig. 1.4**). La pared de las células vegetales se compone aproximadamente de un 30% de celulosa, 30% de glicanos de matriz (usualmente denominados hemicelulosas), 35% de pectina y un 1-5% de proteínas estructurales, en base al peso seco, aunque existen desviaciones sustanciales de estos valores según la especie (Crosgrave, 1997).

La celulosa es un polímero lineal formado por unidades de D-glucosa unidas por enlaces glicosídicos  $\beta$ -(1-4). Estos glucanos lineales se asocian entre sí mediante puentes de hidrógeno para formar microfibrillas de celulosa de al menos 36 cadenas de glucanos. Dada su estructura, la celulosa juega un papel importante en la determinación de la fuerza y la ordenación de la pared celular.

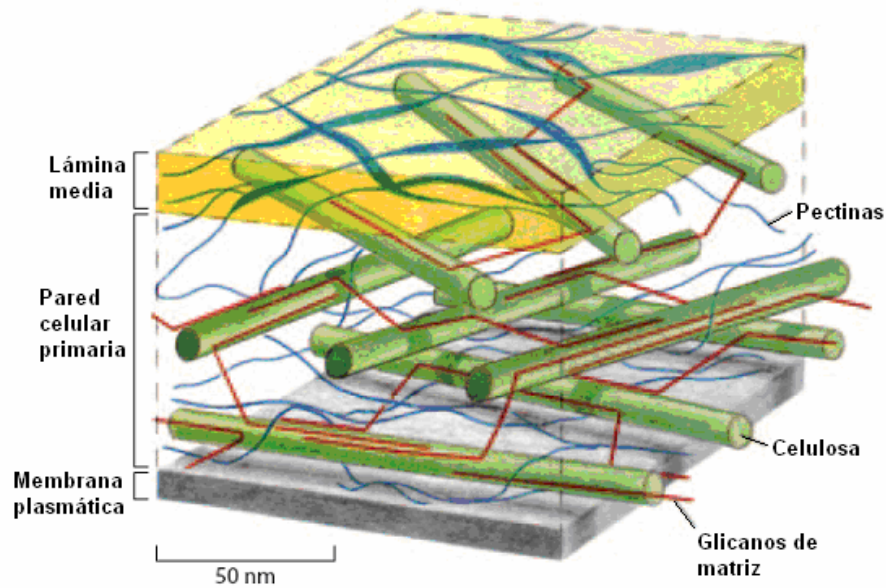
Las hemicelulosas conforman un grupo heterogéneo de glicanos no cristalinos que se encuentran inmersos en la estructura de la pared celular (glicanos de matriz). Por lo general son solubilizados de las paredes libres de pectinas mediante el uso de un álcali fuerte (NaOH 0,1-4 M), aunque también se pueden encontrar en forma soluble en la suspensión de cultivos celulares. El glicano de matriz más abundante y mejor estudiado de la pared primaria de dicotiledóneas es el xiloglucano, un polímero ramificado formado por un esqueleto de restos de D-glucosa unidos por enlaces glicosídicos  $\beta$ -(1-4)

con cadenas laterales cortas que contienen xilosa, galactosa y, a menudo, una fucosa terminal. Los glicanos de matriz impiden que las microfibrillas de celulosa se unan entre sí al actuar como una capa lubricante que impide contacto directo entre microfibrillas (Crosgrave, 1997). Debido a que los xiloglucanos tienen una longitud mayor (50–500 nm) al espacio existente entre microfibrillas de celulosa (20–40 nm), estos polímeros tienen la potencialidad de unir microfibrillas de celulosa formando un “puente” entre ellas. Otros polímeros pueden ser hallados en la fracción de matriz de glicanos de la pared celular como son los arabinanos/galactanos, mananos y arabinoxilanos.

Las pectinas son los polisacáridos más solubles de la pared y pueden ser extraídas con agua caliente o con agentes quelantes de calcio. Al igual que los glicanos de matriz, también constituyen un grupo heterogéneo de polisacáridos, que se caracterizan por contener azúcares ácidos como el ácido glucurónico y el ácido galacturónico. Algunas pectinas tienen una estructura primaria relativamente simple, tales como los homogalacturonanos (polímeros lineales de ácido galacturónico  $\beta$ -(1-4)), con residuos ramnosilos ocasionales (en el ramnogalacturonano) que provocan una torción en la cadena. Estos polisacáridos forman una fase de gel en la cual se encuentra inmersa la red de celulosa/glicanos de matriz. La pectina puede actuar como un gel hidrofílico de relleno para evitar la agregación y el colapso de la red de celulosa (Jarvis, 1992) y en la modulación de la porosidad de la pared celular (Baron-Epel *et al.*, 1988). El papel exacto de las proteínas estructurales sigue siendo motivo de especulación.

El más abundante, y a veces obviado, componente de la pared celular, es el agua, que constituye las dos terceras partes de la masa en los tejidos en crecimiento. El agua se encuentra principalmente en la matriz (75-80%), lo que sugiere que la misma tiene las propiedades de un hidrogel relativamente denso (Carpita *et al.*, 2001).

A partir de estudios de microscopía, desde hace tiempo se sabe que la celulosa se sintetiza en la membrana plasmática (Brown *et al.*, 1996), mientras que la matriz de polisacáridos es sintetizada por el aparato de Golgi y secretada de las vesículas a la pared (Staehelin y Moore, 1995). Sin embargo, las enzimas de membrana responsables de estas actividades de síntesis han demostrado ser muy difíciles de caracterizar.



**Fig. 1.4:** Modelo simplificado de la pared celular primaria de las plantas, mostrando los principales polímeros estructurales y su probable disposición en la pared. Las microfibrillas de celulosa contienen regiones no cristalinas que interactúan con glicanos de matriz. Las pectinas forman un espacio de gel hidrofílico entre microfibrillas contribuyendo a la estructura general de la pared celular (adaptado de McCann y Roberts, 1991)

## 1.6 El metabolismo de la pared celular y el ablandamiento del fruto

El ablandamiento y los cambios texturales que ocurren durante la maduración organoléptica del fruto ('ripening') son característicos de cada especie y se deben principalmente a diferencias en la composición y en el grosor de la pared celular (Harker *et al.*, 1997). En dicho proceso, ocurre la acumulación de pigmentos, de compuestos volátiles responsables de los aromas, ácidos orgánicos y azúcares, en combinación con una serie de cambios en la firmeza y en las propiedades texturales del fruto (Brummell, 2006). En general se asume que ocurren modificaciones en la pared celular que conllevan a cambios en la firmeza y textura del fruto, pero el tipo y grado de magnitud de estas alteraciones varía considerablemente entre especies. La disminución de la firmeza del fruto se debe en gran parte al desensamblado de la pared celular con la consiguiente pérdida de rigidez y de adhesión intercelular. Esto ocurre en la mayoría de los frutos en ausencia de crecimiento (*e.g.* tomate, durazno) aunque el crecimiento y el ablandamiento ocurren simultáneamente en algunas especies como uvas y frutillas (Brummell, 2006).



Por otro lado, el proceso de ablandamiento, también involucra una reducción en la presión de turgencia (Shackel *et al.*, 1991; Harker y Sutherland, 1993), probablemente debido a una acumulación de solutos osmóticos en el apoplasto y a la pérdida de agua (deshidratación) del fruto. La disminución de la presión de turgencia impide la expansión de la pared y contribuye a la alteración de las propiedades texturales del fruto (Brummell, 2006).

Se sostiene que la membrana plasmática juega un papel significativo tanto en el transporte de enzimas y materiales de pared celular como en la regulación de la presión de turgencia (Harker *et al.*, 1997). La expresión de acuaporinas durante el ablandamiento constituye un ejemplo de la contribución presumptiva en el mantenimiento de la turgencia del fruto (Mut *et al.*, 2008). No obstante, la pérdida de firmeza es principalmente atribuida a la degradación de la pared celular como resultado de la solubilización y/o despolimerización de constituyentes de la pared celular (Brummell *et al.*, 2004). Los polisacáridos pécticos y hemicelulósicos de la pared celular primaria muestran una gran variedad de conversiones dependientes de genotipo durante el crecimiento y la maduración del fruto (Brummell *et al.*, 2001; 2006).

Cuando se examinan por microscopía electrónica las células de un fruto en estado de ablandamiento, el primer cambio visible es la disolución de la lámina media (Hallett *et al.*, 1992), capa rica en pectinas presente entre células que provee conexiones intercelulares (Jarvis *et al.*, 2003). Esto es seguido por la disrupción de la pared celular primaria lo cual indica que ha ocurrido una degradación significativa. Generalmente esto se acompaña por un área reducida de contactos intercelulares y espacios aéreos amplios entre células (Hallett *et al.*, 1992).

Estudios detallados sobre el metabolismo de polisacáridos de la pared celular en las llamadas “especies modelo” (principalmente tomate y frutilla) han profundizado el conocimiento actual sobre el ablandamiento de los frutos pero la aplicabilidad de estos modelos a otras especies es aún objeto de debate. De hecho, la hipótesis de que el metabolismo de la pared celular es un proceso altamente conservado es difícil de compatibilizar con la significativa variabilidad entre especies o tejidos en términos de la forma y de los cambios en los polisacáridos de la pared celular y en su regulación.

Algunas modificaciones relacionadas a la maduración parecen ser universales, como la despolimerización de los glicanos de la matriz pero otras ocurren en diferentes grados o están ausentes según la especie. Por ejemplo, en la mayoría de las especies se observa una disminución en el contenido de galactosa y arabinosa en la pared celular durante el ablandamiento. Sin embargo, en pepinos y ciruelas no hay pérdida de galactosa durante dicho proceso y la pérdida de arabinosa es menor o inexistente en especies como manzanas y damascos (Gross y Sams, 1984). De forma similar, la despolimerización de pectinas unidas iónicamente es prácticamente indetectable durante la maduración en frutilla y banana (Huber, 1984; Wade *et al.*, 1992), relativamente leve en melón (McCollum *et al.*, 1989; Ranwala *et al.*, 1992; Rose *et al.*, 1998), moderada en tomate (Huber y O'Donoghue, 1993; Brummell y Labavitch, 1997) y drástica en palta y sandía (Huber y O'Donoghue, 1993; Karakurt y Huber, 2002).

Las pérdidas de azúcares neutros desde las cadenas laterales de pectinas se han asociado a la solubilización de las mismas y se cree que posiblemente contribuyen a la movilización de pectinas durante la maduración (Dawson *et al.*, 1992). Estos azúcares neutros usualmente existen como cadenas laterales unidas a residuos ramnosilos del esqueleto de ramnogalacturonano y se asume que su liberación durante la maduración del fruto aumenta la sensibilidad de la degradación enzimática o el acceso de otras glicosilhidrolasas (Tateishi *et al.*, 2005).

En duraznos, ocurren cambios sustanciales en el contenido de arabinosa no sólo durante el estado fundente, cuando es de esperar una rápida despolimerización de la pared relacionada al ablandamiento, sino también en el inicio de la maduración, de forma simultánea con la presencia de actividad de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa (ARFs;  $\alpha$ -L-arabinofuranósido arabinofuranohidrolasa; EC 3.2.1.55) (Brummell *et al.*, 2004). No obstante, se ha detectado actividad de ARF en estados tempranos del desarrollo del fruto, donde no ocurre ablandamiento aparente (Brummell *et al.*, 2004) lo que puede relacionarse, al menos en parte, al proceso de reorganización de la pared celular más que al de desorganización.

Hasta hace poco se disponía de escasa información en la literatura sobre la composición de las paredes celulares de ciruela siendo la misma de carácter fragmentario (Boothby, 1980, 1983; Raynal *et al.*, 1991; Taylor *et al.*, 1994). Taylor *et al.* (1994), realizaron

preparados de pared celular mediante extracciones secuenciales con agua, pH 6,2, CDTA y NaOH 0,05 M obteniendo galactosa y arabinosa como principales azúcares neutros. Manganaris *et al.* (2008) compararon ciruelas japonesas (cv. Fortune) normales y dañadas por frío, siendo la galactosa el principal azúcar neutro en sus extractos.

Recientemente, Ponce *et al.* (2010) realizaron estudios en ciruelas japonesas tomadas en seis estados de desarrollo sin períodos de almacenamiento y analizaron los cambios en la composición de la pared celular. La arabinosa resultó ser el principal componente de los azúcares neutros de las paredes celulares durante el crecimiento y el azúcar neutro más dinámico en las fracciones pécticas. La pérdida de arabinosa de las pectinas unidas débilmente a la matriz de la pared, resultó ser uno de los eventos tempranos en la secuencia de modificaciones bioquímicas de la pared. La despolimerización de los glicanos de la matriz comenzó a finales de la fase de expansión celular y aumentó a lo largo de la maduración. La solubilización de pectinas fue detectada por primera vez durante la maduración temprana. La pérdida de firmeza no se correlacionó con la despolimerización de poliuronidos en momentos tempranos de la maduración, pero se vinculó fuertemente con la fase de ablandamiento final, como así también con una disminución de la relación arabinosa/galactosa en las pectinas unidas débilmente a la pared celular.

## **1.7 Enzimas que modifican la pared celular en Prunoideas**

En durazno, se estudiaron diferentes enzimas/proteínas relacionadas a la pared celular y/o sus genes codificantes putativos, incluyendo exo y endopoligalacturonasa (Downs *et al.*, 1992; Pressey y Avants, 1973), expansinas (Hayama *et al.*, 2003), pectato liasas (Hayama *et al.*, 2006); pectinmetilesterasas (Glover y Brady, 1994), endo-1,4- $\beta$ -D-glucanasas (Bonghi *et al.*, 1998 ; Hayama *et al.*, 2006), endo-1,4- $\beta$ -mananasa (Brummell *et al.*, 2004),  $\alpha$ - y  $\beta$ -D-galactosidasas (Kupferman y Loescher, 1980 ; Lee DH *et al.*, 2003) y ARF (Brummell *et al.*, 2004, Hayama *et al.*, 2006). El estudio de glicosidasas en durazno es, al menos en parte, una consecuencia de los resultados bioquímicos y fisiológicos que muestran que algunos restos glicosilos, principalmente arabinosa y galactosa, presentan papeles muy dinámicos durante el desarrollo del fruto. En otras especies como tomate, pimiento y melón, la galactosa es considerada el principal monosacárido neutro no-

celulósico primario perdido durante el desarrollo (Brummell *et al.*, 2006; Gross y Sams, 1984; Redgwell *et al.*, 1997). En contraste, la arabinosa es el principal azúcar neutro en las paredes celulares de los duraznos y nectarinas aunque la galactosa también está presente a niveles relativamente altos (Brummell *et al.*, 2004; Dawson *et al.*, 1992, Gross y Sams, 1984).

En la ciruela japonesa, no se han hallado datos en la literatura sobre genes codificantes de enzimas de la pared celular. Hasta el momento los trabajos publicados caracterizan genes relacionados con la biosíntesis de etileno y su regulación (El-Sharkawy *et al.*, 2007; 2008; 2009).

### **1.8 $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas y $\beta$ -D-xilosidasas de pared celular**

Los restos de arabinosa se encuentran usualmente formando parte de heteropolisacáridos y glicoconjugados. Las cadenas laterales presentes en los xilanos están formadas por restos  $\alpha$ -L-arabinosilos unidos de forma  $\beta(1\rightarrow3)$  a un esqueleto de  $\beta(1\rightarrow4)$  xilopiranósidos (Aspinall, 1980). Las ARFs catalizan la hidrólisis de uniones de restos de arabinosa terminales no reductores en arabinoxilanos, arabinanos y otros polisacáridos que contienen L-arabinosa. Estas enzimas trabajan de forma concertada con otras “hemicelulasas” que permiten degradar la cadena principal del glicano completamente. Las cadenas laterales de L-arabinosa en los xilanos, por ejemplo, restringen la hidrólisis enzimática de la cadena principal que es llevada a cabo por las xilanasas (Brice y Morrison, 1982) y se ha demostrado un efecto sinérgico entre las actividades de varias “hemicelulasas” (Ross *et al.*, 1992). Las ARFs, además de su importancia en el estudio del ablandamiento de los frutos, forman parte de aplicaciones biotecnológicas, tales como la bioconversión de material lignocelulósico a productos de fermentación, el mejoramiento de la digestibilidad de la materia prima utilizada para la alimentación animal, la clarificación de jugos y la mejora de la calidad de la cerveza. Las “hemicelulasas” también se aplican en la industria del papel para la deslignificación y el blanqueo de la pasta (Shoham *et al.*, 1993; Viikari *et al.*, 1987).

Los xiloglucanos y xilanos son componentes de gran importancia en los glicanos de la matriz de la pared celular. Los xilanos están constituidos por restos  $\beta$ -D-xilopiranósidos que forman una cadena principal, la cual puede estar sustituida por restos  $\alpha$ -L-

arabinofuranósidos (arabinoxilanos) y en menor medida por restos de ácido  $\alpha$ -D-glucurónico (glucuronarabinoxilanos) (Carpita y McCann, 2000). La degradación de los xilanos ocurre por la acción coordinada de varias enzimas entre las cuales se hallan las  $\beta$ -D-xilosidasas (XIL; xylan 1,4- $\beta$ -xylosidase EC 3.2.1.37), las cuales clivan xilooligosacáridos liberando xilosa (Cleemput *et al.*, 1997). Se informó la actividad de la enzima XIL en frutos de Prunoideas, aceituna, tomate y pera japonesa (Bouranis y Niavis 1992; Bolaños *et al.*, 1995; Itai *et al.*, 1999 y 2003) y se ha propuesto que la enzima estaría involucrada en procesos de ablandamiento en palta y frutillas (Ronen *et al.*, 1991, Martínez *et al.*, 2004).

## 1.9 Genes de interés

Con el objeto de caracterizar genes desconocidos, relacionados a la pared celular, de potencial importancia comercial en especies de *Prunus*, y haciendo uso de homología de secuencias, nos hemos centrado en proteínas conocidas que resultaron de especial interés durante el desarrollo de esta tesis. Para la clonación de genes codificantes de ARFs de duraznero y ciruelo japonés, nos hemos basado en la información disponible para los genes de manzano *MdAfaseI* (no. acceso AY309436), de tomate *LeARF1* (no. acceso AB073310) y de pera japonesa *PpARF1* (no. acceso AB073311).

Goulao *et al.* (2008) encontraron, mediante RT-PCR semicuantitativa, que aunque la expresión de *MdAfaseI* no era específica de fruto, alcanzaba niveles máximos en manzanas con madurez de cosecha y en pecíolos de hojas senescentes (donde ocurre disolución de la lámina media y cuyo mecanismo biológico se ha postulado como análogo al del ablandamiento de los frutos). Los transcritos de *MdAfaseI* también estuvieron presentes en menor medida, en hojas, flores y frutos en otros estados de crecimiento.

Por otra parte, su homólogo de tomate, *LeARF1*, se expresó en el fruto durante el desarrollo pero disminuyó hasta desaparecer con el inicio de la madurez. Sin embargo, al aplicar 1-metilciclopropeno (1-MCP) – inhibidor de la acción del etileno – en estos frutos se restauraba la expresión del gen *LeARF1*.

La secuencia codificante de *PpARF1* (Itai *et al.*, 1999) de *Pyrus pirifolia* resultó de interés por su alta homología de secuencia con sus homólogos en manzana y tomate pero no se conocen datos sobre su patrón de expresión en el fruto.

Otros genes relacionados son *ASD1* y *ASD2* de *Arabidopsis thaliana* (Fulton y Cobbett, 2003) pertenecientes a la familia 51 de glicosilhidrolasas. Si bien la expresión de estos genes no fue analizada en el fruto sino en diferentes tejidos reproductivos y vegetativos, se halló que uno de ellos, *ASD1*, se expresaba significativamente en tejidos florales en desarrollo y en zonas de abscisión.

En *Prunus persica*, Ruperti *et al.* (2002) describieron el gen *PpAz152* (AB195230) codificante de una XIL que presenta alta homología de secuencia con el gen de duraznero *PpARF/XYL* (Hayama *et al.*, 2006; AB264280) y también con el gen *PpARF2* de pera japonesa (Tateishi *et al.*, 2005; AB195230). Este último codifica una proteína bifuncional que posee tanto actividad de ARF como de XIL *in vitro* pero solo es capaz de catalizar la liberación de arabinosa a partir de polisacáridos de pared celular nativos provenientes de pera japonesa. Los transcriptos de *PpARF2* y la proteína derivada fueron detectados únicamente en frutos maduros de forma coincidente con un incremento en la actividad de ARFs, siendo su expresión indetectable en capullos, hojas, raíces o tallos de pera japonesa. Por su parte, los transcriptos de *PpARF/XYL*, resultaron regulados positivamente por el etileno y se detectaron variablemente durante los primeros estados del ablandamiento registrándose un aumento durante la maduración. Basados en estos resultados, se propuso *PpARF/XYL* como “un gen relacionado al ablandamiento” y la acumulación de sus transcriptos “completamente dependiente del etileno” (Hayama *et al.*, 2006).

## **1.10 Regulación de genes vegetales mediante splicing alternativo (SA)**

### **1.10.1 Generalidades**

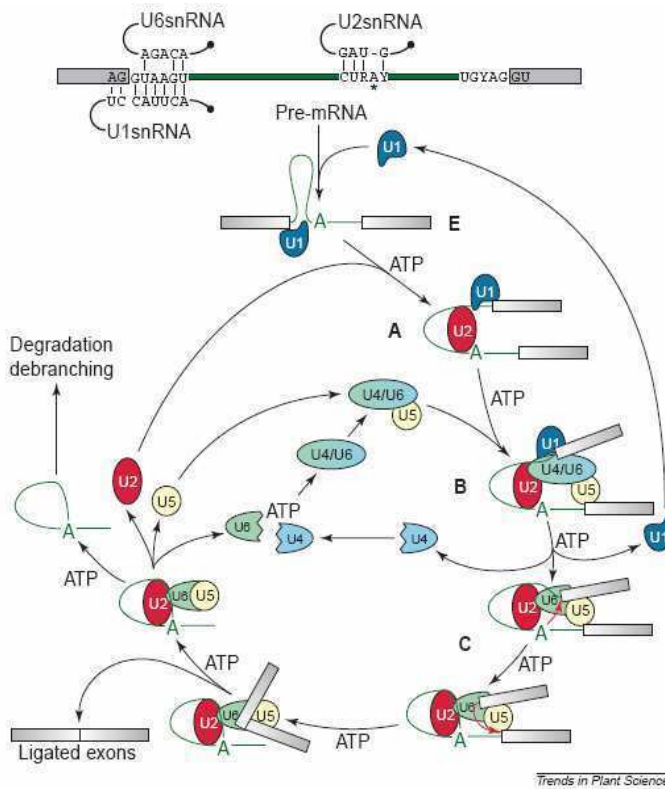
La mayor parte de los ARNm de plantas se sintetizan como precursores conteniendo uno o más intrones que son removidos durante el proceso de splicing (del inglés, empalme). El splicing del pre-ARNm es uno de los procesos fundamentales de la expresión génica constitutiva y regulada de los eucariotas. Durante el splicing los intrones presentes en los transcriptos primarios son removidos y los exones ligados forman ARNm competente

para la traducción (ARNm maduro). La reacción es mediada por el spliceosoma, un amplio complejo de ribonucleoproteínas (snRNPs: small nuclear ribonucleoprotein particles) y otros factores proteicos como las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (en inglés, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles, hnRNPs) (Brown y Simpson, 1998; Weighardt *et al.*, 1996; Krecic y Swanson, 1999). El ensamblado del spliceosoma en los intrones es una reacción dinámica y ordenada que involucra la hidrólisis de muchas moléculas de ATP y varios rearrreglos estructurales (**Fig 1.5**). El mecanismo básico del ensamblado del spliceosoma y la escisión de intrones es similar en todos los eucariotas. Sin embargo el reconocimiento de intrones en plantas tiene particularidades que lo distinguen entre vertebrados y levaduras (Ner-Gaon *et al.*, 2007). La función y precisión del spliceosoma es regulada por diferentes clases de proteínas: proteínas de unión a RNA, ATPasas dependientes de RNA, RNA helicasas y proteína-quinatas/fosfatasa. Durante el splicing las secuencias intrónicas y exónicas deben ser efectivamente distinguidas y deben ser seleccionados los sitios 3' y 5' de splicing y yuxtapuestos antes del paso catalítico (Lorković *et al.*, 2000).

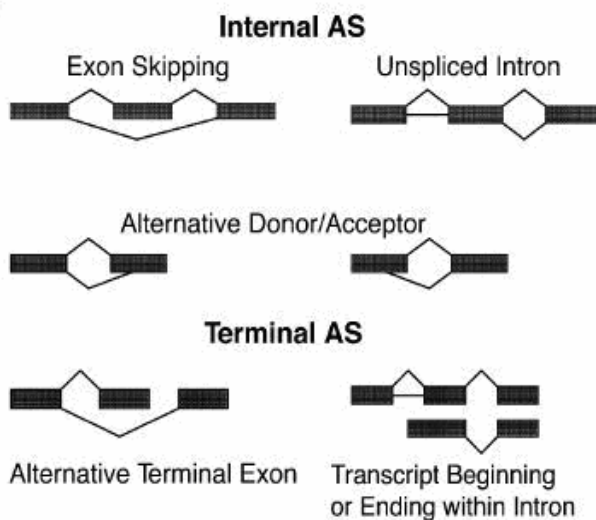
El splicing alternativo (SA) es un mecanismo por el cual a partir de un mismo mensajero primario pueden obtenerse varias secuencias de ARN mensajero maduro dependiendo de cuáles sean los sitios de splicing reconocidos. Se han caracterizado diferentes tipos de SA en eucariontes que se encuentran resumidos en la **Fig. 1.6**. El mecanismo de SA es una de las maneras de originar distintas isoformas funcionales de una misma proteína en diferentes tejidos o compartimentos celulares añadiendo complejidad a los mecanismos de regulación de la expresión génica, al permitir la codificación de un mayor número de proteínas con el mismo número de genes (Roberts y Smith, 2002). También se ha asociado el SA al mecanismo NMD (Non Sense Mediated Decay) que detecta y elimina transcritos aberrantes con codones de terminación prematuros (PTCs) para evitar la producción por parte de las células de proteínas truncadas (Lewis *et al.*, 2003).

Actualmente, se ha progresado en la caracterización de las señales de splicing en pre-ARNm de plantas, en la identificación de mutantes de splicing y en el descubrimiento de nuevos ejemplos de ARNm sujetos a SA. En combinación con la información aportada por el proyecto de secuenciación del genoma de Arabidopsis, estos estudios han

contribuido a un mayor conocimiento del proceso de splicing y su papel en la regulación de la expresión génica en plantas (Lorković *et al.*, 2000).



**Fig. 1.5:** Ciclo de un spliceosoma en mamífero (probablemente ocurre de forma semejante en plantas). Se muestra el splicing de un único intrón presente en el pre-ARNm. Se indican los apareamientos de base de snRNAs U1 y U6 con los sitios de splice (ss) 5' y de snRNA U2 con el sitio de ramificación basándose en la conservación de estas secuencias en los pre-ARNm y snRNAs de plantas. Los círculos negros pintados en los extremos de los snRNAs representan las estructuras 5' CAP terminales. La participación de cinco snRNPs y sus interacciones se indican en los distintos pasos de la formación del spliceosoma y la catálisis. Todos los pasos requieren ATP excepto la formación del complejo E. Las flechas indican las transiciones entre los complejos y el reciclado de las snRNPs. Luego de las reacciones de transesterificación (flechas rojas), dos exones ligados son liberados como ARNm. EL lazo intrónico es liberado y subsecuentemente depolimerizado y degradado (adaptado de Lorković *et al.*, 2000).



**Fig. 1.6:** Tipos de splicing alternativo. 'exon skipping' (salto de exón) o 'unspliced intron' (retención de intrón) conforman tipos de splicing internos a la región codificante del transcrito primario así como también el uso de un sitio dador 5'ss o aceptor 3'ss alternativo. El SA terminal puede dar origen a exones terminales alternativos o a intrones en el comienzo o fin del transcrito maduro (adaptado de Ner-Gaon *et al.*, 2004).



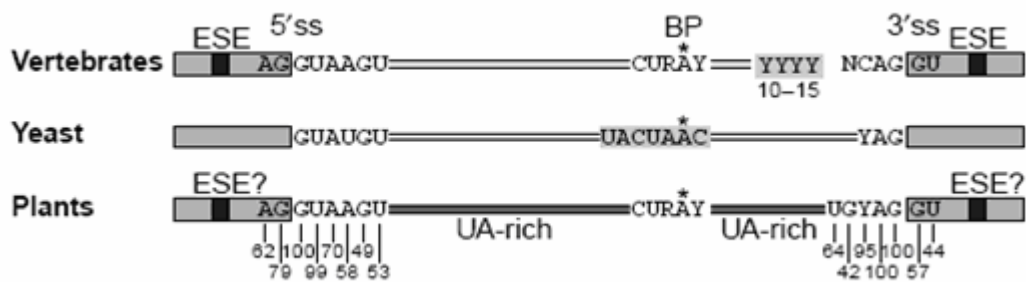
### 1.10.2 Propiedades de los intrones vegetales

La organización de los intrones y exones en plantas superiores es similar a la de los vertebrados (Schuler, 1998). La mayoría de los genes vegetales (80-85 %) están interrumpidos por intrones y un único gen puede contener 40 de ellos. Los intrones en genes vegetales son generalmente pequeños en comparación con los de vertebrados, aproximadamente dos tercios son de 150 nt de largo y el resto de un tamaño que va de ~60 a 10000 nucleótidos de longitud. Las secuencias consenso 5'ss y 3'ss (5'y 3' splice site o sitio de corte y empalme 5'/3'), AG/GTAAGT y TGCAAG/G, son respectivamente similares a las de vertebrados (**Fig. 1.7**). Como en otros organismos, el splicing en pre-ARNm de plantas es un proceso que consta de dos pasos involucrando dos reacciones de *trans*-esterificación y formación de un lazo. La región de ramificación es menos conservada y la distancia al aceptor AG de ~30 nt se parece a aquella en intrones de vertebrados, pero claramente difiere del punto de ramificación de levaduras que es altamente conservado (Lorković *et al.*, 2000). La diferencia más notable es que los intrones de plantas poseen una elevada cantidad de UAs (secuencias nucleotídicas ricas en uridín trifosfato -UTP- y adenosín trifosfato -ATP-) o poliU (secuencias nucleotídicas ricas en UTP) en comparación con los de las levaduras y los vertebrados. En promedio, tanto en dicotiledóneas como monocotiledóneas, los intrones son un ~15% más ricos en UA que los exones, siendo los residuos U ampliamente responsables por esta diferencia. Las secuencias ricas en U típicamente distribuidas a lo largo de todo el intrón en plantas son requeridas para un eficiente procesamiento y selección del sitio de splicing. Esta función, independiente de la posición, la distingue de las colas de poli pirimidinas de vertebrados que están posicionadas siempre río abajo del sitio de ramificación (Lorković *et al.*, 2000).

### 1.10.3 Función de las secuencias ricas en U en el reconocimiento de los intrones

La mayoría de los estudios sobre el procesamiento de los pre-mRNAs se han centrado en el papel de las secuencias ricas en UA, una marca distintiva de los intrones de plantas. Actualmente se sabe que las secuencias ricas en UA son esenciales para un splicing eficiente y para la selección de los sitios 5'ss y 3'ss de corte (Simpson y Filipowicz, 1996). Experimentos llevados a cabo con intrones deficientes en UA han

revelado que elementos cortos UUUUUAU o sus múltímeros, activan el proceso de splicing independientemente de su localización (ya sea cerca de 5'ss o 3'ss o en el medio del intrón), (Gniadkowski *et al.*, 1996). Los sitios 3'ss y el 5'ss seleccionados preferentemente para splicing son, por lo general, aquellos presentes en las regiones de transición de secuencias ricas en UA a secuencias ricas en GC.



**Fig. 1.7:** Representación esquemática de las señales importantes para el splicing de los principales intrones en levaduras, vertebrados y plantas. Las cajas negras representan potenciadores de splicing exónico (exonic splicing enhancers, ESEs). Todavía no se han caracterizado ESEs de plantas, secuencias exónicas ricas en GC no necesariamente representan ESEs. Los números debajo de los sitios de splicing consenso en plantas representan el porcentaje de ocurrencia de las bases indicadas en cada posición en plantas dicotiledóneas. El sitio de ramificación de adenosina está marcado con un asterisco. La cola de polipirimidinas localizadas entre el sitio de ramificación y el borde 3'ss está presente solo en intrones de vertebrados.

#### 1.10.4 Modelos de definición de exones versus modelos de definición de intrones

En mamíferos, son los exones más que los intrones las unidades operacionales a ser definidas en etapas tempranas del reconocimiento del pre-ARNm (Berget, 1995). Tal definición ocurre en virtud de interacciones de las secuencias adyacentes al exón, entre factores unidos al sitio 3'ss y río abajo del sitio 5'ss siguiente (Schuler, 1998). Los intrones en metazoos son frecuentemente más largos y los exones más cortos, ocurriendo de forma inversa en las plantas. Dado que las plantas poseen intrones cortos y además albergan elementos ricos en U, se asume que su splicing sigue el modelo de definición de intrones, con factores que se ensamblan en los sitios 5' y 3' de splicing e interactúan situados en los bordes del intrón. Diferentes estudios determinan la coexistencia de ambos mecanismos en plantas. El uso de un mecanismo particular y la

eficiencia del procesamiento de intrones dependerían de un conjunto de factores combinados (Lorković *et al.*, 2000).

#### **1.10.5 La retención de intrón es la forma más común de SA en plantas**

En plantas, se cree que existe un menor porcentaje de genes sujetos a SA en comparación con los seres humanos, siendo la retención de intrón la forma más común de SA en *Arabidopsis* y en arroz (Wang y Brendel, 2006). Aunque el SA tiene el potencial de crear múltiples isoformas de ARN a partir de un único locus, en las plantas, la mayoría de los genes generan solo dos o tres isoformas y las evidencias muestran que la presencia de estas isoformas no son eventos raros (Campbell *et al.*, 2006).

#### **1.10.6 Ejemplos de SA en plantas**

En plantas, el número de casos conocidos de SA va en aumento aunque en la mayoría de los casos la significancia biológica es desconocida.

El uso de un sitio 5'ss alternativo en el pre-ARNm de la Rubisco activasa produce dos isoformas que difieren solo en la porción carboxiterminal. Aunque ambas isoformas son capaces de activar la Rubisco, solo una de ellas puede modificarse en su estado de óxido-reducción y tales cambios de estado regulan la actividad de ambas isoformas (Zhang y Portis, 1999). Es interesante que este tipo de regulación ocurre en *Arabidopsis* y espinaca (Werneke *et al.*, 1989) pero no en tabaco, el cual solo expresa la isoforma proteica pequeña al igual que en maíz y en *Chlamydomonas*. El uso alternativo de un sitio 5'ss de splicing del gen que codifica HPR (hidroxipiruvato reductasa) en calabaza produce dos proteínas diferentes con distinta ubicación subcelular. HPR1, pero no HPR2, contiene un péptido señal que determina su transporte a peroxisomas. La exposición a la luz aumenta la producción de HPR2, sugiriendo que una de las formas de regulación del SA en plantas es por la incidencia de radiación (Mano *et al.*, 1999). En arroz, se publicó un raro ejemplo de SA que produce dos proteínas totalmente diferentes. S14 (proteína ribosómica) y SDHB (subunidad B de la succinato deshidrogenasa) están involucradas en la síntesis de proteínas mitocondriales y en la respiración respectivamente. Durante la evolución, el gen *rps14* fue probablemente removido de la mitocondria y fue integrado en el intrón de *sdhB* el cual estaba presente en el núcleo. De esa forma ha adquirido simultáneamente la capacidad de expresión en el núcleo incluyendo además una señal

para su transporte a mitocondrias (Kubo *et al.*, 1999). Recientemente la relevancia biológica de la inclusión de un exón alternativo se ha documentado para el gen N de resistencia al virus del mosaico del tabaco (TMV). El gen N produce dos ARNm, N y N1. N es más abundante en plantas no infectadas mientras que N1 se vuelve prevalente luego de la infección. N1 resulta de la inclusión alternativa de un exón localizado en el intrón 3 codificando una proteína corta de 652 aa. Este evento de SA es necesario para conferir resistencia completa a TMV (Dinesh-Kumar y Baker, 2000). La retención de un intrón no splicado en una fracción de transcritos es común en plantas, pero probablemente refleja la baja eficiencia del splicing normal más que un proceso regulado de significancia biológica. Sin embargo, la presencia de un intrón splicado ineficientemente podría regular potencialmente los niveles de mRNA como resultado de competencia entre splicing y poliadenilación. Un ejemplo biológico relevante es el procesamiento de un RNA transcripto a partir del gen del control del florecimiento FCA en *Arabidopsis*. Por sobreexpresión de este gen, el tiempo de floración resulta notablemente adelantado, un efecto probablemente causado por el aumento en el ARNm de FCA completamente splicado. Sin embargo, el nivel de el transcripto corto poliadenilado dentro del intrón 3, el cual es splicado ineficientemente, aumenta 100 veces en plantas transgénicas, sugiriendo que estos eventos de poliadenilación controlan la formación de FCA para mantener el tiempo de floración constante (Macknight *et al.*, 1997).

## CAPÍTULO 2

---

### OBJETIVOS E HIPÓTESIS

#### 2.1 Objetivo general

El objetivo general de la tesis fue caracterizar genes codificantes de glicosidasas de pared celular desconocidos en especies de *Prunus* de valor comercial, cuya expresión sea relevante en los procesos de crecimiento y/o maduración de los frutos.

#### 2.2 Objetivos específicos

Los objetivos específicos de la tesis fueron los siguientes:

- 1) Obtener la secuencia completa de los genes que codifican ARFs y ARF/XYLs implicadas en el crecimiento y la maduración de los frutos de *Prunoideas*.
- 2) Analizar los patrones de expresión de los genes clonados en diferentes tejidos, órganos y estados de crecimiento o maduración del fruto.
- 3) Analizar los patrones de expresión de los genes clonados al realizar tratamientos postcosecha sobre los frutos.
- 4) Analizar la actividad enzimática de ARFs durante el crecimiento y la maduración del fruto.
- 5) Evaluar la presencia de distintas variantes de ARN mensajero de ARF/XYL en distintas condiciones del fruto y otros tejidos.

## 2.3 Hipótesis

- Las enzimas del tipo ARF/XYL vinculadas a la pared celular de *Prunoideas* tienen un papel preponderante en los procesos de crecimiento y maduración de los frutos.
- Los genes codificantes de las enzimas del tipo ARF/XYL de *Prunoideas* se expresan de forma variable dependiendo del tejido, órgano y estado de desarrollo analizado.
- La actividad enzimática de ARF/XYLs varía con el tejido y con el estado de desarrollo analizado.
- Existen distintos genes ARF/XYLs vinculados a la pared celular de *Prunoideas* que codifican proteínas con funciones similares y que se expresan de forma variable durante el crecimiento y la maduración.
- La expresión de los genes codificantes de ARF/XYLs vinculadas a la pared celular de *Prunoideas* se ve afectada al aplicar tratamientos postcosecha sobre los frutos.
- La presencia de distintas variantes de ARN mensajero codificantes de ARF/XYL a partir de la transcripción de un único gen podría deberse a la existencia de regulación de la expresión génica mediada por splicing alternativo.
- Las variantes de splicing de ARF/XYL se expresan de forma variable durante el crecimiento y la maduración de los frutos de *Prunus salicina* Lindl. y el etileno podría regular la expresión de las mismas.

## CAPÍTULO 3

---

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Material vegetal

##### Frutos, órganos vegetativos y órganos florales

Se recolectaron frutos de *Prunus persica* (L.) Batsch 'Springcrest' y frutos de *Prunus salicina* Lindl. 'Gigaglia' del monte frutal de la Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires (34° 37' 46" S; 58° 27' 46" W). Los árboles recibieron prácticas estándares de cultivo como: poda, raleo de frutos, fertilización, riego y control de plagas. El raleo de los frutos en las etapas iniciales de desarrollo (eliminación de frutos del árbol de forma mecánica para evitar una competencia excesiva por fotoasimilados) se hizo para asegurar un tamaño final de fruto adecuado.

Durante el crecimiento, los duraznos fueron cosechados y asignados a diferentes estados fisiológicos según parámetros de crecimiento previamente descriptos para esta especie (Chalmers *et al.*, 1975) como son el peso fresco, el diámetro ecuatorial del fruto desde sutura y el diámetro longitudinal; y su edad (Ddpf) fue registrada así como también la producción de etileno y la firmeza. Para los frutos de 'Gigaglia' se realizó un seguimiento ontogénico durante las 12 semanas de crecimiento y maduración del fruto así como sus características de ablandamiento y cambios de color durante la maduración dado que no existían hasta el momento datos en la bibliografía sobre este cultivar. Para cada estado, se cosecharon frutos y se realizaron extractos enzimáticos en fresco, sin congelamiento previo y otro conjunto de frutos se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido (pequeñas muestras de mesocarpo o piel pesadas previamente) y se colocaron a -80°C para posteriores extracciones de ARN. En algunos casos se congelaron frutos enteros (ciruelas, en fases iniciales de crecimiento) debido a la dificultad hallada para la separación de los tejidos.

Durante la maduración y el ablandamiento, los duraznos fueron cosechados en cinco estados con firmeza decreciente y se registró la producción de etileno (R1-inicio-, R2-

madurez incipiente-, R3-madurez intermedia-, R4-madurez completa-, R5-sobremadurez-). Se tomaron pequeñas muestras de mesocarpo (250 mg-500 mg) obtenidas de la región ecuatorial del fruto en un sitio equidistante con respecto al epicarpo y endocarpo que fueron rápidamente congeladas en nitrógeno líquido y colocadas a -80°C para posterior análisis. Otras muestras de los mismos grupos de frutos fueron reservadas para realizar extractos enzimáticos de forma simultánea.

Otros tejidos del fruto fueron muestreados para un análisis espacial tanto de expresión génica como de actividad enzimática de la siguiente forma: por un lado se diseccionó el epicarpo (piel), por otro el mesocarpo externo (la región de aproximadamente 3 mm por debajo del epicarpo) y por otro el mesocarpo interno (la región de aproximadamente 3 mm en contacto con el endocarpo del fruto). Varias muestras de cada tejido fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C para posterior análisis de ARN, otras se reservaron para análisis de actividad enzimática.

Por otro lado, se tomaron muestras de radícula obtenida a partir de semilla germinada, hojas intactas expandidas y flores abiertas. Estas últimas fueron disectadas y sus órganos fueron almacenados separadamente: pétalos, sépalos, estambres (filamento más anteras) y ovarios. Cada muestra fue rápidamente congelada en nitrógeno líquido y colocada a -80°C para posterior análisis de ARN. Para las extracciones de ADN genómico se utilizaron brotes jóvenes de hoja de *Prunus salicina* Lindl 'Gigaglia'.

### **3.2 Medición de la producción de etileno**

La producción de etileno fue medida colocando 5 g de frutos (para S1), 20 g (para S2) y 100 g (para S3 y S4) en un recipiente de vidrio de 1,5 L herméticamente cerrado con septum de silicona. Luego de una hora, se extrajo 1 mL del gas contenido en el espacio de cabeza y se inyectó la muestra en un cromatógrafo gaseoso Hewlett Packard 5890 Series II (Avondale, PA, USA) equipado con un detector de ionización de llama y una columna de acero inoxidable Porapak N (3,2 mm de diámetro interno y 2 m de largo) que contenía alúmina activada (80/100 mesh). El inyector, la columna y el detector se operaron a 110°C, 90°C y 250°C respectivamente. Se utilizó N<sub>2</sub> como gas transportador a un flujo de 22 mL min<sup>-1</sup>. La cantidad de etileno producida se normalizó por gramo de tejido por hora. En cada estado ontogénico, se analizó un mínimo de n = 3 repeticiones.



### **3.3 Determinaciones de firmeza y color del fruto**

La firmeza de los frutos expresada en N se determinó midiendo la fuerza necesaria para penetrar el fruto, sin piel, utilizando un penetrómetro Instron Universal Testing Machine (modelo 3342, Canton, MA, USA). Se colocó cada fruto en una placa de acero fija y se perforaron dos puntos situados en lados opuestos del fruto hasta una profundidad de 10 mm con una punta de 7,9 mm de diámetro para duraznos y de 6,9 mm para ciruelas como se describió previamente (Sozzi *et al.*, 2003). El color del epicarpo se determinó por medio de un colorímetro (LCh°, D65) (Minolta, Model CR-300; Osaka, Japón) efectuándose dos determinaciones por fruto sobre la zona ecuatorial del mismo.

### **3.4 Tratamiento de los frutos con 1-MCP y etileno**

La ciruelas fueron cosechadas a los 73 Ddpf durante el fin de la etapa de crecimiento exponencial S3 y antes del pico climatérico (frutos pre-climáticos). Para asegurarse de que no existiera producción de etileno endógena, cada fruto se seleccionó haciendo hincapié en su integridad (descartando la posibilidad de cualquier lesión mecánica o daño por patógeno) y se midió individualmente su producción de etileno mediante cromatógrafo gaseoso como se describió en la sección 3.2. Se registraron las características de los frutos (peso, diámetro ecuatorial desde sutura) y un grupo de 10 frutos (no productores de etileno) fue asignado al azar para cada uno de los tratamientos. Para cada tratamiento, los frutos fueron colocados en contenedores plásticos herméticos de 67 L de capacidad provistos de un septum de silicona que se utilizó para la inyección del etileno. En otro contenedor se colocó un vaso pequeño en la cara interna de la tapa, por debajo del septum y se introdujo en él 1-MCP formulado en polvo. El 1-MCP se liberó en forma gaseosa mediante la adición de agua destilada a 40°C a cantidades previamente calculadas de polvo mojable SmartFresh™ (principio activo: 0,14%, Rohm & Hass, USA). Los tratamientos fueron los siguientes:

- a) Frutos control, 24 horas
- b) Frutos con aplicación de 1-MCP 0,5 ppm durante 24 horas
- c) Frutos con aplicación de etileno 1 ppm durante:
  - c.1) 3 horas

c.2) 6 horas

c.3) 24 horas.

En los contenedores que recibieron la aplicación de etileno se inyectó una nueva dosis de 1 ppm de etileno al abrir el contenedor a las 3 h y a las 6 h para evitar pérdidas de concentración sobre los frutos restantes.

Luego de los tratamientos se eliminó la piel y se obtuvieron dos muestras de mesocarpo por fruto que fueron inmediatamente congeladas para la posterior extracción de ARN.

### **3.5 Determinación de la actividad de $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa**

Se homogeneizó el material vegetal (aproximadamente 50 g por muestra) con solución reguladora de extracción acetato de sodio-ácido acético 100 mM, pH 4,5, NaCl 0,7 M, sacarosa 1 %, en relación 1:2 (g mL<sup>-1</sup>) y polivinilpolipirrolidona 1,5 % p/v en licuadora comercial durante 15 s y 30 s adicionales en Omnimixer. El homogenato se filtró con gasas y centrifugó a 13.000 x g durante 30 min. Se recogió y midió el volumen de sobrenadante para determinar la actividad de ARF luego de reposar durante toda la noche a 4°C. Se realizó una mezcla de reacción para cada sustrato que consistió de 125  $\mu$ L de solución reguladora citrato 0,1 M, pH 4,0, 100  $\mu$ L de BSA 0,1 % (p/v), 100  $\mu$ L de solución enzimática y 100  $\mu$ L de sustrato 13 mM. Se utilizó como sustrato de síntesis el *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranósido agregando la solución enzimática en último término y manteniendo todos los tubos en hielo. Luego de incubar la mezcla de reacción durante 1 hora en un baño a 37°C se frenó la reacción con 425  $\mu$ L de carbonato de sodio 0,2 M en frío y se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 400 nm. Se realizó un blanco para cada sustrato y para cada extracto enzimático de igual forma pero obviando el paso de incubación a 37°C y frenando la reacción a tiempo cero. La medición de cada extracto se realizó por triplicado. Por último, la cantidad de *p*-nitrofenol liberada durante la reacción fue calculada mediante una curva de calibración realizada utilizando *p*-nitrofenol libre como estándar.

### **3.6 Extracción de ARNm, cuantificación y fabricación de ADNc**

Se usaron las muestras de tejido vegetal conservadas a -80°C para la extracción de ARN poliadenílico, utilizando 'mRNA Isolation Kit' (Roche Molecular Biochemicals, GmbH,

Mannheim, Germany) según las indicaciones del proveedor. Se utilizaron 250 mg de tejido para cada extracción que se realizó por triplicado (proveniente de distintos frutos) y se combinaron los sobrenadantes obtenidos continuándose luego con los pasos de unión a las partículas magnéticas y a los oligodT-biotina como indicaba el protocolo original. Este paso se realizó para evitar errores derivados de la heterogeneidad del material biológico utilizado (los frutos suelen tener distinta firmeza según la cara del fruto, por ejemplo); al utilizar distintas muestras, provenientes de distintos frutos (del mismo tratamiento), la reproducibilidad de la técnica aumenta considerablemente. A su vez, este procedimiento se repitió para un mismo tratamiento (duplicado/triplicado). Todo el material a utilizar durante la extracción fue desinfectado y esterilizado mediante autoclave, usando guantes y condiciones asépticas para evitar contaminaciones con RNAsas.

Inmediatamente luego de la extracción, una alícuota de ARN poliadenílico fue utilizada para medir concentración mediante un fluorómetro adquirido comercialmente (Qubit® Fluorometer y Quant-iT™ ARN Assay Kit de Invitrogen). Se utilizaron de 10 a 50 ng de ARN poliadenílico para la fabricación de ADNc en un volumen final de 20 µL mediante el Sistema RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas International Inc., Burlington, Ontario, Canadá).

### **3.7 Diseño de cebadores y condiciones de PCR para la clonación de ADNc *PpARF1***

Con el fin de clonar genes putativos codificantes de ARFs de *Prunus persica* se realizaron alineamientos múltiples de secuencias de aminoácidos relacionadas (de especies vegetales) y se diseñaron tanto cebadores degenerados como específicos a partir de las secuencias conservadas. Las secuencias utilizadas se detallan a continuación con sus números de acceso en GenBank correspondientes: AY309436 (*MdAFase1* de manzana); AB073311 (*PpARF1* de pera japonesa) y AB073310 (*LeARF1* de tomate). Para alinear las secuencias se utilizó el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). Para el diseño de cebadores se utilizó el programa Vector NTI Suite 8. Como resultado, se obtuvo una secuencia de ADNc parcial codificante de una ARF putativa que luego fue ampliada mediante la técnica de RACE 3' y se denominó *PpARF1*. Los cebadores se utilizaron en

reacciones estándares de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) conteniendo ADNc de mesocarpo de durazno maduro como molde (los cebadores utilizados se explicitan en la **Tabla 1**). Las condiciones de PCR fueron las siguientes, variando en algunos casos la temperatura de alineamiento o ‘annealing’: 4 min a 94°C (primer ciclo); 45 s a 94°C, 45 s a 53°C/55°C, y 1 min a 72°C (35 ciclos); y 7 min a 72°C (último ciclo).

Primers	Secuencia 5'→3'	Tamaño (pb)
Ara9d	GTTGGGTTGGAGTTGGAGTT	556
AraR2	TCCTCGATATTCATGCCCA	
AraL2	TTCGAGGAGATTAATCACGC	701
Ara4i	CCAGGTCTCTCTCCAGGGTCCAA	
Ara4d	AAGSGTGATATGGTTTGAYCAAGT	586
Ara2i	CCGTCGCAGTTTGAATCAT	
Ara8d	GGAAATTACCTAAGTTCTA	770
Ara3i	TGAATGAACGCGGAGAGATT	

**Tabla 1:** Cebadores utilizados para la clonación parcial de ADNc *PpARF1* de *Prunus persica*. Se muestra el tamaño esperado de los productos de RT-PCR.

### 3.8 Diseño de cebadores y condiciones de PCR para la clonación de *PsARF/XYL*

Con el fin de clonar genes putativos codificantes de ARF/XYL de *Prunus salicina* Lindl. ‘Gigaglia’, se realizaron alineamientos múltiples de secuencias de aminoácidos relacionadas de plantas y se diseñaron tanto cebadores degenerados como específicos a partir de las secuencias conservadas. Las mismas se detallan a continuación con sus números de acceso en GenBank correspondientes: AY309436 (*JPRXyl*, pera); AB073311 (*PpARF/XYL*, durazno), AB073310 (*PpARF2*, pera) AY486104 (*FaXyl1*, frutilla). Para alinear las secuencias se utilizó el programa ClustalW y el diseño de cebadores se llevó a cabo mediante el uso del programa VectorNti Suite8. Como resultado se obtuvo una secuencia de ARN mensajero parcial codificante de una ARF/XIL putativa que luego fue ampliada mediante la técnica de RACE 3' y RACE 5' y se denominó *PsARF/XYL* (*Prunus*

*salicina ARF/XYL*). Los cebadores se utilizaron en reacciones estándares de PCR conteniendo, como molde, una mezcla de ADNc de mesocarpo de ciruela en distintos estados fisiológicos o bien ADN genómico (los cebadores utilizados se explicitan en las **Tablas 2 y 3**). Las condiciones de PCR fueron las que se indican a continuación variando en algunos casos la temperatura de annealing: 4 min a 94°C (primer ciclo); 45 s a 94°C, 45 s a 53°C/55°C, y 1 min a 72°C (35 ciclos); y 7 min a 72°C (último ciclo).

Primers	Secuencia 5'→3'	Tamaño (pb)
<b>NCF</b>	GATGAAGCAAGRGCAATGTAC	569
<b>NCR</b>	AAGGAAYGGCCCAATCCA	
<b>F22</b>	GGAAAGCCTACTTGTGCTGACC	730
<b>R1</b>	TTTGCGAACGTSACATCAAT	
<b>F1</b>	GGTGACAGATGTTTATTGC	685
<b>R3</b>	TCCATGGWYCCAGTGTTTTT	

**Tabla 2:** Cebadores utilizados para la clonación parcial de ADNc *PsARF/Xyl* de *Prunus salicina*. Se muestra el tamaño esperado de los productos de RT-PCR.

Primers	Secuencia 5'→3'	Tamaño (pb)
<b>NCF</b>	GATGAAGCAAGRGCAATGTAC	827
<b>NCR</b>	AAGGAAYGGCCCAATCCA	
<b>Fintro</b>	ATAAAGGCAGTACAACAACTC	723
<b>STOps</b>	CCKAAYTAWRAYTAATCTCTCC	
<b>F22</b>	GGAAAGCCTACTTGTGCTGACC	1309
<b>Rintro</b>	ATTTAGTCGGACGACATTAGTT	

**Tabla 3:** Cebadores utilizados para la clonación parcial de ADN genómico *PsARF/XYL* de *Prunus salicina*. Se muestra el tamaño de los productos de PCR obtenidos.

### **3.9 Electroforesis en geles de agarosa y tinción de ácidos nucleicos**

Una alícuota de los productos de PCR obtenidos (5  $\mu$ L) fue analizada mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5 % en solución reguladora TAE 1X mediante una cuba y fuente de poder BIORAD. Las condiciones de corrida fueron 100 v durante 40 min en solución reguladora de corrida TAE 1X. Se utilizó solución reguladora de carga para las muestras 6X con azul de bromofenol como indicador de frente de corrida y glicerol 50 % para otorgar densidad a la muestra en solución reguladora TE. Luego de la corrida los productos de PCR fueron visualizados mediante un transiluminador UV y fotografiados mediante UVP Doc-It LS Image Acquisition Software, previa tinción de los ácidos nucleicos, durante 1 hora, con una solución de SYBR Green 1x (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

### **3.10 Purificación de bandas a partir de geles de agarosa**

Las bandas del peso molecular deseado fueron cortadas del gel mientras se visualizaban de forma preparativa con transiluminador UV (evitando la sobreexposición para conservar la integridad del ADN). Los trozos de agarosa fueron colocados en un tubo de tipo eppendorf, disueltos agregando una solución reguladora (ADN extraction Kit, Fermentas), incubando los tubos a 55°C durante 5 min y agitando orbitalmente cada 2 min hasta disolución completa. Para la purificación se utilizó una solución de unión del ADN a sílica gel (siguiendo las instrucciones del proveedor) y se realizaron sucesivos lavados mediante agitación orbital y centrifugación. La elución del ADN se llevó a cabo en un volumen final de 15  $\mu$ L. Se analizó 1  $\mu$ L de este volumen mediante electroforesis en gel de agarosa.

### **3.11 Obtención de bacterias competentes**

Se seleccionó una colonia de bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  a partir de placas de Petri y se replicó en 5 mL de medio LB (Luria Bertani) en condiciones de esterilidad mediante uso de un flujo laminar. El tubo de vidrio conteniendo el LB más una colonia bacteriana se incubó en agitador durante toda la noche a 150 rpm y 37°C. Con 2 mL de este cultivo se inocularon 100 mL de LB fresco estéril contenido en un erlenmeyer y se incubó con

agitación a 37°C hasta obtener una  $DO_{680nm} = 0,5$  en espectrofotómetro. Las bacterias se colocaron en tubos de tipo falcon y se cosecharon por centrifugación manteniéndose en hielo hasta su uso. El pellet celular se resuspendió en 40 mL de  $CaCl_2$  estéril frío y se incubó durante 1 hora en hielo. Luego se centrifugó a 4°C durante 10 min a 4000 x *g*. El precipitado se resuspendió en 1 mL de  $CaCl_2$ , se agregó glicerol estéril hasta una concentración final de 15 % y se almacenaron en tubos de tipo “eppendorf” en fracciones de 150  $\mu$ L a -80°C para posteriores usos. Una alícuota fue sembrada en una placa de Petri y colocada en estufa a 37°C durante toda la noche para analizar la viabilidad de las células y la ausencia de contaminación.

### **3.12 Ligación de los productos de PCR y transformación de bacterias**

Una alícuota de la reacción de PCR, con los productos de tamaño esperado, o bien las bandas purificadas a partir de geles de agarosa, fueron utilizadas en reacciones de ligación mediante pGEM-T Easy vector system (Promega Corp., Madison, WI, USA) y ligasa T4 durante toda la noche. Las bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes fueron transformadas con el producto de la ligación mediante shock térmico de la siguiente forma: se incorporó el producto de la ligación (10  $\mu$ L) en condiciones de esterilidad al tubo de tipo eppendorf conteniendo las bacterias competentes (150  $\mu$ L) que fueron colocadas en hielo previamente por unos minutos. Se dejó reposar en hielo durante 1 hora. Luego se colocó el tubo conteniendo la mezcla a 42°C en baño maría durante 1 min 45 s colocando luego las bacterias en hielo rápidamente. Luego de 3 min, se agregaron 850  $\mu$ L de LB estéril y se colocó en agitador a 37°C durante 1,5 h. Luego, una alícuota de 100  $\mu$ L, se sembró en placa de Petri conteniendo LB-agar-ampicilina-XGal. Las placas se colocaron en estufa a 37 °C hasta el día siguiente y se guardaron a 4°C para usos a corto plazo.

### **3.13 PCR de Colonias**

Luego de la transformación y el plaqueo de las bacterias transformadas se aislaron colonias blancas y azules en placas con LB-Agar-Amp-XGal. Las colonias blancas fueron repicadas en nuevas placas de Petri con LB-agar-ampicilina y se colocaron en estufa a 37°C durante toda la noche. Se llevaron a cabo reacciones estándares de PCR utilizando

cebadores SP6 y T7 en concentración 10  $\mu\text{M}$  (cebadores que flanquean el sitio de inserción del vector de clonación pGEMt easy) y una punta de tip, conteniendo las bacterias inoculadas el día anterior, fue introducida y disuelta en cada de tubo de PCR a modo de molde. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 2 min a 94°C (primer ciclo); 30 s a 94°C, 45 s a 54°C, y 1 min a 72°C (28 ciclos); y 7 min a 72°C (último ciclo). Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa y visualizados como se describió previamente. Se consideraron colonias positivas aquellas colonias blancas en placas de LB-Agar-Amp-XGal cuyas reacciones de PCR con cebadores SP6-T7 dieron un producto de tamaño igual al inserto más 150 pb que provienen de la ubicación de los cebadores en el vector.

### **3.14 Extracción de plásmidos y purificación**

Para la preparación de los plásmidos conteniendo los insertos de interés, primero se repicaron las colonias positivas en 5 mL de LB estéril conteniendo ampicilina, con agitación constante a 37°C durante toda la noche. Se obtuvo un pellet bacteriano utilizando una centrífuga de mesa a máxima velocidad durante 1 min cada vez hasta decantar todas las bacterias en un mismo eppendorf. Con el pellet bacteriano se realizó la extracción y purificación del plásmido mediante QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)- método de lisis alcalina- siguiendo las instrucciones del fabricante. El volumen final de elución del plásmido fue de 50  $\mu\text{L}$ .

Se verificó la pureza del plásmido obtenido sometiéndolo a una alícuota de 1  $\mu\text{L}$  a electroforesis en gel de agarosa y se cuantificó mediante Qubit® Fluorometer y Quanti-iT™ dsDNA Assay Kit de Invitrogen. Los plásmidos cuya concentración fue superior a 200  $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$  fueron preparados con los cebadores apropiados y secuenciados.

### **3.15 Análisis bioinformático de las secuencias**

La secuenciación de los insertos contenidos en el vector de clonación se realizó mediante un ABI PRISM® 377 ADN Sequencer (Applied Biosystems, USA). Las secuencias obtenidas fueron introducidas en NCBI BLAST (Altschul *et al.*, 1997; URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para realizar búsquedas de homología. Las proteínas deducidas a partir de las secuencias de nucleótidos fueron sometidas a



alineamientos múltiples con las secuencias de mayor homología obtenidas en el análisis de NCBI BLAST mediante uso del programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994; URL: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). La predicción de la proteína y la deducción del marco de lectura abierto se realizaron mediante NCBI ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf>). Los dominios proteicos fueron identificados con el programa Simple Modular Architecture Research Tool (Letunic *et al.*, 2006; SMART URL: <http://smart.embl-heidelberg.de>). Los péptidos señales y sus lugares de corte se predijeron a partir del programa SignalP (Nielsen *et al.*, 1997; URL: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>). La localización subcelular se predijo a partir de TargetP 1,1 Server (Emanuelsson *et al.*, 2000; URL: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>). El punto isoeléctrico teórico (pI) y los valores de masa de péptidos maduros se calcularon por medio de la herramienta Compute pI/Mw tool ([http://www.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)). Para manipular y analizar las secuencias (diseño de cebadores, etc.) se utilizaron los programas BioEdit 7.0 y Vector NTI Suite 8 así como también alineamientos manuales.

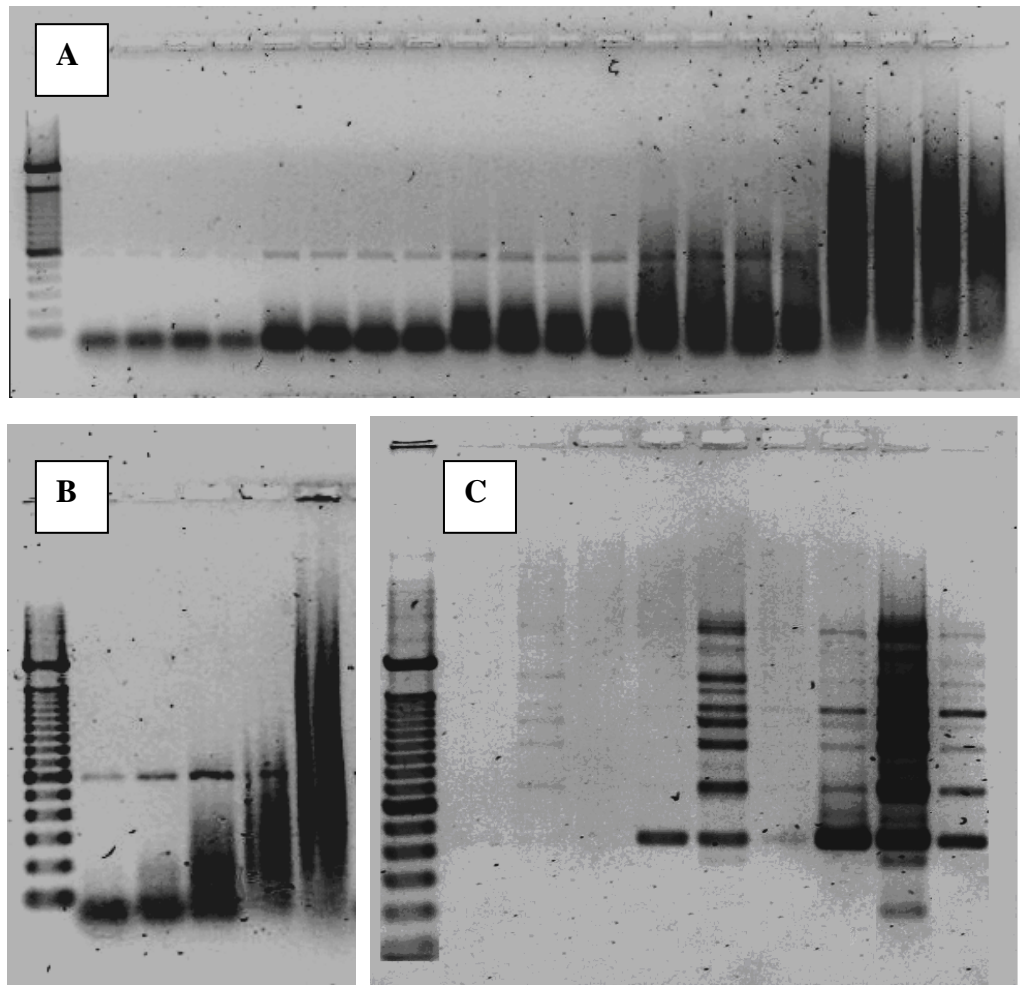
### **3.16 Extracciones de ADN genómico**

Para extraer ADN genómico de *Prunus salicina* se utilizó el ChargeSwitch® genomic DNA isolation kit (Invitrogen) y un separador de partículas magnéticas (MagnaRack, Invitrogen). Se pulverizaron 100 mg de brotes jóvenes en un mortero con N<sub>2</sub> líquido hasta obtener un fino polvo. El mismo se homogeneizó sobre el mortero junto con la solución reguladora de extracción previamente equilibrado a 65°C. La pasta formada se transfirió a un tubo eppendorf y se incubó el extracto durante 2 h a 65°C. Luego se centrifugó para descartar los restos celulares y el sobrenadante se transfirió a otro tubo. La unión con las partículas magnéticas, separación y posteriores lavados se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante. La elución del ADN se realizó con un volumen final de 250 µL, obteniéndose una cantidad aproximada de 5 µg por muestra. Se guardaron alícuotas de 50 µL a -20°C para usos a largo plazo y otras a 4°C para uso inmediato, evitándose de esa forma la degradación del ADN genómico. La concentración de ADN se midió utilizando Qubit® Fluorometer y Quant-iT™ ds Assay Kit (Invitrogen) y

la integridad del ADN se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1% en solución reguladora TAE 1X y tinción con SyBR Green 1X.

### **3. 17 RT-PCR semicuantitativa**

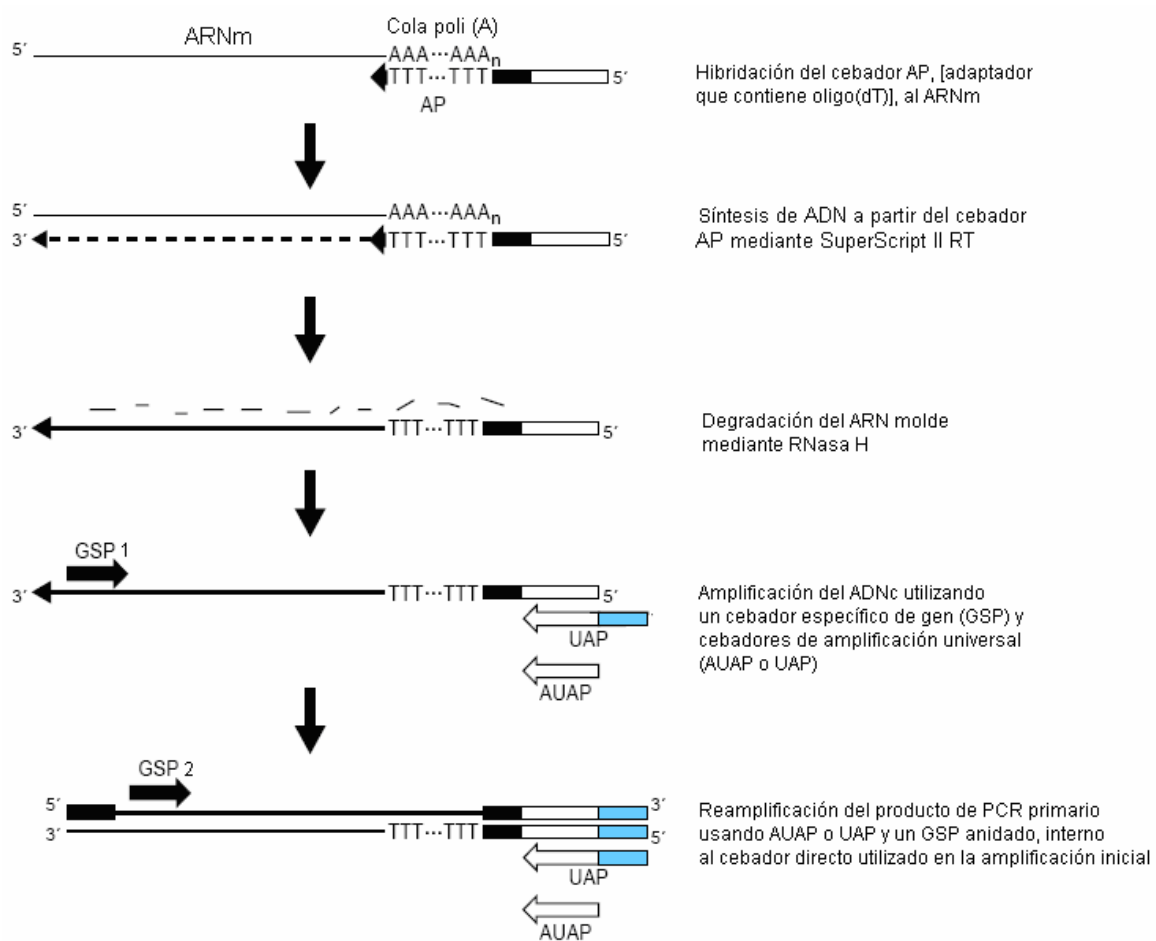
La acumulación de los transcritos de los genes de interés se estimó mediante reacciones de RT-PCR semicuantitativa. El ARN poliadenílico fue preparado como se describió en la sección 5.6. Las condiciones de PCR dependieron de los cebadores utilizados pero en general se aplicó el siguiente programa en termociclador: 4 min a 94 °C (primer ciclo); 45 s a 94°C, 45 s a 53-56°C, y 1 min a 72°C (número variable de ciclos, 25-35); y 7 min a 72°C (último ciclo). El análisis de la expresión del gen de actina fue utilizado como un control interno por tratarse de un gen no sujeto a regulación, de expresión constitutiva en los tejidos analizados. La cantidad de producto de RT-PCR para el gen de actina se utilizó para normalizar los valores de expresión en los casos que en se realizó densitometría de bandas. Las condiciones de PCR para cada pareja de cebadores se optimizaron empíricamente para determinar el número de ciclos del rango lineal de amplificación de la curva que describe el producto de PCR en función del número de ciclos. Para ello, una vez puesta a punto las condiciones óptimas de la mezcla (solución reguladora de PCR, concentración de dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, cebadores y molde), se realizaron reacciones de PCR a número creciente de ciclos (25-28-31-35-40X) para cada pareja de cebadores. La mínima cantidad de producto detectable fue utilizada como criterio para la elección del número de ciclos (**Fig. 3.1**). Se utilizaron marcadores de peso molecular de 100 pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para estimar el tamaño de las bandas obtenidas. Los ensayos se repitieron de forma independiente (desde la extracción de ARN mensajero) y los geles representan varias repeticiones.



**Figura 3.1:** Optimización de la técnica de RT-PCR semicuantitativa. **A:** Efecto del número ciclos sobre cuatro diferentes ADNc (25-28-31-35-40X), **B:** Efecto de la concentración creciente de MgCl<sub>2</sub> **C:** Efecto de tres soluciones reguladoras de PCR de distintos proveedores a 25, 30 y 35 ciclos.

### 3.18 RACE 3' (Amplificación rápida de extremos 3' de ADNc)

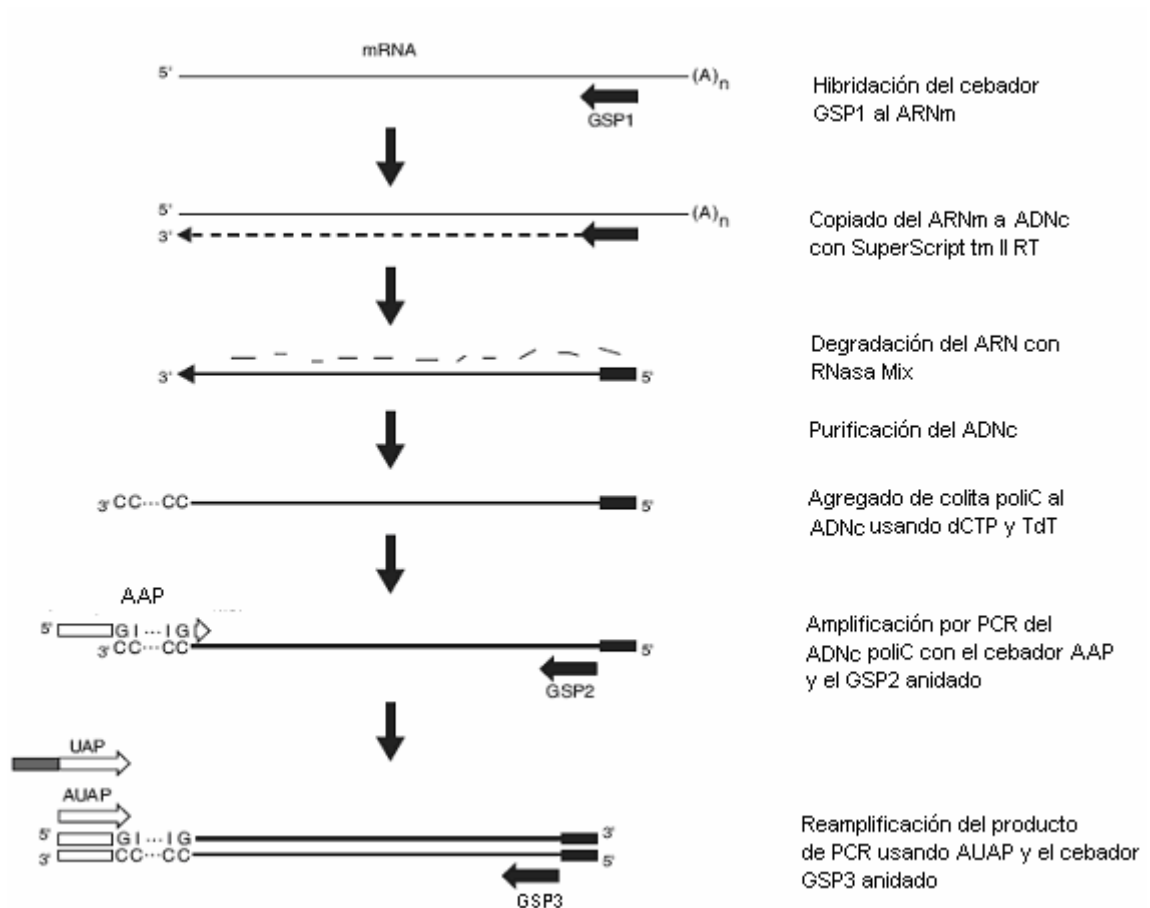
Para obtener los extremos 3' de las secuencias de ADNc codificantes de *PpARF1* y *PsARF/XYL*, se siguieron las indicaciones de "3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends" (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). El ADNc fue sintetizado utilizando un cebador adaptador oligo-dT y un cebador adaptador complementario a éste. Se obtuvo ADNc específico mediante PCR utilizando un cebador específico directo denominado Ara8d (5' GGAAATTACCTTAAGTTCTA 3') para *PpARF1* y un cebador directo F1 (5' GGTGCACAGATGTTTCATTGC' 3') para *PsARF/XYL*. El cebador adaptador reverso AUAP, complementario a la región de la cola poli(A), se utilizó en ambos casos, como se indica en la Fig. 3.2.



**Figura. 3.2:** Metodología RACE 3' utilizada para clonar la región 3' terminal de los ADNc *PpARF1* y *PsARF/XYL*.

### 3.19 RACE 5' (Amplificación rápida de extremos 5' de ADNc)

Para la amplificación por PCR de la zona 5' de ADNc *PsARF/XYL* de ciruela se utilizó la estrategia de "5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends" (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Se muestra un resumen de la técnica en la **Fig. 3.3** y a continuación se detallan las modificaciones realizadas al protocolo original. La mayor consideración a tener en cuenta en la aplicación de esta técnica resultó ser la integridad de la muestra de ARNm inicial utilizada, ya que la técnica no discrimina ARNm degradado (sin CAP) del que no lo está, dando origen muchas veces a productos de amplificación indeseables.



**Fig. 3.3:** Metodología RACE 5' utilizada para clonar la porción 5' terminal de ADNc *PsARF/XYL*. Los cebadores GSP1, GSP2 y GSP3 (anidados) se diseñaron específicamente a partir de la secuencia parcial conocida *PsARF/XYL*.

### 3.19.1 Síntesis de ADNc RACE 5'

Para la síntesis de la primera hebra de ADNc se utilizaron 240 ng de ARNm de brotes de *Prunus salicina*. Se diseñó un cebador reverso GSP1 (cebador específico de gen) en una región distante a la porción 5' del gen, a una distancia de ~ 850 pb río abajo de la misma (R22: 5'GGGTCAGCACAAGTAGGCTTGGG 3'). Con 0,4 µL (1 µM) de GSP1 se realizó la síntesis de la primera cadena de ADNc mediante uso de SuperScript™ II RT modificando, del protocolo original, la temperatura de síntesis que se fijó en 48°C (siendo 42°C la temperatura original) para aumentar la especificidad en la hibridación del cebador GSP1 (previamente se hallaron patrones de bandas inespecíficas en múltiples ensayos mediante uso de diferentes cebadores GSP1, que luego de ser clonadas y secuenciadas no coincidían con las secuencias buscadas). La reacción se llevó a cabo en un volumen

final de 25  $\mu\text{L}$  y la muestra fue tratada con una mezcla de ARNasas (ARNasa H y ARNasa T1) dado que el ARN puede inhibir la siguiente reacción de 'tailing' del ADNc y la subsiguiente PCR. El siguiente paso de purificación del ADNc se llevó a cabo según las indicaciones originales. El exceso de nucleótidos y de cebador GSP1 fue removido mediante purificación con una solución de unión de NaI y las columnas SNAP cuya membrana de sílica une ADN mayor a 200 pb. Luego de sucesivos lavados se eluyó el ADNc en 50  $\mu\text{L}$  de agua destilada. De esta forma, se evitaron interferencias en el paso siguiente de 'dCTP-tailing' del ADNc.

### **3.19.2 'Tailing' homopolimérico de ADNc RACE 5'**

La enzima TdT (deoxinucleotidil transferasa terminal) se empleó para incorporar dCTP en el extremo 3' del ADNc formando una cola homopolimérica que luego se utilizó para la hibridación del cebador complementario AAP (Abridged Anchor Primer). Se utilizaron 10  $\mu\text{L}$  de muestra de ADNc purificada en el paso anterior y 200  $\mu\text{M}$  de dCTP en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ .

### **3.19.3 PCR del ADNc- poli(C)**

Se utilizaron 5  $\mu\text{L}$  de la reacción anterior como molde de PCR utilizando el cebador AAP complementario a la cola poli(C) y un cebador reverso específico de gen GSP2 interno complementario a una zona del gen que dista aproximadamente 800 pb del extremo 5' del mismo (RIO: 5' TCCACCACACAGGCTTTGAA3 3'). Se utilizaron 0,5  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{M}$ ) de cada cebador en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  y 2 unidades de *tac* polimerasa. Las condiciones de operación del termociclador fueron las siguientes: 94°C 3' (1X); 94°C 45'', 58°C 45'', 72°C 1' (35X); 72°C 7' (1X).

### **3.19.4 PCR anidada RACE 5'**

Se diluyeron 5  $\mu\text{L}$  de la PCR anterior en 495  $\mu\text{L}$  de solución reguladora TE y una alícuota de 2,5  $\mu\text{L}$  de esta dilución, se utilizó como molde de PCR. Se utilizó el cebador directo AUAP con un segundo cebador reverso específico de gen, interno, GSP3 en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$ . GSP3 (NestedGSP: 5' CGGGTCACGRAATATGTTTAC3') hibrida en una zona

que dista 600 pb aproximadamente del extremo 5' del gen *PsARF/XYL*. Las condiciones de operación del termociclador fueron idénticas a las señaladas anteriormente excepto que se aumentó la temperatura de hibridación a 60°C. De esta forma, se obtuvo una banda del peso molecular esperado, que se purificó como fue descrito en la sección 5.10 para clonar y secuenciar el extremo 5' del gen *PsARF/XYL*.

### **3.20 Análisis densitométrico de bandas**

El análisis densitométrico de las bandas se llevó a cabo utilizando el programa QuantiScan versión 3.1. Los valores graficados representan las áreas integradas bajo los picos correspondientes a cada banda los cuales son proporcionales a la densidad.

### **3.21 Tratamientos con DNasa I**

El ARNm o el ARN total se trató con DNasa I (Deoxyribonuclease I, Amplification Grade, Invitrogen), de forma previa a la síntesis de ADNc. Las condiciones fueron 1 µg de ARN total (ó 20-50 ng de ARNm), 1 µL 10X solución reguladora DNasa I, 1 µL DNasa I, Amp Grad (1 U µL<sup>-1</sup>) y 10 µL de agua tratada con DEPC. La mezcla se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. La inactivación de DNasa I se llevó a cabo agregando 1 µL de EDTA 25 mM a la mezcla de reacción. Luego se calentó por 10 min a 65°C. Se utilizó una alícuota de este ARN tratado (teniendo en cuenta la dilución efectuada) para la síntesis de ADNc. En experimentos control se utilizaron 2 y 3 unidades de DNasa I obteniéndose resultados similares.

### **3.22 Extracción de ARN total**

Para extraer ARN total se utilizó la técnica descrita por Verwoerd *et al.* (1989), con algunas modificaciones. Se utilizó 1 g de mesocarpo de frutos y se pulverizó con nitrógeno líquido hasta formar un fino polvo. Se agregó 1 mL de solución reguladora de extracción precalentado a 80°C (150 µL de LiCl 4M, 600 µL de Tris-HCl 1M, pH 8, 600 µL de EDTA sódico 100 mM, 600 µL de SDS 10 % p/v, 3 g de fenol, 1050 µL de agua miliQ; para 6 muestras). Luego de agitar mecánicamente en agitador orbital durante 30 s, se agregó 0,5 mL de una solución cloroformo/isoamílico 24:1 recién preparado para cada muestra y se agitó mecánicamente de forma vigorosa. Se centrifugaron las muestras a

10000 x *g* por 5 min a 4°C. Luego de transferir el sobrenadante a otro tubo, se agregó LiCl 4 M en relación 1:1 dejándose precipitar a 4°C toda la noche. Luego se centrifugaron las muestras a 10000 x *g* por 5 min a 4°C y se descartó el sobrenadante disolviendo el pellet en 0,25 mL de agua libre de RNAsas. Luego se agregó 25 µL de acetato de sodio 3M y se agitó mecánicamente. Luego se agregó 0,55 mL de etanol absoluto y se centrifugaron las muestras a 10000 x *g* por 5 min a 4°C. Se descartó luego el sobrenadante y se agregó 0,2 mL de etanol 70%. Se centrifugaron las muestras a 10000 x *g* por 5 min a 4°C. Luego de descartar el sobrenadante, se dejó secar brevemente y se disolvió el ARN total en 50 µL de agua libre de RNAsas.



## CAPÍTULO 4

---

### RESULTADOS

#### Clonación y caracterización de ADNc *PpARF1* de *Prunus persica* (L.) Batsch 'Springcrest'

##### 4.1 Obtención de la secuencia de ADNc *PpARF1*

Para clonar y caracterizar genes codificantes de ARFs desconocidos que tuviesen implicancia en procesos de crecimiento y maduración del fruto de duraznero, se realizaron alineamientos múltiples de las secuencias disponibles en base de datos de especies relacionadas. A partir de estos alineamientos se diseñaron cebadores específicos y degenerados para amplificar mediante la técnica de RT-PCR las secuencias de interés utilizando ADNc de distinta procedencia (mesocarpo de fruto maduro, mesocarpo de fruto verde u hojas de *Prunus persica* 'Springcrest'). De esta forma, se obtuvieron secuencias de ADNc parciales, utilizando 4 combinaciones de cebadores diferentes detallados en la sección 'materiales y métodos'. Cuando las secuencias parciales fueron alineadas se obtuvo una secuencia 'contig' que carecía de una porción en la región 3' del gen. Mediante la técnica de 3' RACE se pudo completar la secuencia la cual consistía de 2234 pb. Mediante análisis de homología en BLAST-NCBI se estableció que esta secuencia 'contig' representaba la región codificante de un gen de interés. La misma fue confirmada a través de sucesivas clonaciones parciales y secuenciaciones realizadas mediante uso de cebadores específicos (que fueron diseñados a partir de este "borrador" de secuencia). Mediante análisis en BLAST-NCBI se pudo determinar que el clon obtenido (GenBank no. de acceso DQ486870) presentaba una gran homología de secuencia con otras ARFs conocidas por lo que se lo denominó *PpARF1* (Fig. 4.1).

```

PpARF1 ATGGGCTCTCGCAAGTCCCCTCATGTTGTTCTTCTGCTATATGT-CTTGGTTTGCT--TT 57
P. pirifolia ATGGGCTCTTGAAGTCCCCTCACATTGTTCTTCTGCTATATGT-CTTGGTTTGCT--CC 57
M. domestica ATGGGTTCTTGAAGTCCCCTCACGTTGTTCTTCTGCTACATGT-CTTGGTTTGCT--CT 57
S. lycopersicon ATGGAGTCAAGGCATTCCATTCACGTAAGTCTTCTAGTTTTGTTTTGTTTTGTTCTGCC 60
**** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PpARF1 GTGTATCAATCTTTTGCTATTGGAGTTGATACGAACCAGACAGCAAAGCTGCTGGTGGAT 117
P. Pirifolia GTCTATCGTTGCTTTGCCATTGGAGTCGATGCAAACCAGACAGCAAACCTGCTTATCGAT 117
M. domestica GTCTATCGTTGCTTTGCCATTGGAGTCGATGCAAACCAGACAGCAAACCTGCTTATCGAT 117
S. lycopersicon CTGTGCCAATGCTCTGCTACTGGGGTTGAAGCAAACCAGACAGCACTGCTTGTGAAT 120
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PpARF1 GCTTCTGAAGCATCGGGACGGCCAATATCTGAAACACTGTTTGGAAATTTCTTTCGAGGAG 177
P. pirifolia GCTTCTCAAGCATCTGCACGCCAATATCTGACACGCTGTTCCGAAATTTCTTTGAGGAG 177
M. domestica GCTTCTCAAGCATCCGCACGCCAATATCTGACACGCTGTTTGGAAATTTCTTTGAGGAG 177
S. lycopersicon GCATCCGAAGCATCAGCAAGGAGAATACCTGATACCCTTTTTGGTATATTTCTTTGAGGAG 180
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PpARF1 ATTAATCATGCTGGTGC CGGGCTATGGGCTGAGCTTGTAAGCAACAGAGGTTTTGAA 237
P. Pirifolia ATTAACCATGCTGGTGC CGGGGTTGTTGGGCTGAGCTTGTAAGCAACAGAGGTTTTGAA 237
M. domestica ATTAACCATGCTGGTGC CGGGGTTGTTGGGCTGAGCTTGTAAGCAACAGAGGTTTTGAA 237
S. lycopersicon ATCAATCATGCTGGTGC TGGTGGATTGTTGGGCTGAGCTTGTAAGCAACAGAGGTTTTGAA 240
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PpARF1 GCTGGGGGCCCTAACGTTCCCTTCAACATTGATCCTTGGTCTATAATTGGGAATGAGTCA 297
P. pirifolia GCTGGGGGCCCTAACACTCCTTCAACATTGATCCTTGGGCGATAATTGGGAATGAGTCC 297
M. domestica GCTGGGGGCCCTAACACTCCTTCAACATTGATCCTTGGGCGATAATTGGCAATGAGTCC 297
S. lycopersicon GGTGGAGGCCCAACGTTACCTTCAAAATATTGATCCTTGGTCTATCATTTGGAGATGAGTCC 300
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PpARF1 TCTTTGATAGTGTC AACGGACCGTTCTTCATGCTTTGACCGCAACAAGTTGCACTTCGA 357
P. pirifolia TTTTAAATTGTTGTC AACGGACCGTTCTTCATGCTTTGACCGCAACAAGTTGCACTCCGA 357
M. domestica TCTTTGATTGTTGTC AACGGACCGTTCTTCATGCTTTGACCGCAACAAGTTGCACTCCGA 357
S. lycopersicon AAAGTGATTGTTGTC AACAGACCGTTCTTCATGCTTTGATCGGAATAAAATTGCAAGTTCAA 360
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PpARF1 ATAGAGGTGCTATGTGATAGCCAAGGTGCCAGTAGCTGCCCTGATGGTGGTGTAGGAATT 417
P. pirifolia ATGGAGGTGCTATGTGACACCCAAGGCGCCAATAGCTGCCCTGCTGGGGGTGTTGGAATT 417
M. domestica ATGGAGGTGCTATGTGACACCCAAGGCGCCAATAGCTGCCCTGCTGGGGGTGTTGGAATT 417
S. lycopersicon GTGCAGGTGCTCTGTGACCATACAGGTGCCAATATCTGTCCAGATGGAGGAGTTGGCATT 420
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PpARF1 TATAATCCTGGGTTCTGGGCGATGAATATTGAAAAGGGGAAGACCTACAGTGTGTTCTT 477
P. pirifolia TATAACCTGGGTTCTGGGCGATGAATATAGAAAAGGGGAAGACATAAATGCTGTTCTT 477
M. domestica TATAACCTGGGTTCTGGGCGATGAATATAGAAAAGGGGAAGACATAAATGCTGTTCTT 477
S. lycopersicon TACAACCCGGGATTTCTGGGCGATGAATATTGACAGGGAAAGAGTTACAACACTAGTGTCT 480
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PpARF1 TATGTCCGCTCATCTGGATCAATCAATGTGTCCGTATCATTGACGGGCTCAGATGGGTTG 537
P. pirifolia TATGTTTCGTTTCTGGATCAATCAATGTATCCGTATCACTGACAGGCTCAGATGGGTTG 537
M. domestica TATGTTTCGTTTCTGGATCAATCAATGTATCCGTATCACTGACAGGCTCAGATGGGTTG 537
S. lycopersicon TATGTTTCGTTCCGAAGAATCAGTCAATGTATCTGTCCGTTTAACTGGTTCAAATGGATTG 540
**** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

**Figura. 4.1:** Alineamiento parcial del ADNc obtenido (*PpARF1*) de *Prunus persica* con secuencias de máxima homología en BLAST-NCBI. Números de acceso: AB073311 *P. Pirifolia* (pera); AY309436 *M. domestica* (manzana); AB073310 *S. lycopersicon* (tomate).

## 4.2 Análisis bioinformático de la secuencia de ADNc *PpARF1*

Mediante uso del programa 'ORF finder-NCBI' se estableció que el ADNc secuenciado contenía una región codificante probable de 2034 nucleótidos (**Fig. 4.2**). La proteína deducida a partir de este ADNc contaba con 677 aminoácidos (nucleótidos 81-2114). Mediante uso del programa SignalP se predijo la presencia de un péptido señal de 25 aminoácidos de longitud en la proteína *PpARF1*. La secuencia señal presente en el extremo amino terminal de *PpARF1* se clivaría entre los residuos Ala e Ile en las posiciones 25 y 26 respectivamente, resultando en una proteína madura de 71,6 kD, con un pI teórico de 4,94. El programa SMART identificó un motivo COOH-terminal conservado en ARFs de casi 200 residuos (en los residuos 460-651) que cataliza la hidrólisis de uniones de restos arabinosilos terminales no reductores en polisacáridos que contienen L-arabinosa. También permitió identificar un módulo de unión a hidratos de carbono (CBM\_4\_9), que comienza en la posición 70 hasta la posición 235, aunque se requeriría mayor evidencia experimental para establecer si este dominio realmente confiere unión a hidratos de carbono. El programa TargetP 1.1 predice fuertemente que la proteína codificada por *PpARF1* sería exportada a apoplasto sugiriendo que esta ARF putativa estaría involucrada en la liberación de restos arabinosilos de la pared celular. El programa arrojó 10 presuntos sitios de *N*-glicosilación, sobre la base de la presencia del tripéptido Asn-X-Ser/Thr (donde X es cualquier aminoácido excepto Pro) de los cuales solo 6 Asn fueron candidatas más probables de glicosilación y solo un sitio de *N*-glicosilación, localizado en la posición 168 del péptido maduro, resultó tener una alta especificidad (Asn muy probablemente glicosilada).

gttgggttgagttgagtttaaaaaaagaaaacaagaatatttatttcagctgtggaagtatt  
 ggggtggttaactgagcaatgggctctcgcaagtcccctcatgttgttcttctgctatat  
 M G S R K S P H V V L L L Y  
 Gtcttggtttgctttgtgtatcaatcttttgctattggagttgatcgaaccagacagca  
 V L V C F V Y Q S F A I G V D T N Q T A  
 aagctgctgggtgagctctctgaagcatcgggacggccaatctgaaacactgtttgga  
 K L L V D A S E A S G R P I S E T L F G  
 attttcttcgagagattaatcatgctggtgcccggggctatgggctgagcttgaagc  
 I F F E E I N H A G A G G L W A E L V S  
 aacagaggttttgaagctggggccctaacgttccttccaacattgatccttggtctata  
 N R G F E A G G P N V P S N I D P W S I  
 attgggaatgagtcattctttgatagtgcaacggaccgttcttcatgctttgaccgcaac  
 I G E S S L I V S T D R S S C F D R N  
 aaggttgcaactcgaatagaggtgctatgtgatagccaaggtgccaagtgcctctgat  
 K V A L R I E V L C D S Q G A S S C P D  
 ggtggtgtaggaatttataaactcctgggttctggggcatgaatattgaaaaggggaagacc  
 G G V G I Y N P G F W G M N I E K G K T  
 tacagtgttcttcttattgtccgctcatctggatcaatcaatgtgctcctgatcattgacg  
 Y S V V L Y V R S S G S I V S V S L T  
 ggtcagatgggtgcagaaacttgctgctgcaacattatagcttctgattcagaagt  
 G S D G L Q K L A A A N I I A S D S E V  
 taaaactggacaaaagtgaagttatgttggaaagcccaaggaacaaatcctaattcaaga  
 S N W T K V E V M L E A Q G T N P N S R  
 ctgcaactgacaacaacagaaagggttatattggttgcagtttccagtcagtcgcc  
 L Q L T T T R K G F I W F D Q V S V M P  
 ctggatacatataagggacatggatttcggaaggacctgttgaatgttgaagattta  
 L D T Y K G H G F R K D L V E M L E D L  
 aaactcaatttatcagatttccaggtggcttctcgtcgaagtggaatggctacgaaat  
 K P Q F I R F P G G C F V E G E W L R N  
 gcatttctgttgaagaacaattggacctgggaagagacactggacactttggtgat  
 A F R W K E T I G P W E E R P G H F G D  
 gtttggatgactggactgatgacggaattggttattttgagtttctccaactagcagag  
 V W M Y W T D D G I G Y F E F L Q L A E  
 gacottggtacattgccaatatgggtatttaataacggaatcagtcacaccgatcaagtt  
 D L G T L P I W V F N N G I S H T D Q V  
 gatactccagtgcttaccatttgtacaggaagctctgatggttcttgcagtttgcagta  
 D T S S V L P F V Q E A L D G L E F A R  
 ggcagtcctaattctacctgggttctctcctgctgcaatgggacaccagaacccttt  
 G S P S T W G S L R A A M G H P E P F  
 gacttgagatattgttgcatttgggaatgaggattgcggaaaaaagaactacctaggaat  
 D L R Y V A I G N D C G K K N Y L G N  
 taccttaagttctatagtgctataaaaacgtgcctatccagacatcaaaatgatttcaaac  
 Y L K F Y S A I K R A Y P D I K M I S N  
 tgcgacggatcttctcgaagttggatcatccagctgatttgtatgattttcatgtcaat  
 C D G S S V L P F V A L D H P A L Y D F H V N  
 acagatgcaaaaacatgttttctatgctcatcagtttgatcatacatcagctagtggt  
 T D A K N M F S M A H Q F D H T S R S G  
 cccaaggttttgtgagtgagtgatgcccgtcactgggaaagatgctggaacgggaagttct  
 P K A F V S Y A V T G K D A G T G S L  
 ctacgactaggtgtagctgatttcttattgggctgggaaaaaacagtgatgttgt  
 L A A L G V A G F L I G L E K N S D V V  
 gagatggcatgttatgaccactcttcttgaatgccaataacaggaggtggaacccagat  
 E M A C Y A P L F V N A N N R R W N P D  
 gcaattgctttaaactcctcacatctctatgggactcctagctactggtgcaacgtctt  
 A I V F N S S H L Y G T P S Y W V Q R L  
 tttaacgaaatcaagtgagcaactattttcaatgcaacactccaacaaatttgtctact  
 F N E S S G A T I F A T L Q T L S T  
 tcaacttctgcatctgcaatttctggaataatcagaaatgggaatagttacctaaga  
 S L L A S A I S W K N S E N G N S Y L R  
 atcaagattgtgaactcggaaacaaatagtgatctcaagattgctgtggacgggttg  
 I K I V N F G T N I V N L K I A V D G L  
 gagccgaattccatctgctgctgagtcacccaagaccgtgctcacatcaaccaacctg  
 E P N S I N L S E S T K T V L T S T N L  
 atggatgagaattcctttaaagtgccaaagaagtgataccgaaccggttctacttgag  
 M D E N S F N E P K K V I P N R I L L E  
 aaggctggtgagcgggtgaggtatggaggtgcaatctcctcgcgttcttaccaca  
 K A G E D G E D M E V A I S P R S F T T  
 attgatttcttaataagaatcaagctttatcaggacaactggagctgattctgtctctgta  
 I D F L I E S S F I R T T G A D S V S V  
 tcttctattttaaaggttagaaatagaagaagttatcatatgcaatcgaataaaataatccc  
 S S I  
 atgtaagtaaatataattccatgtaattagatgaataatccaatgtaatacaatga  
 aataatcccactgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

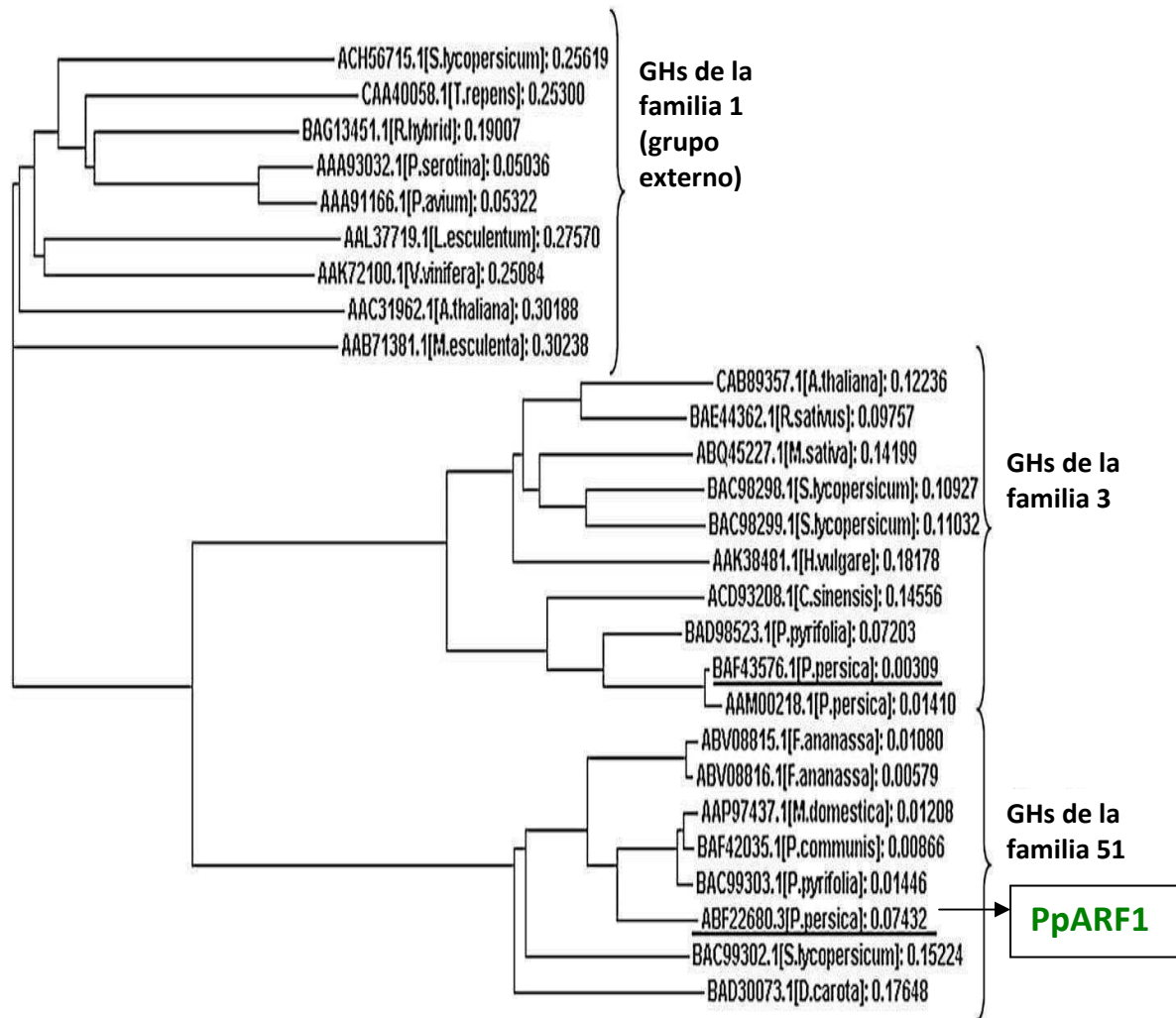
**Figura. 4.2:** Secuencia completa *PpARF1* de durazno y el análisis bioinformático de la proteína deducida. Se indican los codones de iniciación y terminación de la traducción en recuadros y negrita y la cola poliA del ARNm en negrita. Subrayado se muestra el péptido señal de dirección a apoplasto, en letra cursiva las regiones 5' y 3' no traducidas de los extremos y en fondo de color los dominios proteicos conservados según el programa SMART (gris oscuro: dominio putativo de unión a hidratos de carbono NH<sub>2</sub> terminal, gris claro: dominio catalítico COOH-terminal). Las asn (N) probablemente glicosiladas se muestran en recuadros rojos. Se indican los aminoácidos del sitio activo probable recuadrados en verde (Glu 384 -ácido catalítico- y Glu 461 -nucleófilo-) propuestos previamente por Shallom (2002) y Henrissat (1995).

### 4.3 Análisis filogenético de *PpARF1*

La secuencia de aminoácidos deducida a partir de ADNc *PpARF1* fue alineada con otras secuencias publicadas de glicosilhidrolasas (GHs) de plantas clasificadas en tres familias diferentes, las familias 1, 3 y 51, mediante el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) y se obtuvo un árbol filogenético (**Fig. 4.3**). El árbol fue construido utilizando las enzimas de la familia 1 como grupo externo. Las GHs que son miembros de la familia 51 usualmente hidrolizan un relativamente bajo número de sustratos, incluyendo arabino-oligosacáridos de cadena corta. La familia 51 de GH (Coutinho y Henrissat, 1999; URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>) comprende ARFs (EC 3.2.1.55) y endo- $\beta$ -glucanasas (EC 3.2.1.4). Actualmente, el sitio CAZy registra 510 entradas en la familia 51 de GHs en total (<http://www.cazy.org/fam/GH51.html>), pero sólo 84 en organismos eucariotas y muy pocas enzimas de árboles frutales, con probada o putativa actividad de ARF por lo cual ramas adicionales corresponden a enzimas de otros organismos eucarióticos o bacterias.

El análisis bioinformático de los alineamientos proteicos revela que la proteína *PpARF1* contiene entre 86 y 83 % de identidad de secuencia de aminoácidos con homólogos de ARF provenientes de manzana (Nro. de acceso en GenBank: [AY309436](#)), pera japonesa (Nro. de acceso en GenBank: [AB073311](#)) y pera europea (Nro. de acceso en GenBank: [AB067643](#)).

La secuencia correspondiente a *PpARF/XYL* de durazno fue introducida para la construcción del árbol como exponente de la familia 3 de glicosilhidrolasas y como se verá en los capítulos posteriores guarda relación con genes clonados en esta tesis.



**Figura. 4.3:** Árbol filogenético inferido a partir de GHs de plantas. Comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas de *PpARF1* y *PpARF/XYL* de duraznero con otras  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa/ $\beta$ -D-xilosidasas y  $\beta$ -D-xilosidasas. *PpARF1* fue clonado en el transcurso de esta tesis, *PpARF/XYL* fue clonado por Hayama *et al.* (2006) e introducida como exponente de la familia 3 de GHs. Los números a continuación de los nombres específicos indican la distancia filogenética relativa entre ramas.

#### 4.4 Análisis de la actividad de $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa

Se cosecharon y seleccionaron frutos en desarrollo de duraznero sobre la base de su diámetro ecuatorial, producción de etileno y firmeza para las determinaciones posteriores (**Fig. 4.4**). Los duraznos fueron clasificados según la medición de estos índices, procesados para la obtención de extractos de ARFs (para los ensayos de actividad) o disectados e inmediatamente almacenados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (para posterior análisis de ARN) sin un período de almacenamiento previo.

Al realizar el seguimiento de la ontogenia de los duraznos se obtuvo que el crecimiento de los frutos se extendió hasta los 74 Ddpf, momento en que el fruto alcanzó prácticamente su tamaño máximo (**Fig. 4.4**). Durante todo este período los frutos incrementaron su diámetro ecuatorial sin una producción de etileno considerable. Las etapas de crecimiento se diferenciaron de la siguiente manera: S1 (fase inicial de crecimiento exponencial) que tuvo una duración de 11 días, S2 (fase estacionaria) con 6 días de duración, luego la fase S3 (fase de expansión celular) que tuvo una extensión de 27 días y dentro de la cual se analizaron dos estados diferentes, denominados S3 temprano (S3-E) a los 48 Ddpf y S3 tardío (S3-L) a los 67 Ddpf, estados que delimitaron el comienzo y el fin de la etapa de agrandamiento celular. Luego, S4, que tuvo una duración de 4 días, momento en el que el fruto alcanzó su tamaño completo encontrándose aún inmaduro (fruto preclimatérico). Los frutos comenzaron a producir etileno a partir de los 75 Ddpf, de forma concomitante con el inicio de la pérdida de firmeza (ablandamiento). Las etapas de maduración fueron designadas de la siguiente manera: R1 (inicio de producción de etileno climatérico), R2 (madurez incipiente), R3 (madurez intermedia), R4 (madurez completa, pico de producción de etileno), R5 (sobremadurez). Las transiciones de estado fueron determinadas según Chalmers y Van den Ende (1975). El máximo en la producción de etileno ( $11,5\text{ }\mu\text{L g}^{-1}\text{ h}^{-1}$ ) se observó en el estado denominado R4, a los 78 Ddpf, cuando el fruto se encontraba maduro por completo y el ablandamiento ( $\sim 20\text{ N}$  de firmeza) alcanzaba los niveles de consumo fresco del mismo.

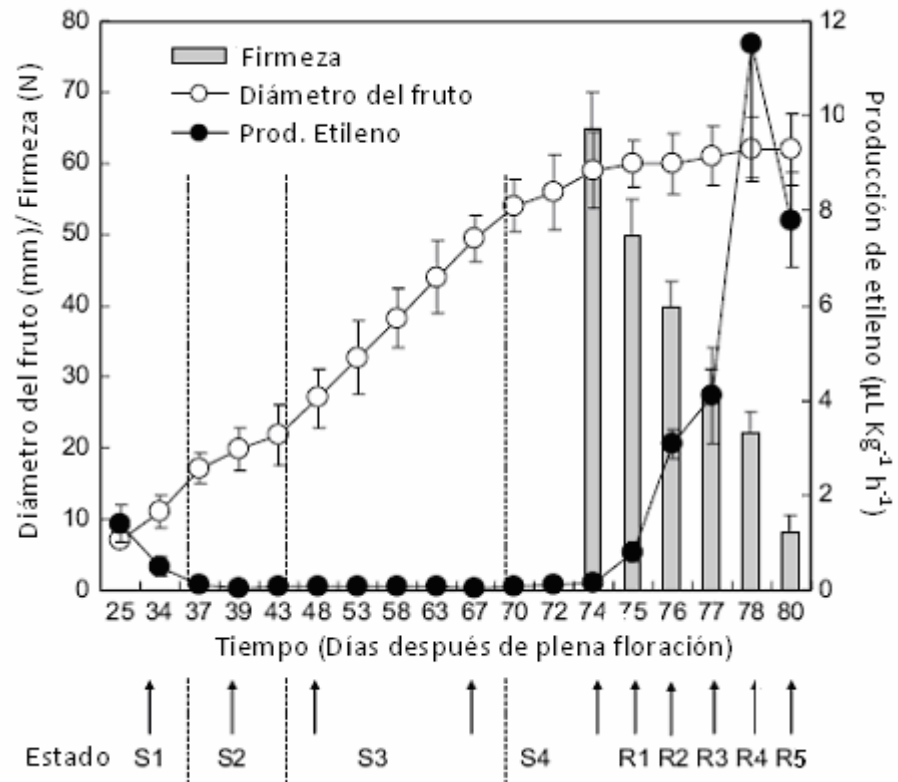
Los datos de actividad enzimática fueron expresados por unidad de peso fresco o por fruto. La actividad enzimática expresada por fruto, en lugar de la actividad enzimática específica (es decir, expresada por unidad de proteína), permite verificar los cambios en

los niveles de actividad con independencia de los cambios en los niveles de proteína por unidad de peso, que ciertamente se producen a través de la ontogenia del fruto.

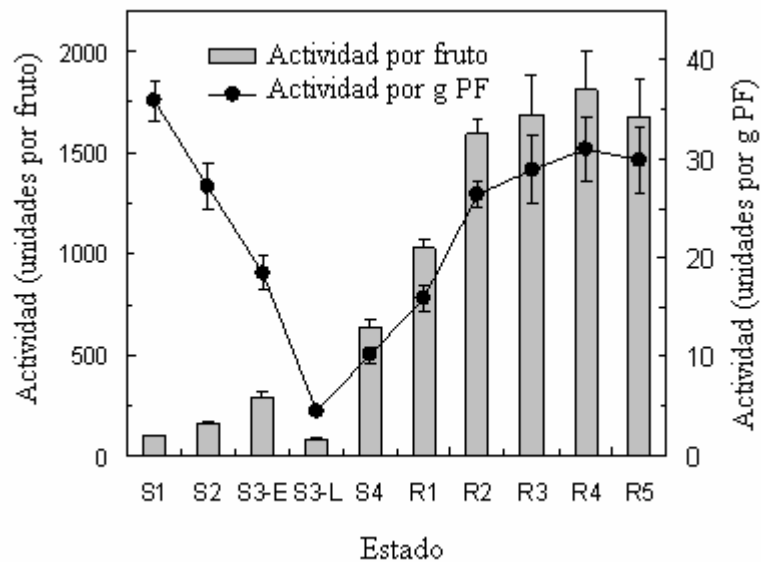
Los frutos en estado S1 mostraron altos niveles relativos de actividad total de ARFs basándose en unidades de peso fresco pero la actividad fue descendiendo durante S2 y S3 alcanzando un valor mínimo en S3-L (**Fig. 4.5**). Sin embargo, la actividad total del fruto fue relativamente baja en S1 y se incrementaba paulatinamente en el mesocarpo durante la fase estacionaria y durante la fase de expansión celular, disminuyendo al final del estado S3. En la etapa final de crecimiento (S4) y progresivamente durante la maduración, la actividad total de ARF del fruto mostró un incremento relativo importante al comparar sus niveles con los obtenidos durante el desarrollo del fruto, con un valor máximo en R4, que coincide con el pico en la producción de etileno climatérico.

Por otro lado, se habían tomado muestras separando distintos tejidos del fruto en estados ontogénicos específicos, de la siguiente manera: epicarpo, mesocarpo externo y mesocarpo interno, como fue descrito en la sección 'Materiales y Métodos'. Si bien los análisis de actividad enzimática, por lo común, son llevados a cabo a partir de muestras de mesocarpo indistintamente, se evaluaron posibles diferencias en relación a la distribución espacial de la actividad enzimática del fruto. La actividad resultó mayor en el mesocarpo interno y menor en el mesocarpo externo, en todos los estados analizados, exceptuando R1 (**Fig. 4.6**). En duraznos en estado S3 temprano, R2 y R5, el epicarpo mostró una actividad enzimática intermedia en relación con la obtenida en los otros dos tejidos. Los resultados muestran que la distribución de la actividad enzimática de ARF es heterogénea dentro del fruto.

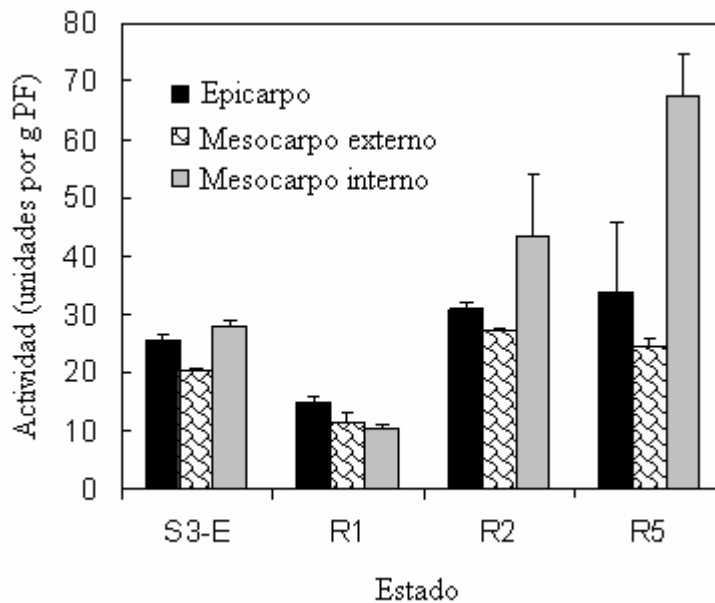




**Figura. 4.4:** El diámetro del fruto, la producción de etileno y la firmeza de duraznos ‘Springcrest’ durante el crecimiento y la maduración. Los valores representan la media  $\pm$  DE de 15 (etileno y firmeza) o 50 (diámetro) repeticiones. Las flechas indican la toma de muestras para el análisis de ARN y ensayos de actividad de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa



**Figura. 4.5:** Actividad total de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa durante el crecimiento y la maduración de duraznos ‘Springcrest’. La actividad fue expresada tanto por gramo de peso fresco (PF) como sobre la base del fruto entero. Se definió una unidad enzimática como la cantidad de enzima que hidroliza  $1 \mu\text{g h}^{-1}$  de *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranósido. La actividad enzimática fue expresada como la media  $\pm$  DE (Desvío Estándar) de tres repeticiones.

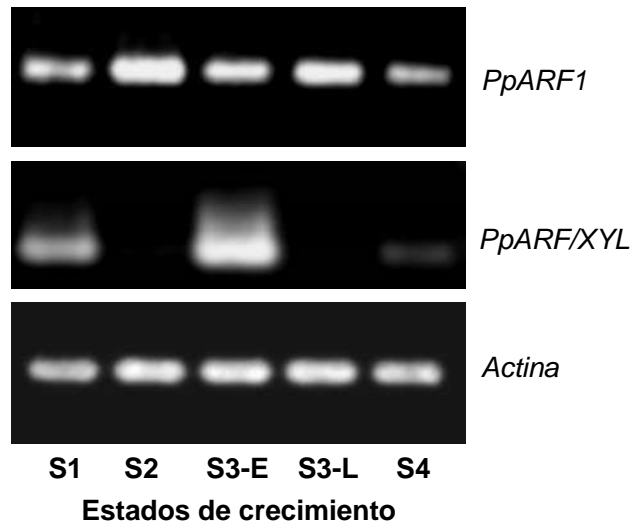


**Figura. 4.6:** Actividad de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa total en tres tejidos diferentes (epicarpo, mesocarpio externo y mesocarpio interno) de frutos en estado S3-E (S3 temprano, durante el crecimiento), R1, R2 y R5 (durante la maduración). La actividad fue expresada por gramo de peso fresco (PF). No se analizaron frutos más jóvenes debido a la imposibilidad de separar apropiadamente los tres tejidos. Se definió una unidad enzimática como la cantidad de enzima que hidroliza  $1 \mu\text{g h}^{-1}$  de *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranósido. La actividad enzimática fue expresada como la media  $\pm$  DE (Desvío Estándar) de tres repeticiones.

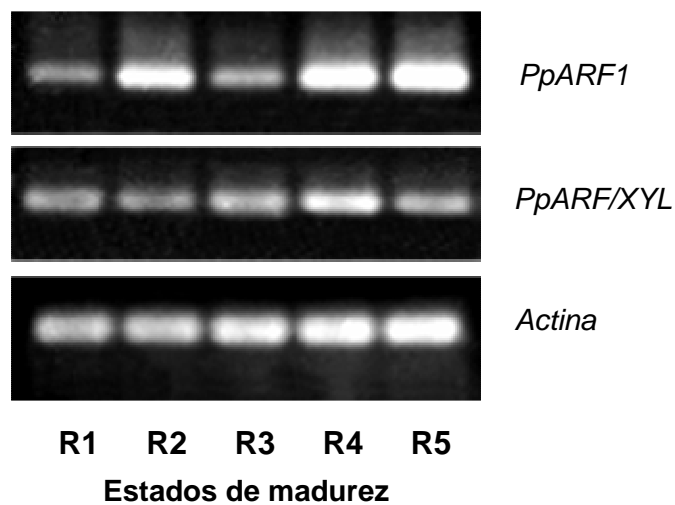
## 4.5 Expresión de los genes *PpARF1* y *PpARF/XYL* de *Prunus persica*

### 4.5.1 Patrón de expresión temporal en mesocarpio

El patrón de expresión temporal, tanto de *PpARF1* como de *PpARF/XYL*, fue analizado utilizando ARNm de mesocarpio de fruto (Fig. 4.7 y 4.8). La acumulación de ARNm *PpARF1* fue detectada en cada estado ontogénico, con un máximo en S2 y una disminución subsiguiente hacia S4 (Fig. 4.7). Notablemente, la acumulación de los transcritos de *PpARF1* no mostró una correlación positiva con la tasa de crecimiento dado que sus niveles fueron más altos en S2 que en S3. Por otra parte, el ARNm *PpARF1* se acumuló de forma significativa en S3-L (S3 tardío), estado en el que la actividad de ARF resultó mínima. En contraste, la expresión del gen *PpARF/XYL* fue relativamente alta sólo en estados de desarrollo específicos, como el denominado S3-E (S3 temprano) y, en menor medida, S1.



**Figura. 4.7:** Análisis de la acumulación de transcritos *PpARF1* y *PpARF/XYL* mediante RT-PCR semicuantitativa, durante el crecimiento de duraznos ‘Springcrest’. Los frutos fueron cosechados y asignados a distintos estados fisiológicos de la siguiente forma: S1 (34 Ddpf; aparición del fruto, fin de la fase inicial de crecimiento exponencial), S2 (39 Ddpf; fase estacionaria), S3 temprano (S3-E) y tardío (S3-L) (48 Ddpf y 67 Ddpf, respectivamente; fase de expansión celular), y S4 (74 Ddpf; fruto de tamaño completo pero inmaduro, preclimatérico). El gen de actina se utilizó como control interno. Ddpf: días después de plena floración.



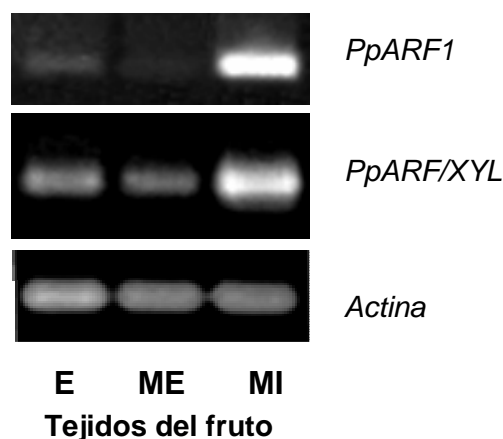
**Figura. 4.8:** Análisis de la acumulación de transcritos *PpARF1* y *PpARF/XYL* mediante RT-PCR semicuantitativa, durante el ablandamiento de duraznos ‘Springcrest’. Los frutos fueron cosechados en 5 estados de ablandamiento: R1 (inicio de producción de etileno climatérico), R2 (madurez incipiente), R3 (madurez intermedia), R4 (madurez completa, pico de producción de etileno), R5 (sobremadurez). El gen de actina se utilizó como control interno.

Valero *et al.* (2007) clasificaron los duraznos durante el proceso de maduración en tres clases distintas usando criterios de firmeza establecidos previamente. El umbral de 35 N es la firmeza mínima en duraznos por sobre la cual no se produce deterioro notorio del fruto durante las prácticas de manejo estándares, cuando el mismo es transferido a los puntos de venta. Los duraznos entre 18 y 35 N son considerados como “listos para comprar”, dado que comienzan a ceder ante la presión de la palma y a liberar su aroma. Finalmente, frutos por debajo de 18 N se consideran “listos para comer”, aunque aquellos entre 8 y 13 N, son considerados óptimos para la aceptación por parte del consumidor (Dawson *et al.*, 1992). Estos umbrales fueron seleccionados dado que indican cambios críticos durante la maduración en postcosecha.

Los transcriptos *PpARF1* y *PpARF/XYL* estuvieron presentes en cada estado de ablandamiento aunque con distintos niveles de acumulación (**Fig. 4.8**). Se hallaron aumentos sustanciales en los transcriptos *PpARF1* en frutos R2 (comienzo del pico climatérico), en frutos R4 (fin del pico climatérico) y en frutos R5 (período fundente del ablandamiento), mientras que los transcriptos *PpARF1* disminuyeron en R1 y R3. En este análisis, los niveles de transcriptos *PpARF1* y *PpARF/XYL* alcanzaron un máximo durante R4 y R5 respectivamente, estados en los que se había detectado la mayor actividad de ARF (**Fig. 4.5**) siendo R4 el estado que coincide con el pico en la producción de etileno declinando levemente en R5 (**Fig. 4.4**). Por otro lado, estos resultados muestran que la acumulación de transcriptos *PpARF1* y *PpARF/XYL* en el fruto comienza antes del pico climatérico (**Fig. 4.7**).

#### **4.5.2 Patrón de expresión espacial en el fruto**

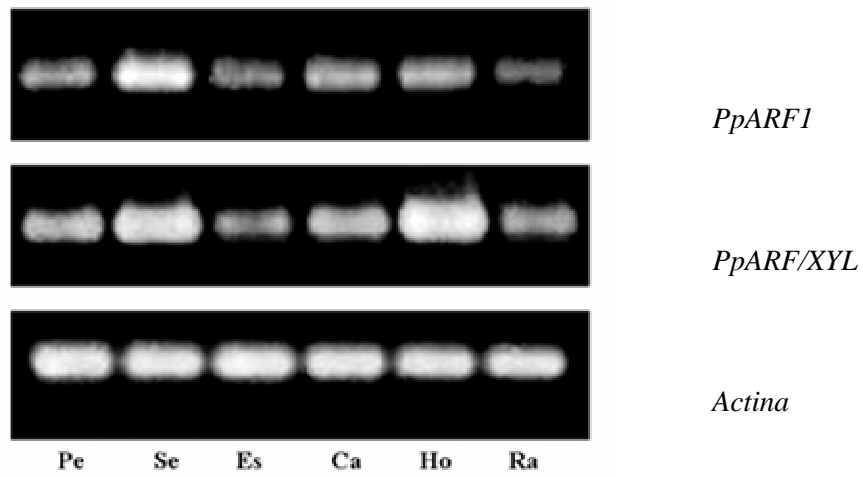
Se realizaron análisis de RT-PCR para determinar la acumulación de ARNm en tres tejidos del fruto (**Fig. 4.9**). La acumulación máxima de los transcriptos de *PpARF1* y *PpARF/XYL* ocurrió en el mesocarpo interno. El ARNm de *PpARF/XYL* se detectó en menor medida en epicarpo y en mesocarpo externo. En cambio, la acumulación de transcriptos de *PpARF1* en esos tejidos fue difícilmente detectable. Como se verá más adelante, se halló un patrón de expresión muy parecido cuando las muestras de ADNc provenían de mesocarpo de ciruelas para los mismos tejidos analizados en esta sección.



**Figura. 4.9:** Análisis de la acumulación de transcritos *PpARF1* y *PpARF/XYL* mediante RT-PCR semicuantitativa en tres tejidos del fruto en estado de crecimiento S3-E (S3 temprano). Los tejidos fueron los siguientes: epicarpo (E), mesocarpo externo (ME) y mesocarpo interno (MI). El gen de actina se utilizó como control interno.

#### 4.5.3 Patrón de expresión en otros tejidos

Se realizaron análisis de RT-PCR para analizar si los transcritos de *PpARF1* y *PpARF/XYL* son detectables en otros tejidos, diferentes a los del fruto. Ambos genes se expresaron en todos los tejidos vegetativos y reproductivos analizados: pétalos, sépalos, estambres, ovarios, hojas y raíces, a niveles variables (**Fig. 4.10**). En órganos vegetativos, el máximo nivel de ARNm de *PpARF1* se encontró en sépalos mientras que el máximo nivel de ARNm de *PpARF/XYL* ocurrió en hojas maduras y sépalos. En menor medida, la acumulación de transcritos de *PpARF1* y *PpARF/XYL* se encontró en otros órganos florales y raíces. Llamativamente, la expresión de los genes analizados demuestra estar presente, no de forma específica en los frutos de *Prunus persica*, sino también en otros tejidos de la planta.



**Figura. 12:** Acumulación de transcritos *PpARF1* y *PpARF/XYL* en diferentes tejidos vegetativos y reproductivos de duraznero. Pe: pétalos, Se: sépalos, Es: estambres, Ca: carpelos, Ho: hojas intactas expandidas, Ra: raíces incipientes. La expresión del gen de actina se utilizó como control interno.

## CAPÍTULO 5

---

### RESULTADOS

#### Clonación del gen *PsARF/XYL* de *Prunus salicina* Lindl. 'Gigaglia' y de dos variantes de ADNc

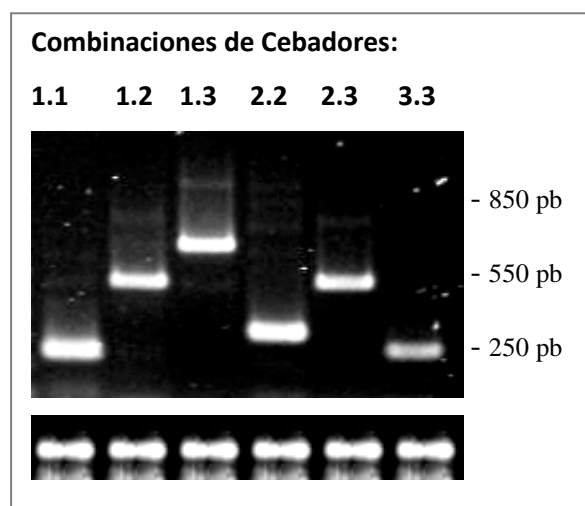
##### 5.1 Reacciones de RT-PCR para la clonación de ADNc *PsARF/XYL*

Con el objetivo de describir el patrón de transcripción de un gen homólogo a *PpARF/XYL* en ciruela japonesa, se ideó la clonación de un ADNc putativo. Para clonar ADNc de *Prunus salicina* Lindl. 'Gigaglia' homólogo a *PpARF/XYL*, se realizaron alineamientos de las secuencias de nucléotidos correspondientes a tal gen y a *PpARF2* - gen homólogo putativo de *Pyrus pyrifolia* (Tateishi *et al.*, 2005)- con el cual comparte una alta identidad de secuencia, mediante uso del programa ClustalW. A partir de los alineamientos obtenidos se diseñaron cebadores en regiones de aminoácidos conservadas para amplificar por RT-PCR fragmentos de ADNc de mesocarpo de ciruela japonesa. Los cebadores utilizados se indican en la **Fig. 5.1** (otros cebadores fueron diseñados en la porción 5' del gen pero no se lograron obtener los productos de RT-PCR esperados). La técnica de RT-PCR fue efectiva para todas las combinaciones de cebadores detectándose bandas únicas en todos los casos. Sin embargo, al emplear los cebadores 1-2, 1-3, 2-2, 2-3 se observó un excedente de ~100 pb y no así para los cebadores 1-1, 3-3 que permitieron obtener fragmentos de RT-PCR del tamaño esperado (**Fig. 5.2**). Parecía que la región acotada por los cebadores F2-R2 contenía una inserción de aproximadamente 100 pb.



Combinación de cebadores	Tamaño del producto de RT-PCR esperado (en base a <i>PpARF2</i> )
F1-R1	247 pb
F1-R2	439 pb
F1-R3	686 pb
F2-R2	208 pb
F2-R3	455 pb
F3-R3	266 pb

**Figura. 5.1 :** Cebadores utilizados para la clonación parcial de ADNc *PpARF/XYL* de ciruela japonesa.



**Figura. 5.2:** Productos de RT-PCR obtenidos a partir de mesocarpo de ciruela japonesa al utilizar los cebadores de la **Fig. 5.1**. Para las combinaciones de cebadores 1.1 y 3.3 la banda corresponde al PM esperado. Para el resto, se observa un excedente de 100 pb aproximadamente.

## 5.2 Secuenciación y análisis de los fragmentos de RT-PCR

Para analizar los resultados obtenidos por RT-PCR, la banda de interés fue purificada del gel de agarosa (combinación de cebadores F1-R3), clonada en vector pGEM-T Easy y secuenciada. Se obtuvo un fragmento de aproximadamente 780 pb ('AXCir') que se alineó con la secuencia de durazno *PpARF/XYL* (Hayama *et al.*, 2006), observándose una



inserción dentro de la región codificante de 116 pb (**Fig. 5.3**). Esta inserción tenía un tamaño coincidente con la longitud media de los intrones en plantas y también un contenido importantes de bases A y T como típicamente se encuentra en intrones vegetales. Bajo la hipótesis de que la inserción podría corresponder a un intrón dentro de la región codificante, se ingresó la secuencia 'AXCir' en el programa *Netgene2* (Hebsgaard *et al.*, 1996) que permite predecir sitios dadores y aceptores de splicing. El programa predijo sitios de splicing que coincidían con el comienzo y fin de la inserción (**Fig. 5.4**).

La presencia de un intrón en los fragmentos de RT-PCR podía deberse a la presencia de contaminaciones con ADN genómico en el molde de PCR o bien podía formularse la hipótesis de la existencia de dos variantes de transcritos alternativamente spliceados a partir del gen *PsARF/XYL* de ciruela japonesa.

Se hipotetizó que, de ocurrir la retención de un intrón como mecanismo de SA sobre el gen *PsARF/Xyl*, sería factible hallar una variante de ADNc sin intrón, proveniente de transcritos totalmente spliceados. Para tal fin, se realizaron reacciones de RT-PCR en condiciones poco restrictivas con distintas muestras de ADNc de ciruelo japonés y cebadores que abarcan la zona del intrón (F2-R3) obteniéndose dos bandas (**Figura. 5.5**). La banda de tamaño esperado se denominó 'variante normal ('Vn') y la banda superior 'variante que retiene intrón ('Vri').

```

`AXCIR'      GGTGCACAGATGTTTCATTGCAATGGAAACCAGCTATTTGGTGCTGCTGAGGCCGCAGCAA
PpARF/XYL   GGTGCACAGATGTTTCATTGCAACGGAAACCAACTATTTGGTGCTGCTGAGGCCGCAGCAA
*****

`AXCIR'      GACAGGCTGATGCAACTGTCTTGGTAATGGGCCTTGACCAATCCATTGAAGCCGAATTCG
PpARF/XYL   GACAGGCTGATGCAACTGTCTTGGTAATGGGCCTTGACCAATCCATTGAAGCCGAATTCG
*****

`AXCIR'      TAGACCGAGTCGGTCTCCTTTTGCCCGGCACCAGCAAGAGCTAGTATCCAGAGTGGCCA
PpARF/XYL   TAGACCGAGTCGGTCTCCTTTTGCCCGGCACCAGCAAGAGCTAGTATCCAGAGTGGCCA
*****

`AXCIR'      GGGCCTCTAGAGGCCCAACCATCTTGGTCTTGATGTCTGGTGGCCCAATTGATGTCACAT
PpARF/XYL   GGGCCTCTAGAGGCCCAACCATCTTGGTCTTGATGTCTGGTGGCCCAATTGATGTCACAT
*****

`AXCIR'      TCGCAAAGAACGATCCACGCATTAGCGCTATTATTTGGGTTGGGTACCCTGGCCAAGCCG
PpARF/XYL   TCGCAAAGAACGATCCACGCATTAGCGCTATTATTTGGGTTGGGTACCCTGGCCAAGCCG
*****

`AXCIR'      GAGGAAGTCCATAGCTGATGTTCTATGCGGTACCACAAACCAGGTAATAAAGGCAGTA
PpARF/XYL   GAGGAAGTCCATAGCCGATGTTCTATTTGGGACCACAAACCAG
*****

`AXCIR'      CAACAAACTCTTGTTCAATATTTTTATCTTTGTCAACAAAGTGAAAACATAATGTCGTCC
PpARF/XYL

`AXCIR'      GACTAAATAGTCATGGACTAATTATTATATGTTTGTACAGGAGGAAAGCTTCCCATGAC
PpARF/XYL   GAGGAAAGCTTCCCATGAC
*****

`AXCIR'      ATGGTACCCCCAAAATATGTAACCCATTTGCCAATGACAGATATGGCCATGAGGGCAGA
PpARF/XYL   ATGGTACCCCCAAAATATGTAACCCATTTGCCAATGACAGATATGGCCATGAGGGCAGA
*****

`AXCIR'      CCCAGCAAGAGGCTACCCTGGCAGGACCTACAGGTTCTACAGAGGCCAGTTGTCTTCCC
PpARF/XYL   CCCAGCAAGAGGCTACCCTGGCAGGACCTACAGGTTCTACAGAGGCCAGTTGTCTTCCC
*****

`AXCIR'      ATTTGGTCTGGGCTTAAGCTACACGACTTTTGCCCAATCTGACATGAGGCCACATC
PpARF/XYL   ATTTGGTCTGGGCTTAAGCTACACGACTTTTGCCCAATCTGACATGAGGCCACATT
*****

`AXCIR'      GGTCTCTGTGCCTCTCACCAGCCTAAAAGCCACCGCAAACCTGACCATGCTGAGCAAAGC
PpARF/XYL   GGTCTCCGTGCCTCTCACCAGCCTAAAAGCCACCGCAAACCTCAACCATGCTGAGCAAAGC
*****

`AXCIR'      TGTGAGAGTGAGCCACGCGGACTGCAATGCACTCTCCCCCTGGACGTACACGTGGATGT
PpARF/XYL   TGTGAGAGTGAGCCACGCGGACTGTAATGCACTCTCCCCCTGGACGTACACGTGGATGT
*****

`AXCIR'      TAAAAACACTGGGATCCATGG
PpAX/XYL    TAAAAACACTGGG-TCCATGG
*****

```

**Figura. 5.3:** Alineamiento múltiple de secuencias utilizando el programa ClustalW. Se muestran la secuencia obtenida ('AXCir') en reacciones de RT-PCR de mesocarpo de ciruela japonesa con cebadores F1-R3 y la secuencia *PpARF/XYL* publicada por Hayama *et al.* (2006, no. acceso AB264280). En la secuencia 'AXCir' se observa una inserción de 116 pb. En color se muestra el contenido A+T de la inserción.

<b>Donor splice sites, direct strand</b>				
<b>pos 5'-&gt;3'</b>	<b>phase</b>	<b>strand</b>	<b>confidence</b>	<b>5' exon intron 3'</b>
346	1	+	1.00	<u>ACAAACCCAG</u> <sup>A</sup> <u>GTAATAAAGG</u>
<b>Acceptor splice sites, direct strand</b>				
<b>pos 5'-&gt;3'</b>	<b>phase</b>	<b>strand</b>	<b>confidence</b>	<b>5' intron exon 3'</b>
461	1	+	0.96	<u>TTTTGTACAG</u> <sup>A</sup> <u>GAGGAAAGCT</u>
<b>Branch points, direct strand</b>				
<b>pos 5'-&gt;3'</b>	<b>strand</b>	<b>score</b>		<b>5' [A]</b>
425	+	-2.04		<b>CGTCCGACTAAATAGTCATG</b>

```

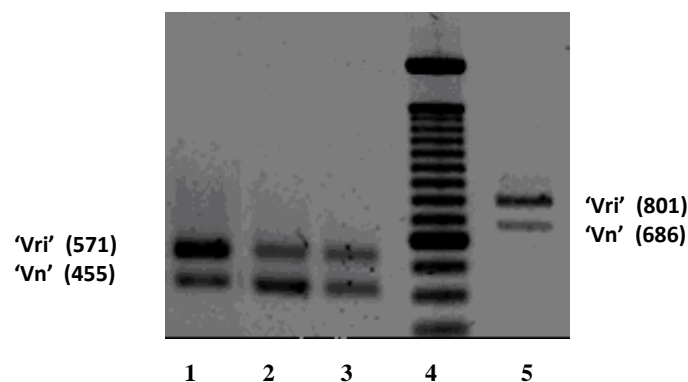
'AXCIR'   GAGGAACTGCCATAGCTGATGTTCTATGCGGTACCACAAACCCAGGTAATAAAGGCAGTA
PpARF/XYL GAGGAACTGCCATAGCCGATGTTCTATTTGGGACCACAAACCCAG-----

'AXCIR'   CAACAACTCTTGTTTCATATATTTTTATCTTTGTCAACAAAGTGAAAATAATGTCGTCGG
PpARF/XYL -----

'AXCIR'   ACTAAATAGTCATGGACTAATTATTATATGTTTTGTACAGGAGGAAAGCTTCCCATGAC -
PpARF/XYL -----GAGGAAAGCTTCCCATGAC -

```

**Figura. 5.4:** Sitios de splicing predichos para la secuencia 'AXCIR' mediante uso del programa *Netgene2*. Los sitios dador y aceptor de splicing coinciden con el comienzo y fin de la inserción hallada al alinear 'AXCIR' con *PpARF/XYL*.



**Figura. 5.5:** RT-PCR a partir de ARNm de distintos tejidos de ciruelo japonés. Se utilizaron cebadores F2-R3 en las calles 1, 2 y 3 para distintos tejidos. Los cebadores F1-R3 se utilizaron en la calle 5 para obtener fragmentos de mayor tamaño que se clonaron y secuenciaron. Calle 1: mesocarpo, Calle 2: sépalos, Calle 3: hojas, Calle 4: marcadores de PM, calle 5: mesocarpo. El fragmento 'Vri' corresponde a la variante con intrón, el fragmento 'Vn' corresponde al tamaño esperado según el ADNc del gen *PpARF/XYL* de duraznero. El ARNm fue previamente tratado con DNasa I.

Los resultados obtenidos hasta entonces indicaban la posibilidad de que estas dos bandas, en las reacciones de RT-PCR, resultaran de la presencia de dos variantes de ARN mensajero para el gen *PsARF/XYL*. Cuando las bandas mostradas en la **Fig. 5.5** (calle 5) se clonaron y secuenciaron, se obtuvo a partir de los alineamientos de secuencia, que la banda 'Vn' correspondía a la secuencia 'Vri' exceptuando la zona del intrón (**Fig. 5.6**).

```

GGTGACAGATGTTTCATTGCAATGGAAACCAGCTATTTGGTGTCTGAGGCCGAGCAA 60
GGTGACAGATGTTTCATTGCAATGGAAACCAGCTATTTGGTGTCTGAGGCCGAGCAA 60
*****

GACAGGCTGATGCAACTGTCTTGGTAATGGGCCTTGACCAATCCATTGAAGCCGAATTTC 120
GACAGGCTGATGCAACTGTCTTGGTAATGGGCCTTGACCAATCCATTGAAGCCGAATTTC 120
*****

TAGACCGAGTCGGTCTCCTTTTGCCCGGCACCAGGAAGAGCTAGTATCCAGAGTGGCCA 180
TAGACCGAGTCGGTCTCCTTTTGCCCGGCACCAGGAAGAGCTAGTATCCAGAGTGGCCA 180
*****

GGGCCTCTAGAGGCCCAACTATCTTGGTCTTGATGTCTGGTGGCCCAATTGATGTCACGT 240
GGGCCTCTAGAGGCCCAACTATCTTGGTCTTGATGTCTGGTGGCCCAATTGATGTCACGT 240
*****

TCGCAAAGAACGATCCACGCATTAGCGCTATTTATTTGGGTTGGGTACCCTGGCCAAGCGG 300
TCGCAAAGAACGATCCACGCATTAGCGCTATTTATTTGGGTTGGGTACCCTGGCCAAGCGG 300
*****

GAGGAACTGCCATAGCTGATGTTCTATTTCGGTACCACAAACCAG----- 346
GAGGAACTGCCATAGCTGATGTTCTATTTCGGTACCACAAACCAGGTAATAAAGGCAGTA 360
*****

-----
CAACAAACTCTTGTTTCATATAATTTTATCTTTGTCAACAAAGTAAAACTAATGTCGTCC 420

-----GAGGAAAGATTCCCATGAC 364
GACTAAATAGTCATGGACTAATTAATTATATGTTTGTACAGGAGGAAAGATTCCCATGAC 480
*****

ATGGTACCCCCAAAACATATGTAACCCATTTGCCAATGACAGATATGGCCATGAGGGCAGA 424
ATGGTACCCCCAAAACATATGTAACCCATTTGCCAATGACAGATATGGCCATGAGGGCAGA 540
*****

CCCAGCAAGAGGCTACCCTGGCAGGACCTACAGGTTCTACAGAGGCCAGTTGTCTTCCC 484
CCCAGCAAGAGGCTACCCTGGCAGGACCTACAGGTTCTACAGAGGCCAGTTGTCTTCCC 600
*****

ATTTGGTCTGGGCTTAAGCTACACAACCTTTGCCACAATCTTGCACATGGGCCACATC 544
ATTTGGTCTGGGCTTAAGCTACACAACCTTTGCCACAATCTTGCACATGGGCCACATC 660
*****

GGTCTCTGTGCCTCTCACCAGCCTAAAAGCCACCGCAAACCTCGACCATGCTGAGCAAAGC 604
GGTCTCTGTGCCTCTCACCAGCCTAAAAGCCACCGCAAACCTCGACCATGCTGAGCAAAGC 720
*****

TGTGAGAGTGAGCCACGCGGACTGCAATGCACTCTCCCCCTGGACGTACACGTGGATGT 664
TGTGAGAGTGAGCCACGCGGACTGCAATGCACTCTCCCCCTGGACGTACACGTGGATGT 780
*****

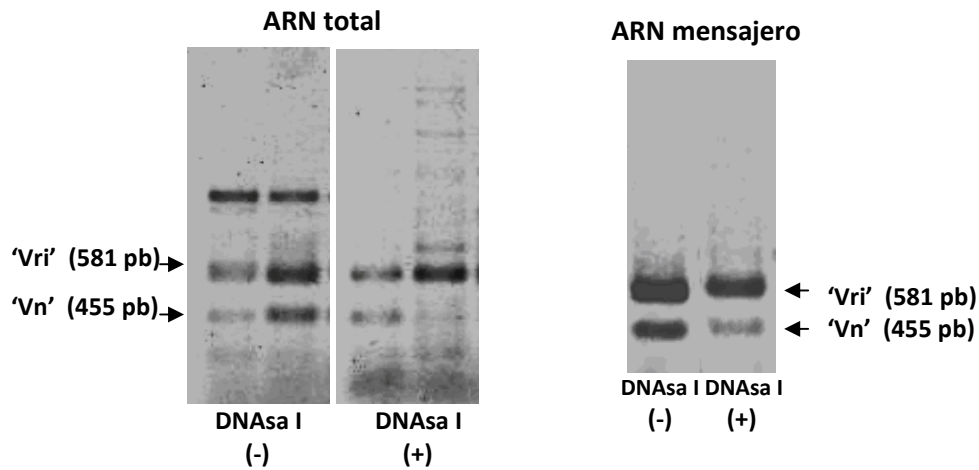
TAAAAACACTGGGTCCATGGA 685
TAAAAACACTGGGTCCATGGG 802
*****

```

**Figura. 5.6:**  
Alineamiento múltiple de secuencias utilizando el programa ClustalW. Se muestran las secuencias 'Vn' (superior) y 'Vri' (inferior) obtenidas en reacciones de RT-PCR de mesocarpo de ciruela japonesa con cebadores F1-R3. La secuencia 'Vn' es idéntica a 'Vri' exceptuando la zona de la inserción de 116 pb que se muestra en color.

## 5.4 Tratamientos con DNasa I

Aunque la posibilidad de contaminación con ADN genómico es factible para la mayoría de las técnicas que extraen ARN total, se esperaba obtener una cantidad mínima de contaminación en estas muestras dado el método utilizado durante el desarrollo de este trabajo (uniones específicas de bolitas magnéticas de biotina-oligodT a la cola poliadenílica del ARN mensajero y múltiples pasos de lavado). De todas formas, y dada la sensibilidad de la técnica de RT-PCR, se analizó la posibilidad de contaminaciones con ADN genómico mediante dos métodos de extracción de ARN. Por un lado, se extrajo ARN total mediante un método convencional, que utiliza fenol a 80 ° (Verwoerd *at al.*, 1989) y por el otro, las extracciones de ARNm con bolitas magnéticas de biotina-estreptavidina, como fue descrito en la sección 'Materiales y métodos'. Luego de ambas extracciones, se trató el ARN con DNasa I (ver 'materiales y métodos') y se procedió como hasta entonces en la fabricación de ADNc y PCR. Al utilizar muestras de ARN total (**Fig. 5.7**), aparecieron las dos bandas inferiores correspondientes a 'Vn' y 'Vri' que persistieron luego del tratamiento con DNasa I y una banda superior (esta última fue clonada y secuenciada y se determinó como un producto inespecífico de los cebadores F2-R3) posiblemente un producto de la contaminación con ADN genómico (ya que esta banda desaparece luego del agregado de DNasa I). Este hecho puntual denota cierto 'control positivo' de la acción de DNasa I (se realizaron otros controles positivos de la acción de DNasa I sobre ADN plasmídico y ADN genómico, no mostrados). Al tratar las muestras de ARN mensajero de igual forma, solo aparecieron las dos bandas inferiores correspondientes a 'Vn' y 'Vri' que persistieron luego del tratamiento con DNasa I como se esperaba. Se observó que las extracciones de ARNm utilizadas en el transcurso de la tesis permitieron obtener resultados más específicos (bandas únicas) y libre de contaminaciones con ADN genómico.



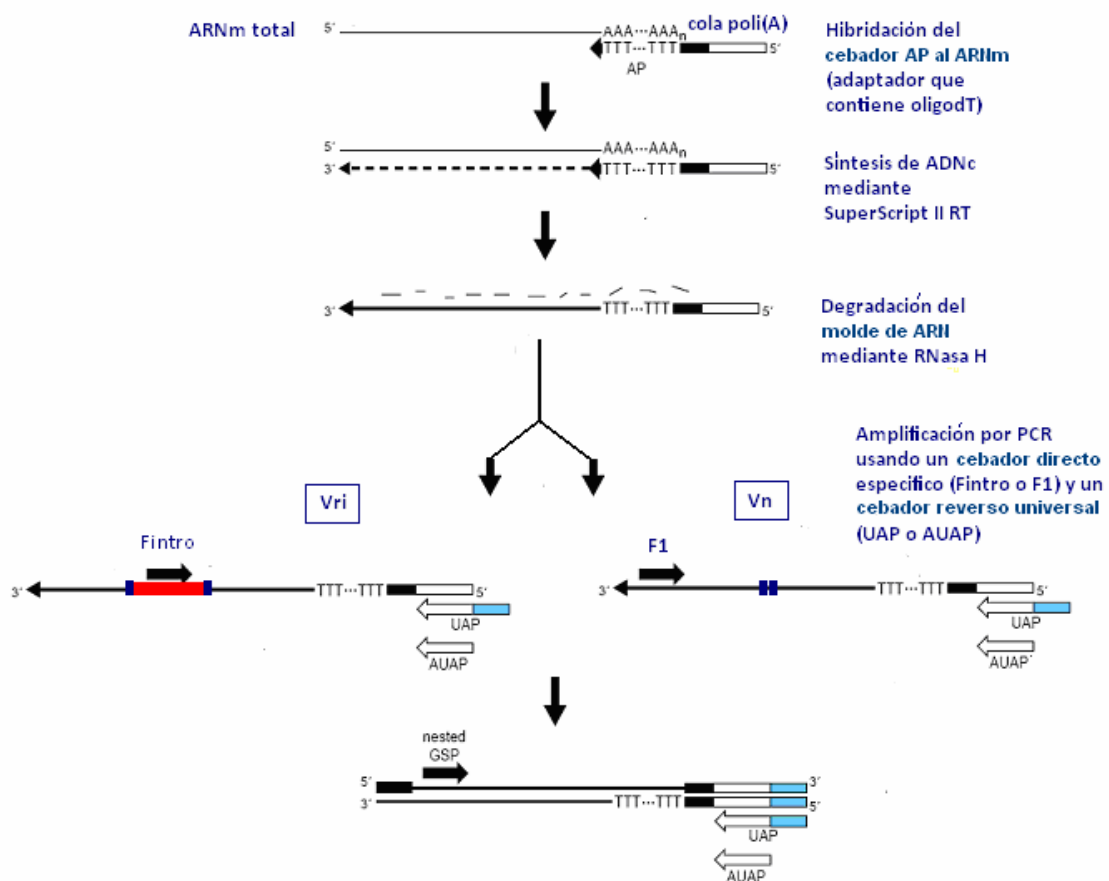
**Figura. 5.7:** RT-PCR para el gen *psARF-XYL* con cebadores F2-R3 en mesocarpo de ciruelas pre-climatéricas. Se utilizó ARN total tratado y sin tratar con DNAsa I o ARN mensajero tratado y sin tratar con DNAsa I. En el primer caso se realizó un duplicado. Las condiciones de termociclado fueron idénticas en todos los casos. Ambas bandas persisten luego del tratamiento con DNAsa I y la técnica de extracción de ARNm utilizada en esta tesis resulta óptima para la especificidad de los productos de PCR y la pureza del molde (libre de ADN genómico).

Aunque hasta el momento se han presentado algunas evidencias bioinformáticas de que la inserción de 116 pb hallada en ADNc 'Vri' correspondería a un intrón, para poder asegurarlo, es necesario contar con la secuencia completa de ADN genómico *PsARF/XYL*. Para tal fin, como primera instancia, se buscaron las secuencias completas de ADNc para las variantes 'Vn' y 'Vri' de *PsARF/XYL*.

### 5.5 RACE 3' para las dos variantes de ARNm 'Vn' y 'Vri'

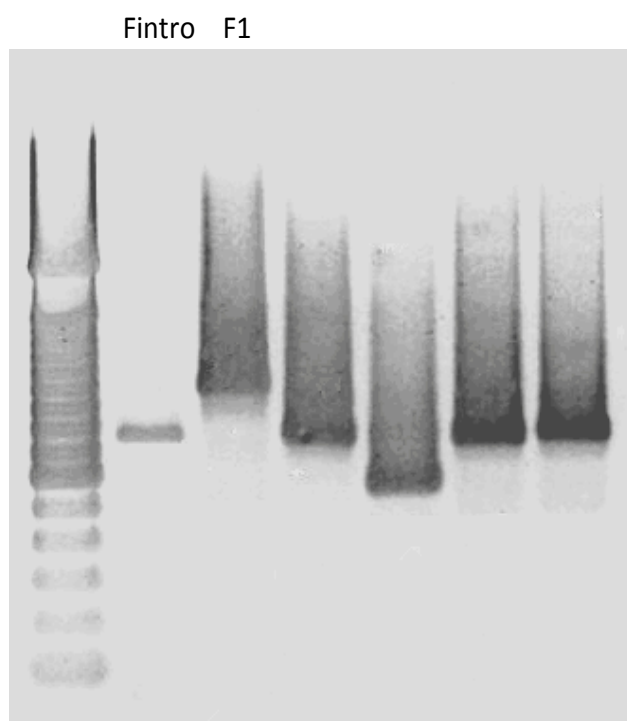
Conocer los extremos de ADNc 'Vn' y 'Vri', mediante el método de RACE 3', presentaba dos ventajas a destacar: por una lado, avanzar con la clonación completa de ADNc de *PsARF/XYL* lo que implicaba una ventaja para el diseño de cebadores específicos que permitieran clonar ADN genómico *PsARF/XYL* y por el otro, confirmar que los fragmentos de RT-PCR clonados y secuenciados correspondientes a 'Vn' y 'Vri',

proviene de dos transcritos spliceados alternativamente y no de contaminaciones con ADN genómico. Esto es posible porque el fundamento de la técnica RACE 3' es la utilización de un cebador reverso oligo dT, complementario a la cola poli(A) presente en todos los ARN mensajeros, que se utiliza como cebador en la síntesis de ADNc. De esta forma, al utilizar un cebador directo complementario al intrón retenido en la variante 'Vri' y otro cebador directo complementario a la región codificante de la cual se disponía información (en dos reacciones RACE 3' separadas), fue posible determinar 2 productos de PCR que correspondían a la porción 3' del ADNc de las variantes 'Vn' y 'Vri'. En la **Fig. 5.8** se muestran esquemáticamente los pasos de la técnica de RACE 3' y la posición de los cebadores directos utilizados para amplificar una u otra variante de ADNc del gen *PsARF/XYL*.



**Figura. 5.8:** Esquema de los pasos en la metodología RACE 3' utilizada para clonar las porciones 3' terminales de ADNc 'Vn' y 'Vri' del gen *PsARF/XYL*.

Para la síntesis de ADNc RACE 3', se utilizó ARNm de mesocarpo de ciruelo tratado con etileno durante 24 h y diferentes combinaciones de cebadores. Los resultados de RACE 3' obtenidos se muestran en la **Fig. 5.9**. Con todos los cebadores directos usados complementarios a la región codificante se amplificó 'Vn' (el tamaño de todos los productos obtenidos coincide con pre-ARNm spliceado completamente) y en cantidades relativas mayores en todos los casos con respecto a 'Vri' (a igualdad de condiciones experimentales). La banda obtenida con el cebador complementario al intrón (Fintro), solo es posible amplificarla a partir de ARNm como molde lo que se opone a la idea de contaminaciones con ADN genómico en el ARN molde de RT-PCR.



**Figura. 5.9:** Resultados obtenidos en reacciones de RT-PCR mediante la técnica de RACE 3' utilizando ADNc de mesocarpo tratado con etileno. En la calle 2 se amplificó la variante de ADNc 'Vri' utilizando un cebador complementario al intrón retenido (Fintro). En las calles siguientes se amplificó 'Vn' mediante uso de distintos cebadores directos complementarios a la región codificante (entre ellos F1). Se secuenciaron los fragmentos obtenidos con los cebadores directos Fintro y F1 (calles 2 y 3).

Los productos de PCR obtenidos en las calles 2 y 3 del gel de la **Fig. 5.8** fueron purificados, clonados y secuenciados (secuencias Fintro-UAP y F1-UAP). Los resultados al analizar las secuencias mencionadas se muestran en la **Fig. 5.10**. Se pudo distinguir en estas secuencias, las regiones complementarias a los cebadores directos, las regiones codificantes comunes en ambas variantes río abajo de los mismos, la posición del codón de terminación, la región 3' no traducida del extremo (3' UTR) y la cola poli(A). Dada la identidad (100%) de cada una de las regiones mencionadas entre ambas variantes de ADNc (exceptuando el intrón), es muy probable que el ARNm que les dio origen



provenza de la transcripción de un único gen. Se desconoce el número de copias del gen *PsARF/XYL* en el genoma de *Prunus salicina*.

A)

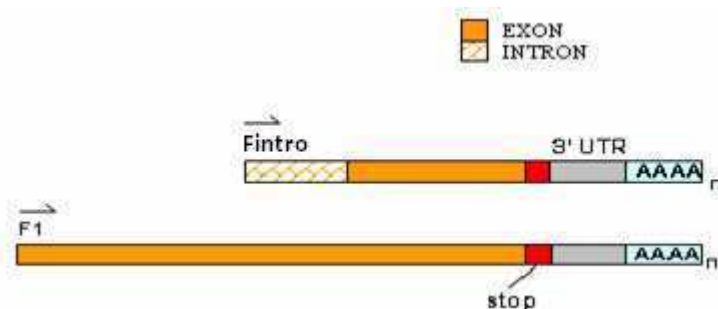
>Fintro- UAP

**ATAAAGGCAGTACAACAAACTCTTGTTTCATACTTTTATCTTTTTCAACAAAGTGAAAACCTAATGTCGTCCGACTAAATA**  
**GTCATGGACTAATTATTATATGTTTTGTACAG****GAGGAAAGCTTCCCATGACATGGTACCCCCAAAACCTATGTAACCCATT**  
**GCCAATGACAGATATGGCCATGAGGGCAGACCCAGCAAGAGGCTACCCTGGCAGGACCTACAGGTTCTACAGAGGCCCA**  
**GTTGCTTCCCATTTGGTCTGGGCTAAGCTACACGACTTTTGCCACAATCTTGACATGGGCCACATCGGTCTCTGTGC**  
**CTCTCACCAGCCTAAAAGCCACCGCAAACCTCGACCATGCTGAGCAAAGCTGTGAGAGTGAGCCACGCGGACTGCAATGC**  
**ACTCTCCCCCTGGACGTACACGTGGATGTTAAAAACACTGGGTCCATGGATGGGACCCACACTCTTCTGGTGTTCAAA**  
**GCCCACCAGATGGAAAATGGGCCGCCAGTAAGCAGCTGGTGGGTTTTCAACAAGATCCATATAGCAGCCGGGTCGGAGAC**  
**ACGGGTCAGAATTGCTGTTTCATGTGTGCAAGCACCTCAGCGTCGTGGACCGGTTTGGGATCCGAAGAATCCACTGGGTG**  
**AACACAAGCTTCAAATCGGTGACCTCAGCCATCACGTCTCCCTTCAAACCAATTCGGGAGAAATTAAGGTTTAGGGGCT**  
**ATCAAAAAAAAAAAAAA**

>F1 - UAP

**TATGGCAAACCTGTTTCTGTGTTATGGCCTTGACCAATCATTGAAGCCGAATTCGTAGACCGAGTCGGTCTCATTGCCG**  
**GCACCAGCAAGAGCTAGTATCCAGAGTGGCCAGGGCCTCTAGAGGCCAACCATCTTGGTCTTGATGTCTGGTGGCCAA**  
**TTGATATCACATTCGCAAGAACGATCCACGCATTAGCGCTATTATTTGGGTTGGGTACCCTGGCCAAGCCGGAGGAAC**  
**GCCATAGCTGATGTTCTATTTCGGTACCACAAACCCAG****GAGGAAAGCTTCCCATGACATGGTACCCCCAAAACCTATGTAAC**  
**CCATTTGCCAATGACAGATATGGCCATGAGGGCAGACCCAGCAAGAGGCTACCCTGGCAGGACCTACAGGTTCTACAGA**  
**GGCCCCAGTGTCTTCCCATTTGGTCTGGGCTAAGCTACACGACTTTTGCCACAATCTTGCACATGGGCCACATCGGT**  
**CTCTGTGCCTCTCACCAGCCTAAAAGCCACCGCAAACCTCGACCATGCTGAGCAAAGCTGTGAGAGTGAGCCACGCGGACT**  
**GCAATGCACTCTCCCCCTGGACGTACACGTGGATGTTAAAAACACTGGGTCCATGGATGGGACCCACACTCTTCTGGTG**  
**ITCACAAGCCACCAGATGGAAAATGGGCCGCCAGTAAGCAGCTGGTGGGTTTTCACAAGATCCATATAGCAGCCGGGTC**  
**GGAGACACGGGTCAGAATTGCTGTTTCATGTGTGCAAGCACCTCAGCGTTGTGGACCGGTTTGGGATCCGAAGAATCCAC**  
**TGGGTGAACACAAGCTTCAAATCGGTGACCTCAGCCATCACGTCTCCCTTCAAACCAATTCGGGAGAAATTAAGGTTTAG**  
**GGGCTATCAAAAAAAAAAAAAA**

B)



**Figura. 5.10:** Secuencias de ADNc obtenidas mediante RACE 3' correspondientes a dos variantes transcritas del gen *PsARF/XYL*. A) Secuencias de nucleótidos correspondientes a 'Vri' (superior) y a 'Vn' (inferior). Para amplificar 'Vri' se utilizó el cebador directo Fintro, complementario al intrón retenido, y para amplificar 'Vn' el cebador directo F1 complementario a una región codificante; ambos en combinación con el cebador reverso UAP, específico de ADNc. Se indican en recuadro las secuencias comunes, en negrita los cebadores y en fondo gris la secuencia del intrón retenido. B) Representación esquemática de las dos secuencias de ADNc, se indican las regiones correspondientes a exones, intron, codón de terminación, región 3' no traducida (3' UTR) y la cola poli(A).

## 5.6 RACE 5' y obtención de las secuencias completas de ADNc

Para obtener las secuencias completas de los ADNc *PsARF/XYL* y faltando conocer la región 5' de las mismas, se empleó la técnica de RACE 5' (Amplificación rápida de extremos de ADNc 5'). Para ello, se diseñaron tres cebadores reversos anidados (el primero río abajo del segundo, y este último río abajo del tercero, teniendo en cuenta el orden en el que fueron utilizados) a partir de la información de secuencia de nucleótidos obtenida previamente mediante la clonación de los productos de RT-PCR. La ubicación de los cebadores, sus secuencias y los productos de RACE 5' esperados se describieron en la sección 5.19.1 de 'Materiales y métodos'. Luego de obtener los productos de PCR de un tamaño esperado probable (dado que no se pueden predecir la longitud de los extremos 5' UTR), los mismos fueron purificados del gel de agarosa, clonados y secuenciados. Así, se obtuvo una secuencia de aproximadamente 600 pb que fue alineada con otras homólogas putativas de pera japonesa y manzana (según establecieron los análisis de BLAST). En los resultados se observaron las diferentes longitudes de las secuencias 5' UTR y cómo, en la región codificante, las secuencias se alinean correctamente y con un alto grado de homología entre ellas (**Fig. 5.11**).

Finalmente, y a partir de todas las secuencias parciales obtenidas hasta el momento (RACE 5', fragmentos de RT-PCR y RACE 3'), se obtuvo el clon completo de ADNc *PsARF/XYL* (**Fig. 5.12**). Se indica el ADNc correspondiente a un pre-ARNm completamente splicado y la proteína *PsARF/XYL* predicha.

El programa TargetP 1.1 predijo que la proteína *PsARF/Xyl* sería exportada hacia el apoplasto, como era de esperar dado que está involucrada en la modificación de la pared celular. El péptido señal sería clivado entre las posiciones 28 y 29 en los residuos A y R respectivamente. El análisis de BLAST/NCBI mostró dos dominios proteicos conservados, el primero NH<sub>2</sub>-terminal sería el dominio de unión a hidrato de carbono y el COOH-terminal el dominio catalítico.

```

PpARF2                                     GGGAGAAAATA 14
JPRXYL                                     AAATATCAAGAAAAAGGGAGAAAATA 31
MdAfase                                   ACAACAAATACAAACTCAAATATCAAGAAAAAGGGAGAAACAATA 49
PsARF/XYL                               AAACACAAAACCCAATAGAGCAAAACAAAAGAAAAGAACAAAAAA 56

PpARF2   CACAATATTCAGTTTTTTAAAATATGGCATACAATATTGCCAACT---CTCACTTCTT 69
JPRXYL   CACAATATTCAGTTTTTTAAAATATGGCATACAATATTGCCAACT---CTCACTTCTT 86
MdAfase   CAATATTCAGTTTTTTAAAATATGGCATACAATATTGCCAACT---CTCACTTCTT 106
PsARF/XYL CTCCCCACATTATTCATTTAATATGGCATACAATATTACTAAGCTTCTCTCACTTGT 109
                ***** * * * * *****

PpARF2   TCTCTTCTGTTCTTATTTTCTTCCCTCTGCAGCATGGCAGTTGTGCATGCTCGTCCACCC 129
JPRXYL   TCTCTTCTGTTCTTATTTTCTTCCCTCTGCAGCATGGCAGTTGTGCATGCTCGTCCACCC 146
MdAfase   TCTCTTCTGTTCTTATTTTCTTCCCTCTGCAGCATGGCAGTTGTGCATGCTCGTCCACCC 166
PsARF/XYL TCTCTTC--TTCTGAGTCT-TTCTTTTGCACCATGGAGTTGTCCATGCTCGTCCACCC 166
                ***** * * * * *****

PpARF2   TTCGCCTGCGACCCTCGAAACCCGATAAACCAGAACGTTGAAGTTCTGCAGGGTGAGGGTG 189
JPRXYL   TTCGCCTGCGACCCTCGAAACCCGATAAACCAGAACGTTGAAGTTCTGCAGGGTGAGGGTG 206
MdAfase   TTCGCCTGCGACCCTCGAAACCCGATAAACCAGAACGTTGAAGTTCTGCAGGGTGAGGGTG 226
PsARF/XYL TTTGCTTGTGACCCTCACAAACCAATAACCAGAGGCTGAAGTTCTGCAGGGTGACGGTG 226
                ** * * * * ***** * * * * *****

PpARF2   CCAATCCACGTTAGGGTTCAGGACTTGATCGGACGGCTGACATTGCAGGAGAAGATCGGG 249
JPRXYL   CCAATCCACGTTAGGGTTCAGGACTTGATCGGACGGCTGACATTGCAGGAGAAGATCGGG 266
MdAfase   CCAATCCACGTTAGGGTTCAGGACTTGATCGGACGGCTGACATTGCAGGAGAAGATCGGG 286
PsARF/XYL CCAATCCATGTTAGGGTTCAGGACTTGATCGGACGGCTGACATTGCAGGAGAAGATCAGG 286
                ***** * * * * *****

PpARF2   CTGTTGGTGAACAATGCCATTGCTGTGCCTAGGCTTGGCATTACAGGGTACGAGTGGTGG 309
JPRXYL   CTGTTGGTGAACAATGCCATTGCTGTGCCTAGGCTTGGCATTACAGGGTACGAGTGGTGG 326
MdAfase   CTGTTGGTGAACAATGCCATTGCTGTGCCTAGGCTTGGCATTACAGGGTACGAGTGGTGG 346
PsARF/XYL CTGCTGGTGAACAATGCTATTGCTGTGCCAGGCTTGGCATTACAGGGTACGAGTGGTGG 346
                *** ***** * * * * *****

```

**Figura. 5.11:** Alineamiento de secuencias parciales homólogas a *PsARF/XYL* en la región clonada y secuenciada a partir de la técnica de RACE 5'. Se muestran alineadas a partir del codón de iniciación y río arriba las regiones 5' UTR en cursiva y negrita. *PpARF2* (pera, GenBank, AB195230.1), *JPRXYL* (pera, GenBank, AB007121.1), *MdAfase* (manzana, GenBank, GU937612.1).

**aacacacaaaacccaatagagcaaaacaaaagaaaaagaacaaaaaactccccacatta**  
**ttccattttaaata**atggataacaataattactaagcttctctcacttggttctctctctctctg  
M A Y N I T K L L S L V S L L L  
agtcttctctctctccattggagttgtccatgctcgtccacccttggcttggaccct  
S L S F C T I G V V H A R P P F A C D P  
cacaacccaataaacagaggcctgaagtctgcaggggtgacgggtgccaatccatgtagg  
H N P I T R G L K F C R V T V P I H V R  
gttcaggacttgatcggacggttgacattgcaggagaagatcaggctgctggtgaacaat  
V Q D L I G R L T L Q E K I R L L V N  
gctattgctgtgccaggcctggcattcagggtcagagtggtggtctgaggcacttcat  
**A I A V P R L G I Q G Y E W W S E A L H**  
ggtgtatccaatgtggccctggaaccaagtttggtggggcctccctggggccaccagc  
G V S N V G P G T K F G G A F P G A T S  
ttccctcaagtcatcaccaccgctgcttccctcaacgagctctctggcaggaaatcgga  
**F P Q V I T T A A S F** E S L W Q E I G  
cgggtggtgctgatgaggcaaggcaatgtacaatggagggtggtggctggctgacatat  
R V V P D E A R A M Y N G G M A G L T Y  
tggagcccaaatgtgaacatatttctgacccaagatggggcagaggccaagagactcct  
W S P N V N I F R D P R W G R G Q E T P  
ggtgaagaccctgcttggcttctaagtacgctgctaggtatgtcaaggggctccaaggc  
G E D P V L A S K Y A A R Y V K G L Q G  
gatggagctggcaataggttaagttgctgacgtgcaaacattacactgcctatgat  
D G A C N R L K V A A C C K H Y T A Y D  
ctcgaacaactggaatggtgtcaatcgctccatttcaatgccaggggttagcaagcaggac  
L D N W N G V N R F H F N A R V S K Q D  
ttggcagacacatataatgtgccttcaaaagcctggtggtggaaggacatggtgctagt  
L A D T Y N V P F K A C V V E G H V A S  
ggtatgctctcaaccagggtgaatgggaagcctacttgtgctgaccctgatctcctc  
V M C S Y N Q V N G K P T C A D P D L L  
aagggcacaatccgtggccagtgagacttaatgggtatattgtctcggactgtgatca  
K G T I R G Q W R L N G Y I V S D C D S  
gttggtgtctatagaagcaacattacaccaggacaccagaagaagcagccgctgac  
V G V L Y E E Q H Y T R T P E E A A A D  
gcaattaaagcaggttggacttggacttggggccttccctcgcaatccactactgaggcg  
**A I K A G L D L D** C G P F L A I H T E A  
gccgtaagaaggggactcgttaagccagcttgaatgaatgggcttagcaaacacgatg  
A V R R R G L V S Q L E I N W A L A N T M  
acggtcagatgaggttgggtatgttcgacggcgaaccgtcggccccaatacggaaac  
T V Q M R L G M F D G E P S A H Q Y G N  
ctaggcccaagagacgtgtgcaccccggtcaccacacagctagccctgaaagctgtagg  
L G P R D V C T P A H Q Q L A L E A A R  
caagcattgtctactggagaaccgtggcgcttcaactctctcaatcaggcgccat  
Q G I V L L E N R G R S L P L S I R R H  
aggacagtgcagtaattggggcccaattctgatttactgtcaacaatgattggaattac  
R T V A V I G P N S D V T V T M I G N Y  
gctggtgtgcatgtggttacactacaccctacaaggaattggggaggtacacaaggacc  
A G V A C G Y T T P L Q G I G R Y T R T  
atacacaagctgggtgcacagatgttcattgcaatggaaccagctatttgggtgctgct  
I H Q A G C T D V H C N G N Q L F G A A  
gaggccgcagcaagacaggtgatgcaactgtcttggtaattgggcttgaccaatccatt  
E A A A R Q A D A T V L V M G L D Q S I  
gaagccgaattcgttagaccgagctcgtctccttggccgggaccagcaagagctagta  
E A E F V D R V G L L L P G H Q Q E L V  
tcagagtgccagggcctctagaggcccaacctctggctctgatgctggtggccca  
S R V A R A S R G P T I L V L M S G G P  
attgatgtcagcttgcagaagaacgatccacgcattagcgtattatttgggttgggtac  
I D V T F A K N D P R I S A I I W V G Y  
cctggccaagggggaactgccatagctgatttctattcggtaccacaacccagga  
P G Q A G G T A I A D V L F G T T N P G  
ggaagcttccatgacatggtaaccccaaaactatgtaaccatttggcaatgacagat  
G K L P M T W Y P Q N Y V T H L P M T D  
atggccatgagggcagaccagcaagaggtaccctggcaggacctacaggttctacaga  
M A M R A D P A R G Y P G R T Y R F Y R  
ggccagttgtcttccatttggctcgggcttaagctacacgacttggcccaaatctt  
G P V V F P F G L G L S Y T T F A H N L  
gcacatgggcccacatcggctctctgtcctctcaccagcctaaaagccaccgcaaacctg  
A H G P T S V S V P L T S L K A T A **S**  
accatgctgagcaaaagctgtgagagtgagccacgggactgcaatgcaactctccccctg  
T M L S K A V R V S H A D C N A L S P L  
gacgtacacgtggatgtaaaaaactgggtccatggatgggaccacaactctctgggtg  
D V H V D V K N T G S M D G T H T L L V  
ttcacaagccaccagatggaaaatggggccagtaagcagctggtgggttttcacaag  
F T S P P D G K W A A S K Q L V G F H K  
atccatatagcagccgggtcggagacacgggtcagaattgctgttcatgtgtgcaagcac  
I H I A A G S E T R V R I A V H V C K H  
ctcagcttggtagccgggttgggatcogaagaattcactgggtgaaacacaagctcaa  
L S V V D R F G I R R I P L G E H K L Q  
atcgggtgacctcagccatcagctctccttcaaaacaaatcgggagaatgaggt**tag**  
I G D L S H H V S L Q T N S G E I K V  
gggctatc**aaaaaaaaaaaaaaaa**

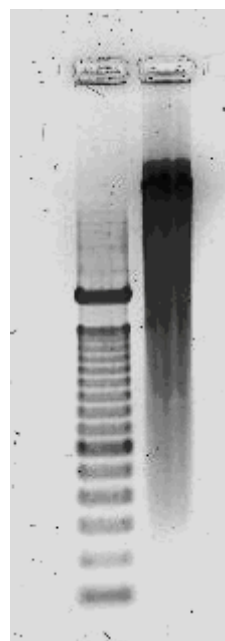
**Figura. 5.12:** Secuencia de nucleótidos de ADNc *PsARF/XYL* (variante normal) y la proteína deducida a partir de ella. Se muestra la región 5' UTR en **negrita cursiva** y subrayado el péptido señal de secreción predicho por el programa Target P 1.1. El análisis de BLAST/NCBI mostró dominios proteicos conservados (amino y carboxiterminal) que se muestrean coloreados en gris oscuro y en gris claro respectivamente. En recuadro se indican los codones de inicio y fin de la traducción. Por último se muestra en cursiva la región 3' UTR y la cola poli (A) en **negrita**. Los sitios de N-glicosilación probables se muestran en recuadros rojos.

## 5.7 Clonación del gen *PsARF/XYL* de *Prunus salicina* 'Gigaglia'

Con el objetivo de comparar la variante de cADN 'Vri' con el gen *PsARF/XYL* y analizar la presencia de un posible intrón, se procedió a la clonación del mismo. Hasta este punto, el supuesto intrón sólo era una estimación bioinformática a partir del análisis de la secuencia de ADNc 'Vri'.

Primero se pusieron a punto las extracciones de ADN genómico por distintos métodos, dado que algunos generaban ADN degradado o contaminado con ARN. Finalmente se seleccionó el método que une ADN específicamente a partículas magnéticas y luego de sucesivas separaciones y lavados, se obtiene ADN de buena calidad y suficiente pureza para ser utilizado para la técnica de PCR. La integridad del ADN obtenido, a partir de brotes jóvenes de 'Gigaglia', se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (Fig. 5.13).

A partir de reacciones de PCR sobre ADN genómico como molde y utilizando los mismos cebadores empleados en la clonación de ADNc, se obtuvo una secuencia parcial que cubre casi la totalidad del gen.



**Figura. 5.13:** ADN genómico de ciruela japonesa 'Gigaglia'. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% (0,5 µg de ADN) para analizar su integridad y la ausencia de contaminación con ARN

La secuencia de ADN genómico *PsARF/XYL* obtenida fue alineada con la secuencia de ADNc *PsARF/XYL* correspondiente a la variante 'Vn' -sin intrones- (Fig. 5.14) pudiéndose determinar, de esta forma, la presencia de 5 intrones en la porción clonada del gen. Se

pudo establecer que el último intrón (actualmente podemos denominarlo, intrón 5) corresponde a la inserción de 116 pb que previamente se había descrito en la variante de ADNc 'Vri' de *PsARF/XYL*.

## 5.7 Organización genómica de *PsARF/XYL* de *Prunus salicina* 'Gigaglia'

En la tabla de la **Fig. 5.15** se describe la composición en base A+T y la longitud de cada uno de los intrones y exones presentes en el gen. En la misma tabla, además, se indican las secuencias que corresponden a los sitios dadores y aceptores de splicing y se encuentran subrayados los nucleótidos que coinciden con las secuencias conservadas en dicotiledóneas (nucleótidos conservados en la unión del sitio 5': exón AG intrón GTAAGT; nucleótidos conservados en la unión del sitio 3': intrón TGYAG exón GT). El % A+T de los 5 intrones fue relativamente alto comprendiendo un rango de 61-79 % y un valor de 71 % para el intrón 5 que corresponde al intrón incluido en el ADNc 'Vri' de *PsARF/XYL*. La longitud de los intrones se halló en el intervalo 93-116 pb, siendo el intrón 5 el de mayor longitud. En las uniones de los sitios de splicing se hallaron nucleótidos que coinciden con las secuencias conocidas conservadas en dicotiledóneas. Dentro de estas secuencias consenso existen diferentes probabilidades de ocurrencia. Las probabilidades máximas de ocurrencia se cumplen en este caso para todos los intrones. El % A+T de los exones fue relativamente menor comprendiendo un rango de 47-55 %. La longitud de los exones resultó mayor y más variable que la de los intrones con un rango de 97 a 602 pb.

Los sitios aceptor y dador predichos por el programa *Netgene2* coinciden totalmente con lo obtenido a partir del alineamiento del gen con el ADNc (**Fig. 5.16**). Sin embargo, curiosamente, se observa que aparecen dos sitios aceptores de SAs para los intrones 1 y 2, aunque con menor probabilidad. La composición de nucleótidos de los intrones presentes en el gen *PsARF/XYL* resultó muy parecida en cada uno de ellos (**Fig. 5.17**).

**NCF →**

GENOMICO TTGGCTTCTAAGTACGCTGCTAGGTATGTCAAGGGCTCCAAGCGATGGAGCTGGCAAT 180  
ADNc `Vn` TTGGCTTCTAAGTACGCTGCTAGGTATGTCAAGGGCTCCAAGCGATGGAGCTGGCAAT 180  
\*\*\*\*\*

GENOMICO AGGCTTAAGGTTGCTGCATGCTGCAAACATTACACTGCCTATGATCTCGACAACCTGGAAT 240  
ADNc `Vn` AGGCTTAAGGTTGCTGCATGCTGCAAACATTACACTGCCTATGATCTCGACAACCTGGAAT 240  
\*\*\*\*\*

GENOMICO GGTGTCAATCGCTTCCATTTCAATGCCAGGGTAACATAATCTTTAGCTCCCTAGTCCGTC 300  
ADNc `Vn` GGTGTCAATCGCTTCCATTTCAATGCCAGG----- 272  
\*\*\*\*\*

GENOMICO TTGTCATATATTGGATATAGCATGTTATGTTGTCAGACTGTCAATCTTTAGGGTGATAA 360  
ADNc `Vn` -----

GENOMICO TTTTGCGTGTGACATGTGCAGGTTAGCAAGCAGGACTTGGCAGACACATATAATGTGCCT 420  
ADNc `Vn` -----GTTAGCAAGCAGGACTTGGCAGACACATATAATGTGCCT 309  
\*\*\*\*\*

GENOMICO TTCAAAGCCTGTGTGGTGAAGGACATGTGCTAGTGTATGTGCTCTACAACCAGGTG 480  
ADNc `Vn` TTCAAAGCCTGTGTGGTGAAGGACATGTGCTAGTGTATGTGCTCTACAACCAGGTG 369  
\*\*\*\*\*

**F22 →**

GENOMICO AATGGGAGCCTACTTGTGCTGACCCTGATCTCCTCAAGGCACAATCCGTGGCCAGTGG 540  
ADNc `Vn` AATGGAGCCTACTTGTGCTGACCCTGATCTCCTCAAGGCACAATCCGTGGCCAGTGG 429  
\*\*\*\*\*

GENOMICO AGACTTAATGGGTGAGTCTTTTTGATTATACAGCTAGGAATATTGGCCAAACACTTTTC 600  
ADNc `Vn` AGACTTAATGG----- 442  
\*\*\*\*\*

GENOMICO TCTTCGTTTTTTTAAGCCTTTCTAATTAACTTTTCGGGTCCAATAGGTATATTGTCTC 660  
ADNc `Vn` -----GTATATTGTCTC 452  
\*\*\*\*\*

GENOMICO GGACTGTGATTCAGTTGGTGTCTATATGAAGAGCAACATTACACCAGGACACCAGAAGA 720  
ADNc `Vn` GGACTGTGATTCAGTTGGTGTCTATATGAAGAGCAACATTACACCAGGACACCAGAAGA 512  
\*\*\*\*\*

GENOMICO AGCAGCCGCTGACGCAATTAAGCAGGTTATCAACATTTCAAGGAAACTTATTGTATGC 780  
ADNc `Vn` AGCAGCCGCTGACGCAATTAAGCAG----- 541  
\*\*\*\*\*

GENOMICO CCGGCTTATTTACTTGGCTATGAGTCTCACTGTTATATGGTTTTATTGTAAATGTCAGG 840  
ADNc `Vn` -----G  
\*  
**← NCR**

GENOMICO TTTGGACTTGGACTGTGGCCGTTCTCGCAATCCATACTGAGGCGGCCGTAAGAAGGGG 900  
ADNc `Vn` TTTGGACTTGGACTGTGGCCGTTCTC GCAATCCATACTGAGGCGGCCGTAAGAAGGGG 599  
\*\*\*\*\*

GENOMICO ACTCGTAAGCCAGCTTGAATAA TAACTGGGCCTTAGCAAACACGATGACGGTCCAGATGAG 960  
ADNc `Vn` ACTCGTAAGCCAGCTTGAATAA TAACTGGGCCTTAGCAAACACGATGACGGTCCAGATGAG 659  
\*\*\*\*\*

GENOMICO GTTGGGTATGTTTCGACGGCGAACCGTCGGCCACCAATACGGAAACCTAGGCCAAGAGA 1020  
ADNc `Vn` GTTGGGTATGTTTCGACGGCGAACCGTCGGCCACCAATACGGAAACCTAGGCCAAGAGA 719  
\*\*\*\*\*

GENOMICO CGTGTGCACCCCGGCTCACCAACAGCTAGCCCTTGAAGCTGCTAGGCAAGGCATTGTTCT 1080  
ADNc `Vn` CGTGTGCACCCCGGCTCACCAACAGCTAGCCCTTGAAGCTGCTAGGCAAGGCATTGTTCT 779  
\*\*\*\*\*

GENOMICO ACTGGAGAACCGTGGCGTTCACTTCTCTCTCAATCAGGCGCCATAGGACAGTAGCAGT 1140  
ADNc `Vn` ACTGGAGAACCGTGGCGTTCACTTCTCTCTCAATCAGGCGCCATAGGACAGTAGCAGT 839  
\*\*\*\*\*

GENOMICO AATTGGGCCAATCTGATGTTACTGTCAATGATTGGAAATTACGCTGTAAGTTAGT 1200  
ADNc `Vn` AATTGGGCCAATCTGATGTTACTGTCAATGATTGGAAATTACGCTG----- 891  
\*\*\*\*\*

GENOMICO AATTGCTTTTTTTTAAAGCTTAAATTTCTTTAACATTGATCTAAATTTTAAACCATT 1260  
ADNc `Vn` -----

GENOMICO GGATATTTTGTAAATGATGCAGGTGTTGCATGTGGTTACTACACCCTACAAGGAA 1320  
ADNc `Vn` -----GTGTTGCATGTGGTTACTACACCCTACAAGGAA 925  
\*\*\*\*\*

1

2

3

4

```

GENOMICO      TTGGGAGGTACACAAGGACCATACACCAAGCTGGGTGCACAGATGTTTCATGCAATGGAA 1380
ADNc `Vn`     TTGGGAGGTACACAAGGACCATACACCAAGCTGGGTGCACAGATGTTTCATGCAATGGAA 985
*****

GENOMICO      ACCAGCTATTTGGTGTCTGTGAGGCCGACAGACAGGCTGATGCAACTGTCTTGGTAA 1440
ADNc `Vn`     ACCAGCTATTTGGTGTCTGTGAGGCCGACAGACAGGCTGATGCAACTGTCTTGGTAA 1045
*****

GENOMICO      TGGGCCTTGACCAATCCATTGAAGCCGAATTCGTAGACCGAGTCGGTCTCCTTTTGCCCG 1500
ADNc `Vn`     TGGGCCTTGACCAATCCATTGAAGCCGAATTCGTAGACCGAGTCGGTCTCCTTTTGCCCG 1105
*****

GENOMICO      GGCACCAGCAAGAGCTAGTATCCAGAGTGGCCAGGCCCTCTAGAGGCCCAACCATCTTG 1560
ADNc `Vn`     GGCACCAGCAAGAGCTAGTATCCAGAGTGGCCAGGCCCTCTAGAGGCCCAACCATCTTG 1165
*****

GENOMICO      TCTTGATGTCCTGGTGGCCCAATTGATGTACGTTTCGCAAAGAACGATCCACGATTAGCG 1620
ADNc `Vn`     TCTTGATGTCCTGGTGGCCCAATTGATGTACGTTTCGCAAAGAACGATCCACGATTAGCG 1225
*****

GENOMICO      CTATTATTTGGGTTGGGTACCCCTGGCCAAGCGGGAGGAAGTCCATAGCTGATGTTCTAT 1680
ADNc `Vn`     CTATTATTTGGGTTGGGTACCCCTGGCCAAGCGGGAGGAAGTCCATAGCTGATGTTCTAT 1285
*****

GENOMICO      TCGGTACCACAAACCAGGTGATAAAGGCACTACAACAACTCTGTTCATATATTTTAA 1740
ADNc `Vn`     TCGGTACCACAAACCAG-----Fintro ->----- 1303
*****

GENOMICO      TCTTTTTCACAAGTGAAACTAATGTCGTCGACTAATAGTCATGGACTAATTATTA 1800
ADNc `Vn`     -----<- Rintro
*****

GENOMICO      TATGTTTTGTACAGGAGGAAAGCTTCCCATGACATGGTACCCCAAACATATGTAACCCA 1860
ADNc `Vn`     -----GAGGAAAGCTTCCCATGACATGGTACCCCAAACATATGTAACCCA 1349
*****

GENOMICO      TTTGCCAATGACAGATATGGCCATGAGGGCAGACCCAGCAAGAGGCTACCCCTGGCAGGAC 1920
ADNc `Vn`     TTTGCCAATGACAGATATGGCCATGAGGGCAGACCCAGCAAGAGGCTACCCCTGGCAGGAC 1409
*****

GENOMICO      CTACAGGTTCTACAGAGGCCAGTTGTCTTCCATTGGTCTGGGCTTAAGCTACACGAC 1980
ADNc `Vn`     CTACAGGTTCTACAGAGGCCAGTTGTCTTCCATTGGTCTGGGCTTAAGCTACACGAC 1469
*****

GENOMICO      TTTTGCCCAATCTTGCACATGGGCCACATCGGTCTCTGTGCCTCTCACCAGCCTAAA 2040
ADNc `Vn`     TTTTGCCCAATCTTGCACATGGGCCACATCGGTCTCTGTGCCTCTCACCAGCCTAAA 1529
*****

GENOMICO      AGCCACCGCAAACCTCGACCATGCTGAGCAAAGCTGTGAGAGTGAGCCACGCGGACTGCAA 2100
ADNc `Vn`     AGCCACCGCAAACCTCGACCATGCTGAGCAAAGCTGTGAGAGTGAGCCACGCGGACTGCAA 1589
*****

GENOMICO      TGCACCTCTCCCCCTGGACGTACACGTGGATGTTAAAAACACTGGGTCCATGGATGGGAC 2160
ADNc `Vn`     TGCACCTCTCCCCCTGGACGTACACGTGGATGTTAAAAACACTGGGTCCATGGATGGGAC 1649
*****

GENOMICO      CCACACTCTTCTGGTGTTCACAAGCCACCAGATGGAAAATGGGCCGCCAGTAAGCAGCT 2220
ADNc `Vn`     CCACACTCTTCTGGTGTTCACAAGCCACCAGATGGAAAATGGGCCGCCAGTAAGCAGCT 1709
*****

GENOMICO      GGTGGGTTTTCAACAAGATCCATATAGCAGCCGGGTCGGAGACACGGGTCAGAATTGCTGT 2280
ADNc `Vn`     GGTGGGTTTTCAACAAGATCCATATAGCAGCCGGGTCGGAGACACGGGTCAGAATTGCTGT 1769
*****

GENOMICO      TCATGTGTGCAAGCACCTCAGCGTTGTGGACCGGTTTGGGATCCGAAGAATTCCACTGGG 2340
ADNc `Vn`     TCATGTGTGCAAGCACCTCAGCGTTGTGGACCGGTTTGGGATCCGAAGAATTCCACTGGG 1829
*****

GENOMICO      TGAACACAAGCTTCAAATCGGTGACCTCAGCCATCACGTCCTCCTTCAAACCAATTCGGG 2400
ADNc `Vn`     TGAACACAAGCTTCAAATCGGTGACCTCAGCCATCACGTCCTCCTTCAAACCAATTCGGG 1889
*****

<- STOPS
GENOMICO      AGAAATTAAGGTTTAG----- 2418
ADNc `Vn`     AGAAATTAAGGTTTAGGGGCTATCAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1931

```

5

**Figura. 5.14:** Alineamiento de las secuencias de ADNc *PsARF/XYL* ('Vn') y del gen *PsARF/XYL*. Se muestran sombreados y numerados los 5 intrones presentes en el gen. Los cebadores utilizados para clonar los fragmentos parciales se muestran con recuadro.



Intrón	Long.(pb)	AT (%)	Sitio de splice 5'		Sitio de splice 3'		Exón	Long.(pb)	AT (%)
			Exon	Intrón	Intrón	Exon			
							1	270	50
1	111	61	GG	GTAACA	TGCAG	GT	2	170	50
2	97	65	GG	GTGAGT	AATAG	GT	3	97	55
3	93	66	AG	GTTATC	TGCAG	GT	4	351	46
4	94	79	TG	GTAAGT	TGCAG	GT	5	414	48
5	116	71	AG	GTGATA	TACAG	GA	6	602	47

**Figura. 5.15** Características de los intrones del gen *PsARF/XYL*, sitios dadores y aceptores de splicing. Los nucleótidos conservados en la unión de los sitios de splicing 5' y 3' de dicotiledóneas se encuentran marcados en negrita y los no conservados en letra color rojo. La secuencia consenso en la unión del sitio 5' de splicing en dicotiledóneas es **AG GTAAGT**. La secuencia consenso en la unión del sitio 3' de splicing en dicotiledóneas es **TGYAG GT**.

#### Donor splice sites, direct strand

pos 5'->3'	phase	strand	confidence	5'	exon	intron	3'
271	0	+	1.00	CAATGCCAGG	^	GTAACATAAT	H
552	2	+	1.00	GACTTAATGG	^	GTGAGTCTTT	H
747	1	+	0.96	ATTAAAGCAG	^	GTTATCAACA	
1191	1	+	1.00	AATTACGCTG	^	GTAAGTTAGT	H
1699	1	+	0.96	ACAAACCCAG	^	GTGATAAAGG	

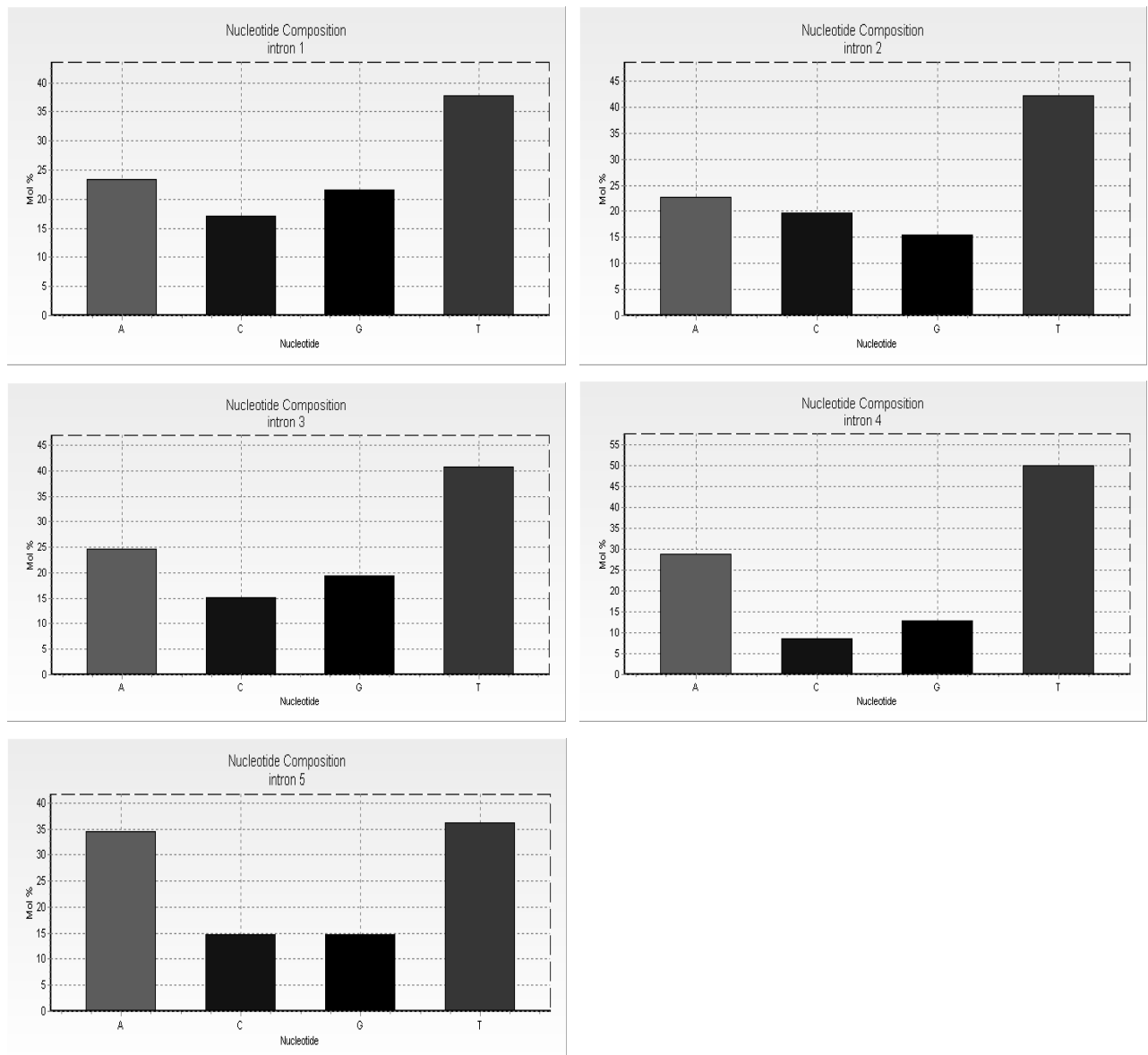
#### Acceptor splice sites, direct strand

pos 5'->3'	phase	strand	confidence	5'	intron	exon	3'
352	0	+	0.94	AATCTTTCAG	^	GGTGATAATT	
381	0	+	0.96	ACATGTGCAG	^	GTTAGCAAGC	H
648	1	+	0.90	GGTCCAATAG	^	GTATATTGTC	
674	1	+	0.85	TGTGATTCAG	^	TTGGTGTCT	
839	1	+	1.00	TAAATTGCAG	^	GTTTGGACTT	H
1284	0	+	1.00	TTGTATGCAG	^	GTGTTGCATG	H
1814	1	+	0.95	TTTTGTACAG	^	GAGGAAAGCT	

#### Branch points, direct strand

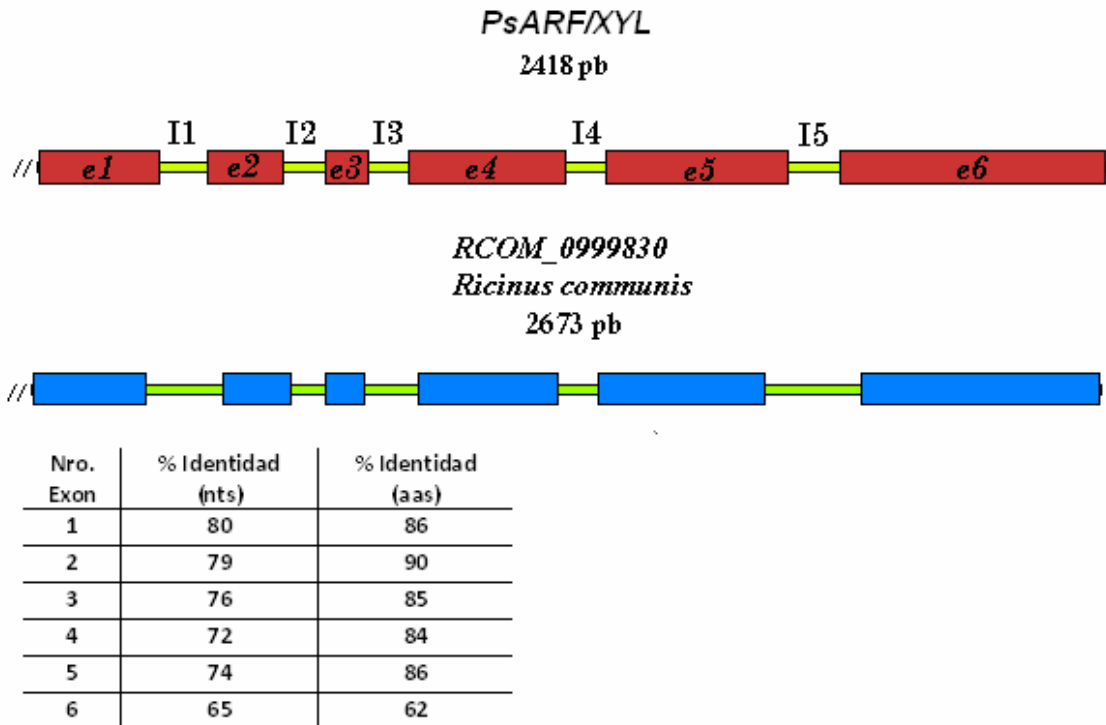
acceptor	branch	strand	score	5'	A	3'
352	336	+	-2.79	ATGTTGTCAGACTGTCAATC		
381	356	+	-2.86	TTTCAGGGTGATAATTTTGC		
648	626	+	-3.06	CCTCTTCTAATTAACTTTT		
674	662	+	-2.08	ATTGTCTCGGACTGTGATTC		
839	808	+	-3.25	TATGAGTCTCACTGTTATAT		
1284	1245	+	-2.35	CATTGATCTAAATTTTAAAC		
1814	1778	+	-2.04	CGTCCGACTAAATAGTCATG		

**Figura. 5.16** Sitios de splicing predichos para el gen *PsARF/XYL* por el programa *Netgene2*.



**Figura. 5.17:** Composición de nucleótidos de los 5 intrones presentes en el gen *PsARF/XYL*. Se observa un incremento de la proporción A+T en todos los casos con respecto a los exones (datos no mostrados).

Búsquedas en NCBI-BLAST permitieron establecer que la organización genómica de *PsARF/XYL* es similar a la de un gen de *Ricinis communis* (GeneBank; RCOM\_0999830) putativamente codificante, según los autores, de una proteína precursora de  $\beta$ -glucosidasa periplásmica (**Fig. 5.16**). La disposición relativa de intrones y exones fue similar para ambos genes y los porcentajes de homología entre los exones se halló en el rango de 72-80 % para la secuencias de nucleótidos y de 62-90 % para las secuencias de aminoácidos.



**Figura. 5.18:** Representación esquemática del gen *PsARF/XYL* y de un gen putativo codificante de  $\beta$ -glucosidasa periplásmica de *Ricinus communis* (GeneBank RCOM\_0999830). La longitud relativa de los elementos representados como rectángulos (exones e intrones) coincide con la longitud relativa de las secuencias de cada gen. La tabla inferior muestra los porcentajes de identidad entre las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de las regiones codificantes, obtenidas mediante NCBI-BLAST.

## 5.9 Análisis de las proteínas deducidas a partir de las variantes de ADNc

Hasta el momento vimos que a partir de ARNm de diferentes tejidos de ciruela japonesa, fue posible aislar dos clones de ADNc codificantes de enzimas con actividad de ARF/XYL putativa que fueron idénticos, excepto por la presencia de una inserción correspondiente al último intrón del gen en uno de los clones. El ADNc esperado según las secuencias informadas en GenBank de otros frutos, es decir aquel completamente spliceado, se denominó 'Vn' (variante normal) y el ADNc con el intrón retenido se denominó 'Vri' (variante que retiene intrón).

Para poder inferir datos sobre la 'funcionalidad' de 'Vri' se realizaron análisis bioinformáticos de las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de los dos ADNc. Como se observa en la **Fig. 5.19**, la inclusión del intrón 5, genera un codón de terminación prematuro en la proteína que se encuentra en marco con el exón precedente. Antes de la interrupción de la traducción, la inclusión del intrón 5, introduce 41 aminoácidos diferentes en la porción COOH-terminal de la proteína. La proteína deducida a partir de ADNc 'Vri' carece de 95 aminoácidos COOH-terminales dando origen a una proteína más corta (**Fig. 5.19**). Analizando la posible ganancia o pérdida de funcionalidad relativa de la proteína 'Vri', se buscó la ubicación de aminoácidos claves, como son los del sitio activo de la enzima, los cuales han sido descritos previamente en otras GHs de la familia 3. Se encontraron los dos aminoácidos del sitio activo probables en las secuencias 'Vri' y 'Vn' de la proteína PsARF/XYL (**Fig. 5.19**). La porción COOH-terminal de la proteína faltante en 'Vri' forma parte de un dominio conservado en GHs de la familia 3 que ha sido involucrado en la unión a hidrato de carbono (Varghese *et al.*, 1999). De los 289 aminoácidos que forman este dominio, sólo 11 fueron perdidos en 'Vri' y los 43 últimos fueron modificados debido a los codones en marco de lectura que introduce el intrón retenido.

```

`Vn`      EARAMYNGGMAGLTYWSPNVNIFRDPRWGRGQETPGEDPVLASKYAARYVKGLQGDGAGN 60
`Vri`      EARAMYNGGMAGLTYWSPNVNIFRDPRWGRGQETPGEDPVLASKYAARYVKGLQGDGAGN 60
PpARF2    EARAMYNGGAAGLTFWSPNVNIFRDPRWGRGQETPGEDPVLAAKYGARVVKGLQGDGAGN 60
          ***** :*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
`Vn`      RLKVAACCKHYTAYDLDNWNGVNRHFHFNARVSKQDLADTYNVPFKACVVEGHVASVMCSY 120
`Vri`      RLKVAACCKHYTAYDLDNWNGVNRHFHFNARVSKQDLADTYNVPFKACVVEGHVASVMCSY 120
PpARF2    RLKVAACCKHYTAYDLDNWNGVDRFHFHFNARVSKQDLEDTYNVPFKACVVDGNVASVMCSY 120
          *****:***** ***** *****:*****:*****
`Vn`      NQVNGKPTCADPDLKGTIRGQWRLNGYIVSDCDSVGVLYEEQHYTRTPPEEAAADAIKAG 180
`Vri`      NQVNGKPTCADPDLKGTIRGQWRLNGYIVSDCDSVGVLYEEQHYTRTPPEEAAADAIKAG 180
PpARF2    NQVNGKPTCADPDLKGTIRGQWKLNGYIVSDCDSVGVYVDNQHYTKTPEAAAAYAIAKAG 180
          *****:***** *:****:*** ** *****
`Vn`      LDLDCGFPLAIHTEAAVRRGLVSQLINWALANTMTVMQRLGMFDGEPSTQRYGNLGLAD 240
`Vri`      LDLDCGFPLAIHTEAAVRRGLVSQLINWALANTMTVMQRLGMFDGEPSTQRYGNLGLAD 240
PpARF2    LDLDCGFPLGIHTEAAIRTGQVNEIDINYALANTITVMQRLGMFDGEPSTQRYGNLGLAD 240
          *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
`Vn`      VCTPAHQQLALEAARQGIIVLLENRGRSLPLSIRRHRTVAVIGPNSDVTVMIGNYAGVAC 300
`Vri`      VCTPAHQQLALEAARQGIIVLLENRGRSLPLSIRRHRTVAVIGPNSDVTVMIGNYAGVAC 300
PpARF2    VCKPSSNELALEAARQGIIVLLENRGRSLPLSIRRHRTVAVIGPNSDVTETMIGNYAGIAC 300
          **.: :*****:***** ***** ***** ***** *****:*****
`Vn`      GYTTPAQIGRYTRTIHQAGCTDVHCNGNQLFGAAEAAARQADATVLMVGLDQSIIEAEFV 360
`Vri`      GYTTPAQIGRYTRTIHQAGCTDVHCNGNQLFGAAEAAARQADATVLMVGLDQSIIEAEFV 360
PpARF2    GYTTPAQIARYTRTIHQAGCTDVHCNGNQLFGAAEVAARQADATVLMVIGLDQSIIEAEFR 360
          *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
`Vn`      DRVGLLLPGHQEELVSRVARASRGPTILVLMSSGGPIDVTFAKNDPRISAIIWVGYPGQAG 420
`Vri`      DRVGLLLPGHQEELVSRVARASRGPTILVLMSSGGPIDVTFAKNDPRISAIIWVGYPGQAG 420
PpARF2    DRTGLLLPGHQEELVSRVARASRGPTILVIMSSGGPIDVTFAKNDPCIGAIIWVGYPGQAG 420
          **.:*****:***** ***** ***** ***** *****
`Vn`      GTAIADVLFGTNPGGKLPMTWYPQNYVTHLPMTDMAMRADPARGYPGRTYRFRYRGPVVF 480
`Vri`      GTAIADVLFGTNPGGKLPMTWYPQNYVANLPMPTDMAMRADPARGYPGRTYRFRYRGPVVF 480
PpARF2    GTAIADVLFGTNPGGKLPMTWYPQNYVANLPMPTDMAMRADPARGYPGRTYRFRYRGPVVF 480
          *****:***** . *
`Vn`      PFGLGLSYTTFAHNLAHGPTSVSVPLTSLKATANSTMLSKAVRVSHADCNALSPLDVHVD 540
`Vri`      -----
PpARF2    PFGMGLSYTRFSSHSLAQGPTLVSVPLTSLVAAKNTTMLSNGHVRVSHSHTNCDLSLDFHID 540
`Vn`      VKNTGSMGDGHTLLVFTSPDPGKWAASKQLVGFHKKIHAAGSETVRVIAVHVCKHLSVVD 600
`Vri`      -----
PpARF2    IKNTGTMGDGHTLLVFTQPAQGWAPNKQLVGFHKKVHIVAGSERRVRVGVHVCKHLSIVD 600
`Vn`      RFGIRRIPLGEHKLQIGDLSHHVSLQTNSEIKV 634
`Vri`      -----
PpARF2    KLGIRRIPLGQHKLEIGDLKHYVSIKANLGEIKF 634

```

**Figura.5.19:** Secuencias de aminoácidos deducidos a partir de las variantes de ADNc del gen *PsARF/XYL* 'Vn' y 'Vri'. También se alineó la secuencia de *Pyrus pyrifolia* homóloga PpARF2. Los dos aminoácidos del sitio activo se encuentran recuadrados en verde en el contexto conservado SDC (nucleófilo catalítico putativo) y AEF (ácido/base catalítico putativo). Los aminoácidos incluidos en 'Vri' y ausentes en 'Vn' debido al intrón retenido, se muestran recuadrados antes del codón de terminación prematuro que se muestra en rojo. Se muestra un alineamiento parcial para simplificar el análisis. Los dominios conservados se muestran en gris.

## CAPÍTULO 6

---

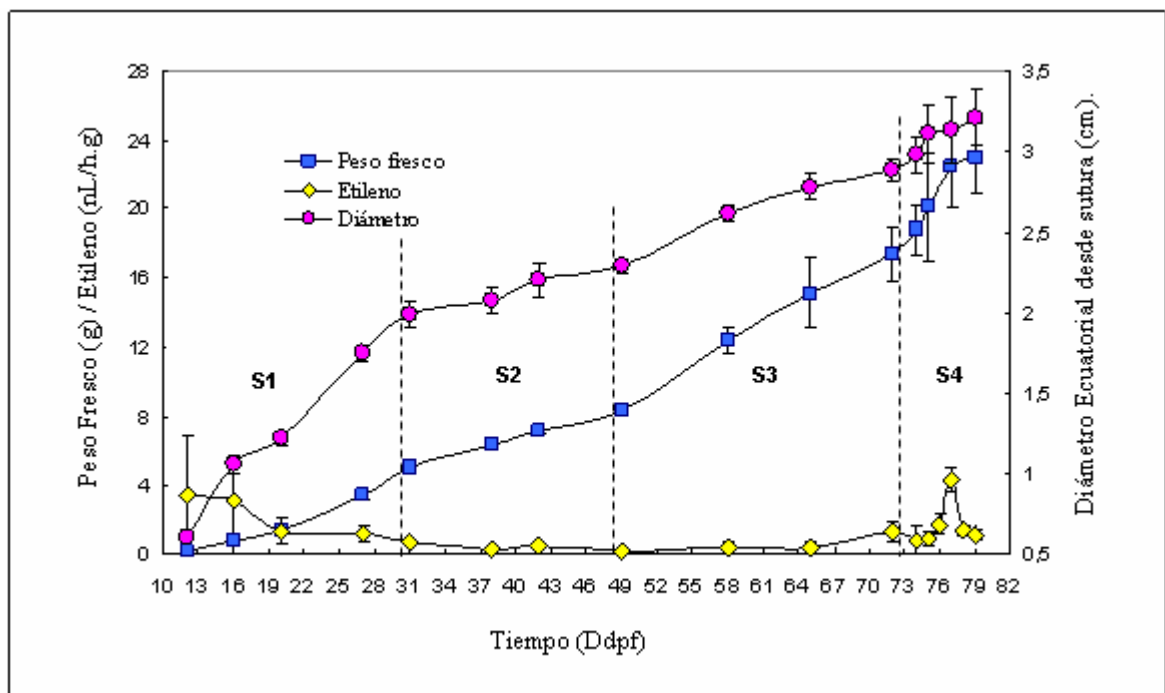
### RESULTADOS

#### **Análisis de la expresión de los genes *PsARF1* y *PsARF/XYL* de *Prunus salicina* Lindl ‘Gigaglia’**

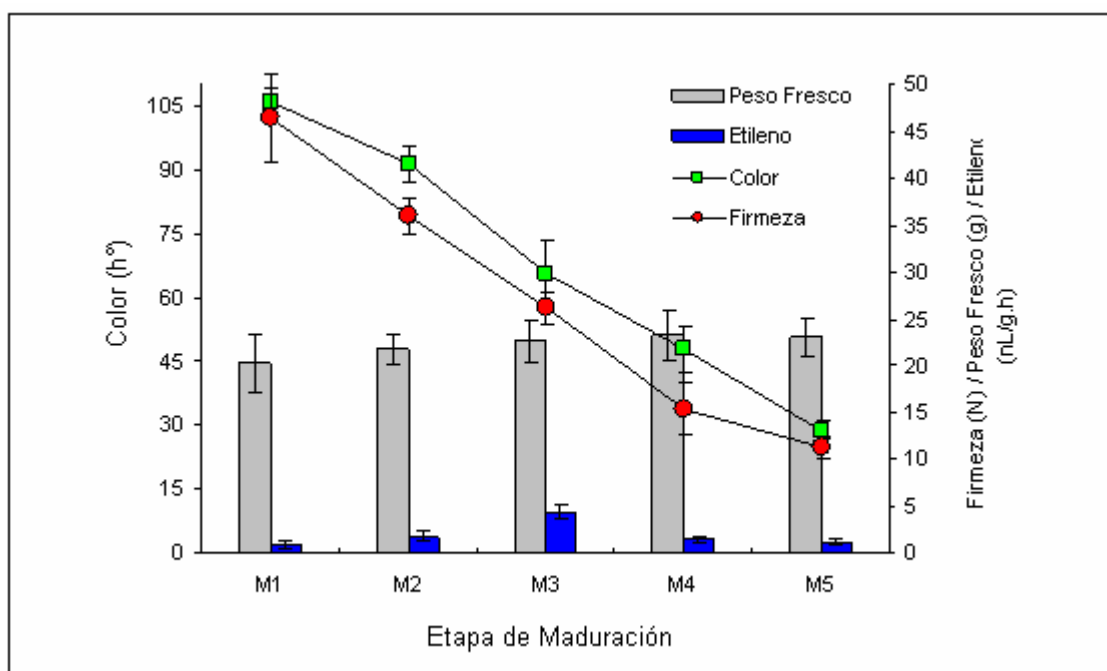
##### **6.1 Patrón de expresión temporal en mesocarpo**

Durante el desarrollo de esta tesis no se disponían de datos suficientes sobre los parámetros de crecimiento y maduración de ciruela japonesa ‘Gigaglia’ dado que se trata de un cultivar autóctono, aún poco difundido. Para analizar los patrones de expresión de los genes de interés durante el crecimiento y la maduración de ciruela japonesa ‘Gigaglia’, primero se realizó un seguimiento de la ontogenia y de la maduración del fruto, durante un período que abarcó 12 semanas. A tal fin, se registraron los Ddpf, las variaciones en el peso fresco y en el diámetro ecuatorial del fruto, así como también los cambios de color, de firmeza y la producción de etileno durante la maduración (**Fig. 6.1**). El crecimiento del fruto de ‘Gigaglia’ mostró un patrón similar a una curva sigmoidea doble en el que se distinguen 4 fases, al igual que en otras drupas. Las fases de crecimiento S1 (multiplicación celular), S2 (lignificación del endocarpo) y S3 (agrandamiento celular) tuvieron una duración aproximada de 20 días (10-30 Ddpf), 18 días (31-49 Ddpf) y 24 días (50 a 74 Ddpf) respectivamente. La tasa de crecimiento fue mayor durante S1 y S3 (aprox. 0,27 y 0,45 g día<sup>-1</sup> respectivamente) hallando un mínimo en S2 (0,18 g día<sup>-1</sup>). La fase S4 resultó relativamente corta (75-80 Ddpf): en ella, el fruto alcanzaba su tamaño máximo y comenzaba la etapa de maduración que coincidía con la aparición de los primeros cambios de color y de pérdida de firmeza (ablandamiento) del fruto (**Fig. 6.2**). La producción de etileno exhibió un pico durante la maduración, como es típico en los frutos climatéricos. Se observó un

incremento de esta hormona a los 76 Ddpf alcanzando un máximo a los 77 Ddpf ( $4,34 \text{ nL h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ) y descendiendo luego a un promedio de  $1,41 \text{ nL h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  a los 78 Ddpf. La pérdida de firmeza y los cambios de color (verde→rojo→púrpura) ocurrieron simultáneamente durante esta última fase, pudiéndose clasificar los frutos en 5 etapas de maduración. Las mismas se denominaron M1 (75 Ddpf), con un valor promedio de firmeza = 46 N y de  $h^\circ = 106$ ; M2 (76 Ddpf), con un valor promedio de firmeza = 36 N y de  $h^\circ = 91$ ; M3 (77 Ddpf), con un valor promedio de firmeza = 26 N y de  $h^\circ = 65$ ; M4 (78 Ddpf), con un valor promedio de firmeza = 15 N y de  $h^\circ = 47$  y, finalmente, M5 (79 Ddpf), con un valor promedio de firmeza = 11 N y de  $h^\circ = 29$ .



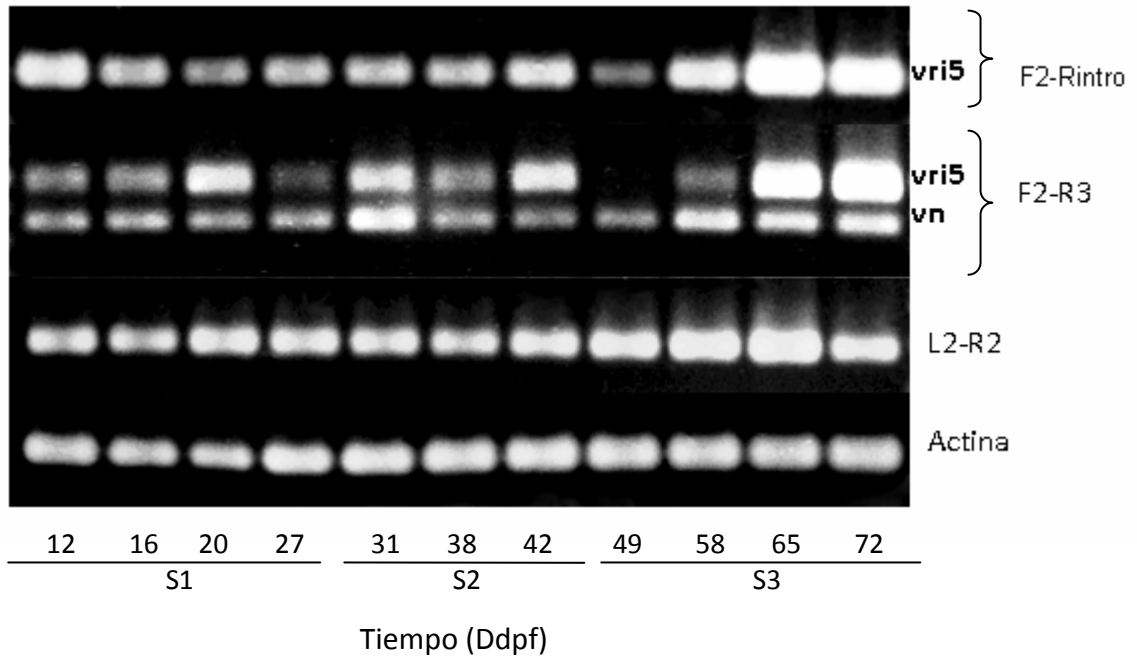
**Figura. 6.1:** Peso fresco, diámetro ecuatorial desde sutura y producción de etileno de los frutos de ciruelo japonés 'Gigaglia' durante el crecimiento y la maduración. Los valores representan un promedio  $\pm$  DE de  $n = 15$  frutos para los parámetros de crecimiento y de  $n = 3$  para la producción de etileno. Donde no se observan las barras de error, el DE no excedió el tamaño del símbolo. Se indican las tres primeras fases de crecimiento (S1, S2, S3) y la fase de maduración (S4).



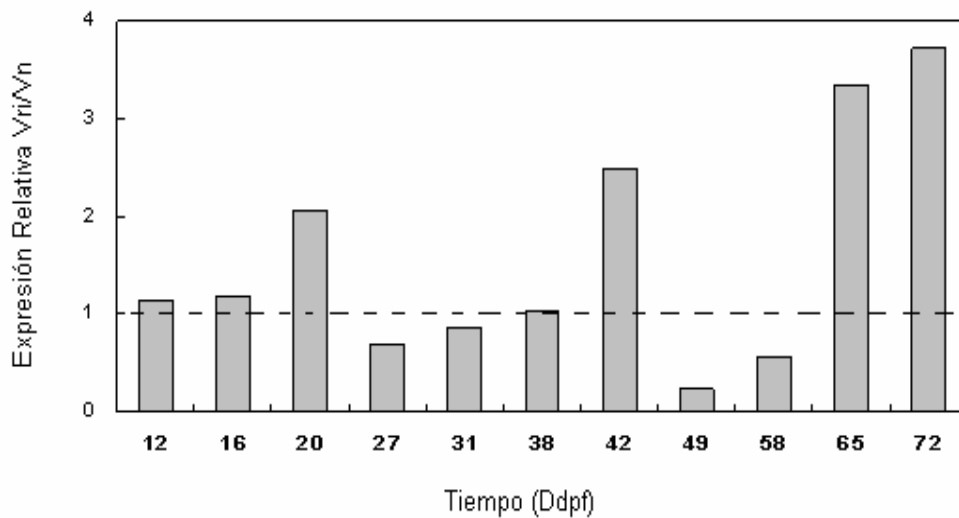
**Figura. 6.2:** Clasificación de los frutos de 'Gigaglia' en 5 etapas de maduración (M1, M2, M3, M4 y M5) según la medición de parámetros de Color ( $^{\circ}h$ , grados hue) y Firmeza (N). Se realizaron 2 mediciones por fruto, en sectores opuestos y a nivel del plano ecuatorial del fruto, considerándose como 1 repetición al valor promedio de ambas mediciones. Cada grupo de frutos estaba conformado por  $n = 15$ . Los frutos M1 presentaban color verde-rosáceo, M2 color rosa, M3 color rojo, M4 color rojo púrpura, M5 color rojo púrpura-violáceo. Los frutos considerados apropiados para consumo fueron los del grupo M4.

La expresión de los genes *PsARF/XYL* y *PsARF1* se analizó mediante RT-PCR durante las fases de crecimiento S1, S2 y S3 (**Fig. 6.3**) y maduración del fruto (fase S4, **Fig. 6.4**), incluyendo ésta última las cinco etapas de ablandamiento del fruto ya descritas. Se utilizaron los cebadores F2-R3 para amplificar los transcritos de *PsARF/XYL*, los cuales permiten discriminar la expresión de las dos variantes de ADNc 'Vri' y 'Vn' ya que los mismos flanquean la región de ADNc donde está retenido el intrón 5 en la variante 'Vri' o donde el intrón es procesado por splicing en la variante 'Vn', de forma tal que se obtienen dos productos en la misma reacción de amplificación. Además, se emplearon los cebadores F2-Rintro que sólo amplifican la variante 'Vri' dado que el cebador reverso es complementario al último intrón, evitando así el efecto de competencia por el molde. Por último, se evaluó la expresión del gen parcialmente clonado *PsARF1* (nro. acceso GenBank: DQ822467, homólogo a *PpARF1* de durazno) mediante uso de los cebadores L2-R2.

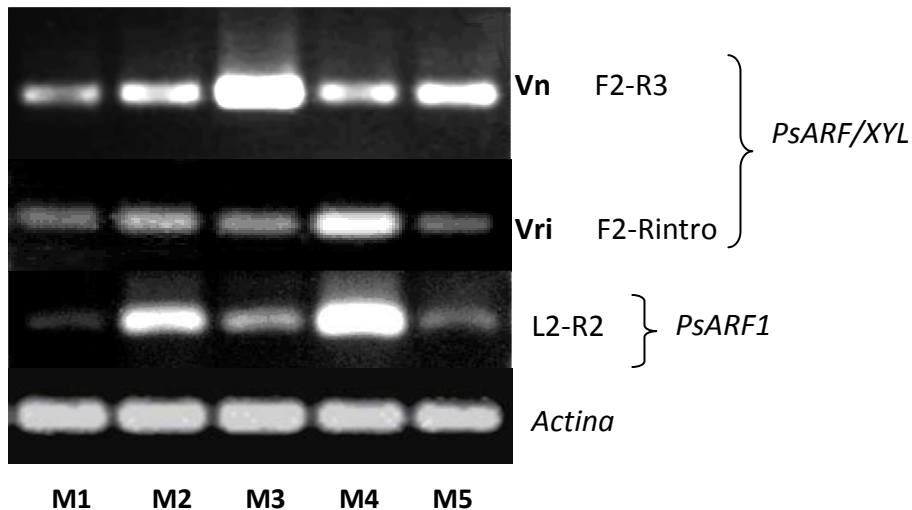




**Figura. 6.3:** Análisis de la expresión de los genes *PsARF/XYL* y *psARF1* durante la ontogenia de ciruela japonesa (*Prunus salicina* Lindl ‘Gigaglia’) mediante RT-PCR semicuantitativa. Los cebadores F2-Rintro fueron utilizados para la detección de la variante de ADNc ‘Vri’, F2-R3 para amplificar las dos variantes de ADNc, ‘Vn’ y ‘Vri’ y L2-R2 fueron empleados para describir la expresión de *PsARF1*. El gen de actina se utilizó como control, para normalizar el valor de la expresión de los genes.



**Figura. 6.4:** Expresión relativa de las dos variantes de ADNc de *PsARF/XYL* (‘Vri’/‘Vn’) durante la ontogenia de ciruela japonesa. Los valores se estimaron mediante densitometría utilizando el programa QuantiScan versión 3.1, a partir de las bandas de RT-PCR obtenidas con cebadores F2-R3.



**Fig. 6.5:** Análisis de la expresión de los genes *PsARF/XYL* y *PsARF1* durante la maduración de ciruela japonesa (*Prunus salicina* Lindl 'Gigaglia') mediante RT-PCR semicuantitativa. Se utilizaron frutos en las cinco etapas de maduración caracterizadas previamente como M1, M2, M3, M4 y M5. Los cebadores F2-Rintro fueron utilizados para la detección de la variante de ADNc 'Vri', F2-R3 para amplificar las dos variantes de ADNc, 'Vn' y 'Vri' y L2-R2 fueron empleados para describir la expresión de *psARF1*. El gen de actina se utilizó como control, para normalizar la expresión de los genes.

Las variantes 'Vri' y 'Vn' se expresaron durante todo el crecimiento del fruto a niveles variables, exceptuando aquellos correspondientes a 49 Ddpf (inicio de la fase de crecimiento exponencial S3) donde 'Vri' no fue detectable con cebadores F2-R3 y se detectó a niveles basales con los cebadores específicos F2-Rintro (**Fig. 6.3**). A partir de ese momento y durante toda la fase S3 los transcritos 'Vri' de *PsARF/XYL* alcanzaron un notable incremento, similar a la tasa de crecimiento del fruto (**Fig. 6.1**), tanto con los cebadores F2-R3 como con los F2-Rintro. Sin embargo, únicamente 'Vn' fue detectable durante la maduración de los frutos con cebadores F2-R3 y 'Vri' se detectó a niveles bajos, comparables con los frutos de 49 Ddpf, al utilizar cebadores F2-Rintro (**Fig. 6.5**). La expresión de 'Vri' duplicó la de 'Vn' en frutos de 20 y 42 Ddpf (**Fig. 6.4**) y fue entre 3 y 4 veces mayor en frutos pre-climatéricos (S3; 65, 72 Ddpf).

Los frutos en estado M3 de maduración, mostraron la expresión máxima de los transcritos 'Vn' de *PsARF/XYL* de forma coincidente con el pico en la producción de etileno (**Fig. 6.2**).

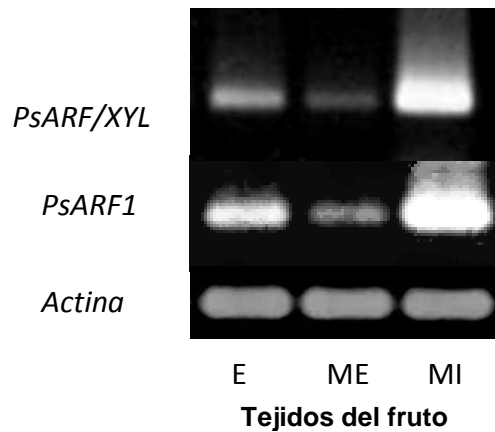
Por otro lado, la expresión de *PsARF1*, resultó muy similar durante las etapas del crecimiento (**Fig. 6.3**), manifestando un incremento leve durante la fase S3 (49, 58 y 65

Ddpf). Sin embargo, los transcritos de *PsARF1* fueron apenas detectables en frutos de madurez incipiente M1 y en frutos maduros M3 y M5, de forma similar al patrón de expresión de 'Vri' (cebadores F2-Rintro, **Fig. 6.3**). Los frutos en etapa S4 que más expresaron el gen *PsARF1* fueron los correspondientes a las etapas M2 y M4.

El patrón de expresión de 'Vri' con cebadores específicos F2-Rintro durante el crecimiento, no reproduce exactamente los resultados obtenidos con los cebadores F2-R3 (banda superior, **Fig. 6.3**). Esto podría explicarse por la presencia de un efecto competitivo por el molde en las reacciones de RT-PCR, donde se utilizan cebadores que amplifican ambas variantes de ADNc. De hecho, al utilizar cebadores específicos de la variante 'Vri' en frutos S4, los niveles de amplificación fueron relativamente bajos en relación a los obtenidos durante el crecimiento del fruto y luego, al utilizar los cebadores F2-R3, no se pudo detectar producto de amplificación, aunque se realizaron varias repeticiones.

## **6.2 Patrón de expresión espacial de *PsARF/XYL* y *PsARF1* en el fruto**

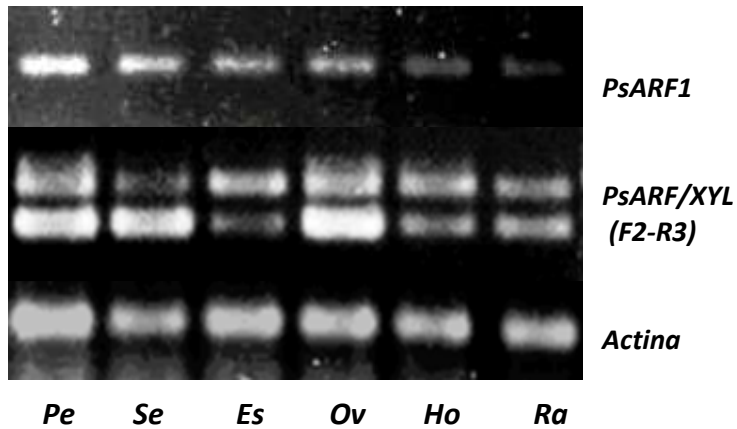
Para investigar la distribución espacial de los transcritos de *PsARF1* y *PsARF/XYL* en los diferentes tejidos del fruto, se disectaron muestras de epicarpo, mesocarpo externo y mesocarpo interno de ciruela japonesa para las correspondientes extracciones de ARNm. Los frutos empleados se encontraban en la etapa de maduración S4 (76 Ddpf). Se utilizaron los cebadores F1-R1 *PsARF/XYL* y los cebadores L2-R2 para *PsARF* (**Fig. 6.6**). La acumulación máxima de los transcritos de *PpARF1* y *PpARF/XYL* ocurrió en el mesocarpo interno. El ARNm de *PpARF/XYL* se detectó en menor medida en epicarpo y en mesocarpo externo. En mesocarpo externo, la expresión de ambos genes fue relativamente menor. Un patrón de expresión semejante había sido obtenido cuando se analizaron los genes *PpARF1* y *PpARF/XYL* en muestras de mesocarpo de durazno para los mismos tejidos analizados en esta sección.



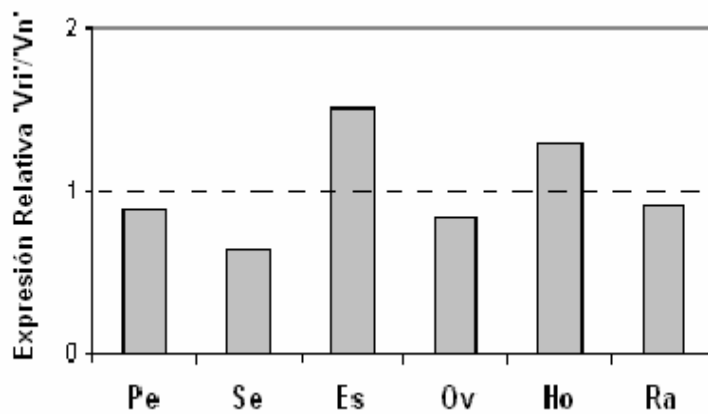
**Figura. 6.6:** Acumulación de transcriptos *PpARF/XYL* y *PpARF1* y en tres tejidos diferentes de frutos de ciruelo japonés en grado de madurez M2. Para *PsARF/XYL* se utilizaron los cebadores F1-R1 que amplifican ADNc en una porción lejana al sitio de splicing del intrón retenido, por lo cual se visualiza la expresión total de las dos variantes. Los tejidos fueron los siguientes: epicarpo (E), mesocarpo externo (ME) y mesocarpo interno (MI). El gen de actina se utilizó como control interno.

### 6.3 Patrón de expresión en otros tejidos

Se realizaron análisis de RT-PCR para detectar la presencia de transcriptos de *PpARF/XYL* 'Vri' y 'Vn' en otros tejidos, diferentes al fruto así como también la expresión de *PsARF1*. Ambas variantes de ADNc de *PpARF/XYL* se expresaron en todos los tejidos vegetativos y reproductivos analizados: pétalos, sépalos, estambres, carpelos, hojas y raíces (**Fig. 6.7**). La expresión relativa entre ambas variantes de ADNc fue diferente entre órganos, ya que la variante 'Vri' se expresó relativamente más que 'Vn' en estambres y hojas (**Fig. 6.8**). En el resto de los tejidos se expresó más la variante completamente splicada, exceptuando las raíces donde se detectaron niveles de expresión prácticamente equivalentes para ambas variantes. La acumulación de transcriptos *PsARF1* fue evidente en todos los tejidos resultando levemente mayor en la flor (pétalos, sépalos, estambres y ovarios) con respecto a hojas y raíces.



**Figura. 6.7:** Acumulación de transcritos *PpARF/XYL* en diferentes tejidos vegetativos y reproductivos de *Prunus salicina*. Pe: pétalos, Se: sépalos, Es: estambres, Ov: ovarios, Ho: hojas intactas expandidas, Ra: radículas. La expresión del gen actina se utilizó como control interno.



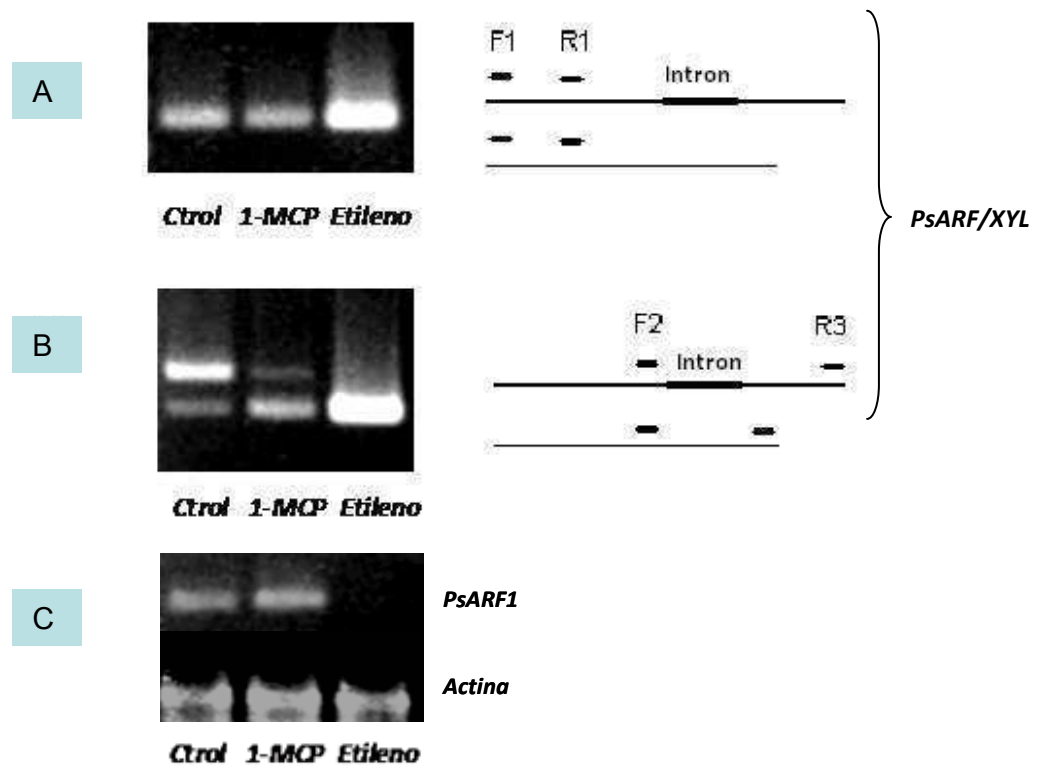
**Figura. 6.8:** Los valores de expresión de las dos variantes de ADNc *PsARF/XYL* se estimaron mediante densitometría de bandas utilizando el programa QuantiScan versión 3.1 a partir de las bandas de RT-PCR obtenidas con cebadores F2-R3 en distintos tejidos de *Prunus salicina* Lindl 'Gigaglia'. Se muestran los cocientes 'Vri/Vn' para los valores obtenidos. Pe: pétalos, Se: sépalos, Es: estambres, Ca: carpelos, Ho: hojas intactas expandidas, Ra: raíces incipientes.

## 6.4 Efecto del 1-MCP y del etileno en frutos pre-climatéricos

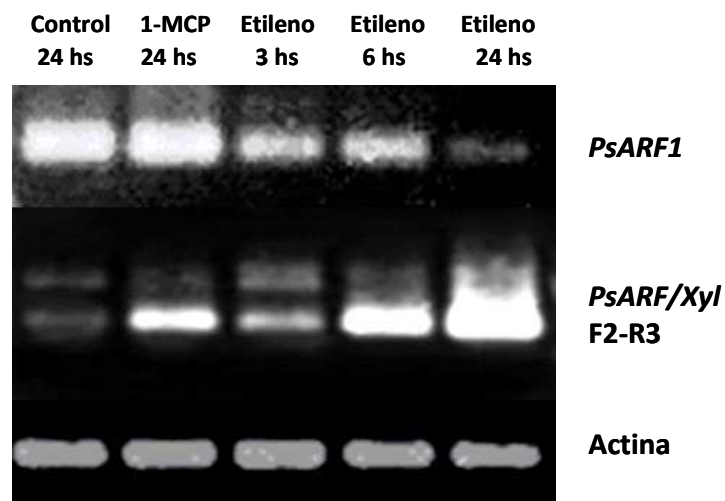
A partir de los resultados de RT-PCR obtenidos durante la ontogenia de ciruela japonesa, se comprobó que existe cierta regulación sobre los genes estudiados, de una forma que depende del estado de desarrollo o maduración del fruto. Durante la maduración resultaba de particular interés analizar la posibilidad de que el etileno actuara como regulador directo o indirecto de los genes que se inducen durante el ablandamiento. Habíamos hallado que la variante del gen *PsARF/XYL* 'Vri' es poco detectable durante la maduración y 'Vn' tuvo una expresión máxima en frutos M3, de forma coincidente con el pico de etileno. Para probar la hipótesis de que el etileno estaría involucrado en la inducción de 'Vn' durante la maduración, se cosecharon ciruelas pre-climatéricas (de 72 Ddpf) y se seleccionaron mediante cromatografía gaseosa aquellas que no producían etileno endógeno. Sobre las mismas, se aplicaron distintos tratamientos de postcosecha, como fue descrito en 'Materiales y Métodos'. Por un lado, se colocaron las ciruelas en un contenedor exponiéndolas durante 24 h a 1-MCP 0,5 ppm, el cual actúa como inhibidor de la acción del etileno (Trincheró *et al.*, 2004) y, por el otro, durante 24 h, a etileno 1 ppm. El control se realizó colocando las ciruelas en las mismas condiciones pero sin modificar la atmósfera de los frutos. Se pudo observar un cambio de coloración en los frutos que recibieron 24 h de etileno tanto en el epicarpo como en el mesocarpo, al compararlos con los frutos 'control 24 h' que no presentaban color al igual que los frutos '1-MCP 24 h'. Tal observación constituyó un 'control positivo' visual en referencia a la aplicación de etileno (ya que es bien conocido que estos frutos cambian de color rápidamente debido a la presencia de etileno). El mesocarpo de los frutos se utilizó para las extracciones de ARN y el análisis de la expresión mediante RT-PCR semicuantitativa del gen *PsARF/XYL* (**Fig. 6.9**). Para tal fin, se utilizaron dos combinaciones de cebadores que abarcan regiones diferentes del gen. Por un lado, los cebadores F1-R1, con los cuales podemos analizar la expresión conjunta de las dos variantes de ADNc - 'Vri' y 'Vn' - dado que los mismos se sitúan en una región distante del último intrón del gen *PsARF/XYL*. De ser las únicas variantes de ARNm para este gen, estaríamos en presencia de la expresión total del mismo (no se descarta la posibilidad de la existencia de otras variantes de splicing para este gen). En este caso, se observó un aumento en los transcritos de *PsARF/XYL* frente a la aplicación de etileno durante 24 horas mientras que los niveles de

ARNm fueron menores y similares en el control y en los frutos tratados con 1-MCP. Cuando se utilizan cebadores que permiten discriminar entre las dos variantes de ADNc (F2-R3) se obtiene una marcada inducción de la expresión de la variante 'Vn' al aplicar etileno durante 24 h y no se pudo amplificar 'Vri' en la reacción de RT-PCR. Estos resultados se asemejan a lo obtenido en frutos climatéricos en donde 'Vri' resultó indetectable. En los frutos tratados con 1-MCP se amplifican ambas variantes con los cebadores F1-R1 pero la expresión relativa 'Vri'/'Vn' fue menor en estos frutos con respecto a los del control. A partir de los resultados obtenidos, se infiere que la expresión de 'Vn' podría estar inducida por etileno. Resultados contrastantes se obtuvieron para el gen *PsARF1* dado que no se pudo detectar su expresión en frutos tratados con 24 h de etileno (**Fig. 6.9**). Para investigar la acción del etileno sobre la inducción de 'Vn' en función del tiempo, se realizaron los mismos tratamientos descritos pero las muestras para la extracción de ARN, fueron tomadas a las 3 h, 6 h y 24 h de la aplicación de etileno (**Fig. 6.10**). Además, se analizó la expresión del gen *PsARF1*, el cual había mostrado una disminución en los niveles de transcritos en frutos de estado M3 de forma coincidente con el pico de etileno. Se puede observar que, entre las 3 h y las 6 h posteriores a la aplicación de etileno, se induce la expresión de la variante 'Vn' de *PsARF/XYL* alcanzando un máximo de expresión a las 24 h de exposición al etileno (**Fig. 6.10**). No se detectaron mediante RT-PCR transcritos 'Vri' ni a las 6 h ni a las 24 h de tratamiento con etileno pero a las 3 h de tratamiento el patrón de expresión de 'Vn' y 'Vri' fue similar al del 'control 24 h'. Los frutos tratados con 1-MCP durante 24 hs mostraron una expresión de 'Vn' relativamente mayor que los frutos 'control 24 h' (**Fig. 6.9 B** y **Fig 6.10**).

Aparentemente, el procesamiento alternativo de los transcritos *PsARF/XYL* se ve afectado a las pocas horas del tratamiento con etileno, siendo favorecido el spliceado completo de los transcritos ya que fue imposible detectar la variante de ADNc que retiene intrón con la técnica utilizada. Por otro lado, los transcritos *PsARF1* mostraron una disminución notable a las 3 h y 6 h de la aplicación de etileno y sus niveles fueron mínimos a las 24 h de la aplicación de etileno. Al aplicar 1-MCP durante 24 h, la expresión de *PsARF1* fue similar al control.



**Figura. 6.9:** RT-PCR para el gen *PsARF/XYL* con cebadores F1-R1 (A) o cebadores F2-R3 (B) en mesocarpo de ciruelas pre-climatéricas, cuyos frutos fueron tratados en postcosecha con 1-MCP (inhibidor de la acción del etileno) durante 24 h, con etileno durante 24 h o no tratados (control). En C) se muestra la expresión del gen *PsARF1* y del gen de actina como control interno.



**Fig. 6.10:** RT-PCR para el gen *PsARF/XYL* con cebadores F2-R3 en mesocarpo de ciruelas pre-climatéricas, cuyos frutos fueron tratados en postcosecha con 1-MCP (inhibidor de la acción del etileno) durante 24 h, con etileno durante 3, 6 o 24 h, o no tratados (control). Además se analizó la expresión de *PsARF1* mediante el uso de los cebadores L2-R2 y la expresión de actina como control interno.



## CAPÍTULO 7

---

### DISCUSIÓN

#### ***7.1 La actividad de $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa se incrementa durante la maduración de durazno y varía topográficamente dentro del fruto***

Del análisis de la actividad total de ARF durante el crecimiento y la maduración de durazno resulta que sus niveles son cuantificables en la mayoría de los estados, hallándose valores mínimos durante la fase final de expansión celular (S3-L) y un marcado incremento durante la maduración organoléptica del fruto (**Fig. 4.5**). Durante la ontogenia, la actividad resultó similar a la de la pera japonesa (Tateishi *et al.*, 1996; 2005) y tomate (Sozzi *et al.*, 2002a; 2002b) a pesar de las diferencias en los patrones de crecimiento del fruto entre estas especies (curva sigmoidea doble en durazno, exponencial temprana y luego casi lineal en pera Japonesa y tomate). Brummell *et al.* (2004) detectaron baja actividad de ARF en duraznos 'O' Henry' a la mitad de su tamaño final con un aumento pequeño al alcanzar el fruto su tamaño máximo. Las diferencias en cuanto a la actividad enzimática halladas en las variedades O'Henry (Brummell *et al.*, 2004) y Springcrest (esta tesis) pueden deberse a variaciones genéticas entre cultivares (por ejemplo, duraznos tempranos vs. duraznos de estación tardía) y/o a cambios en el contenido de proteínas por unidad de peso fresco, la cual realmente ocurre cuando las células se expanden y acumulan agua y solutos en las vacuolas. Los duraznos evidenciaron un marcado incremento de actividad en el estado temprano de maduración, como se describió previamente (Brummell *et al.*, 2001), y alcanzaron la actividad máxima en estado maduro. En esta tesis, la actividad resultó máxima en R4, de forma coincidente con el pico en la producción de etileno climatérico. Así mismo, la actividad se correlacionó positivamente con la pérdida de firmeza de los frutos, exceptuando el estado sobremaduro, en el cual la firmeza sigue decayendo sin aumentar la actividad relativa (**Figs. 4.5 y 4.4**). Estos resultados, conjuntamente, señalan que las enzimas de interés pueden estar implicadas en el proceso de maduración ya que su actividad se

correlaciona bien con los índices de madurez, tales como el incremento en la producción de etileno y la pérdida de firmeza. Sin embargo, su actividad no se encuentra exclusivamente en frutos maduros, sino también en frutos verdes en crecimiento, a menor escala. En pera japonesa y tomate, se hallaron diferentes isoformas presentes en varios estados durante el desarrollo del fruto pero solo una isoforma regulada positivamente por el etileno que participaría en el metabolismo de la arabinosa de pared celular relacionada a la maduración (Tateishi *et al.*, 2005; Sozzi *et al.*, 2002a). Posiblemente, en cada una de las etapas, la actividad cuantificada en frutos de duraznero sea el resultado de un conjunto de enzimas relacionadas que actúan concertadamente en el mismo proceso.

Al determinar la actividad total de ARF en tres tejidos específicos del fruto en S3-E, R1, R2 y R5, se encontró que la actividad es mayor en el mesocarpo interno y menor en el mesocarpo externo, siendo el epicarpo el tejido que presentó una actividad enzimática intermedia en relación con la obtenida en los otros dos tejidos (**Fig. 4.6**). De esta forma, se verifica que la actividad enzimática de ARF dentro del fruto es relativa al tejido analizado. De ahí la importancia metodológica de utilizar un criterio reproducible en la toma de las muestras cuando se desea comparar entre tratamientos. Una posible explicación para las diferencias observadas se discute en la sección 7.6.

## **7.2 El gen *PpARF1* de durazno codifica una glicosilhidrolasa (GH) perteneciente a la familia 51**

Mediante los análisis bioinformáticos se pudo determinar que la proteína deducida a partir del ADNc de *PpARF1*, contiene un péptido señal de 25 aminoácidos de longitud en su extremo amino terminal, el cual sería clivado entre los residuos Ala e Ile resultando en una proteína madura de 71,6 kD, con un pI teórico de 4,94 (**Fig. 4.2**). Valores similares (PM de 71,3 kD, pI teórico de 4,74) fueron predichos para *MdAFase1* (Goulao *et al.* 2008). El relativamente bajo pI puede ser importante para el posicionamiento preciso de *PpARF1* en la pared celular dado que podría interactuar con moléculas cargadas positivamente tales como extensinas, glicoproteínas básicas con pI ~10 debido a su alto contenido en Lys.

En la proteína deducida se distinguen dos dominios conservados que guardan relación con la función putativa (**Fig. 4.2**): por un lado, el dominio catalítico, directamente implicado en la liberación de los restos de polisacáridos y por el otro, un dominio de unión putativa a hidrato de carbono, denominado CBD (carbohydrate binding domain) cuya función sería la unión al sustrato, posibilitando una cercanía más prolongada y estrecha de este último con el dominio catalítico (Guillén *et al.*, 2010).

La presencia de dominios conservados (de hidrólisis de monosacáridos y de unión a hidratos de carbono), las señales de transporte a apoplasto (**Fig. 4.2**) y los resultados filogenéticos (**Fig. 4.3**) revelan que la proteína PpARF1 podría clasificarse como una glicosilhidrolasa (GH) de la familia 51. Con respecto a sus aminoácidos constitutivos, PpARF1 contiene entre un 86 y 83 % de identidad con ARFs provenientes de manzana, pera japonesa y pera europea, lo que sugiere que estas secuencias son probablemente ortólogas y que las GHs codificadas tienen probablemente especificidades bioquímicas de sustrato similares.

### **7.3 Se pueden aislar al menos dos variantes de ADNc para el gen *PsARF/XYL* de *Prunus salicina* 'Gigaglia'**

En el capítulo 4 de esta tesis se describió el patrón transcripcional del gen *PpARF/XYL* de duraznero (*Prunus persica* 'Springcrest') cuya secuencia en bases de datos había sido publicada previamente por Hayama *et al.* (2006). Los autores lo describieron como un gen que se expresa e induce fuertemente durante la maduración, respondiendo de forma proporcional a la concentración de etileno percibida por el fruto. En *Prunus salicina* no se había descrito hasta el momento el papel de una enzima con actividad bifuncional (tanto de ARF como de XYL) en el proceso de crecimiento y maduración de los frutos. Con el objetivo de describir el patrón de transcripción de un gen homólogo a *PpARF/XYL* en ciruela japonesa, se ideó la clonación de un ADNc putativo.

A partir de reacciones de RT-PCR y mediante uso de ARNm proveniente de diferentes tejidos de ciruela japonesa, se clonaron dos variantes distintas de ADNc (**Figs. 5.2 y 5.5**). Los alineamientos de las secuencias permiten establecer que se trata de versiones idénticas del mismo ADNc excepto por la presencia de una inserción de 116 pb en una de ellas (**Fig. 5.6**). A excepción de la zona de la inserción, el ADNc presenta una gran

homología de secuencia con *PpARF/XYL* de durazno (**Fig. 5.3**), indicando que los clones obtenidos pueden corresponder a glicosidasas de pared celular.

Los análisis bioinformáticos permiten inferir que la inserción presente en una de las variantes de ADNc presenta sitios dador y aceptor de splicing (**Fig. 5.4**) y que su composición de nucleótidos coincide con altos porcentajes de A+T como típicamente ocurre en los intrones vegetales (**Fig. 5.15**). La presencia de un intrón podría obedecer a contaminaciones con ADN genómico, a pesar de los tratamientos con DNAsa I (**Fig. 5.7**). Sin embargo, al realizar reacciones de RACE 3' que permiten discriminar entre ambas variantes de ADNc, se presentan evidencias de que el molde en las reacciones de RT-PCR estaba constituido por dos isoformas de ARNm diferentes y no por ADN genómico contaminando las muestras (**Figs. 5.8, 5.9 y 5.10**).

La secuenciación de ADN genómico *PsARF/XYL* y su comparación con los ADNc obtenidos permitió establecer que la inserción de 116 pb hallada corresponde a un intrón posicionado en la zona 3' del gen (**Fig. 5.14**). Este intrón resultó ser el último de los 5 intrones hallados en el gen *PsARF/XYL*. La variante sin intrones se denominó 'Vn' y la restante 'Vri' (variante que retiene intrón). La similitud entre ambas regiones 3' UTR señala que se trataría de dos ARNm transcritos a partir de un único gen (**Figura 5.10**) ya que estas regiones no traducidas probablemente serían poco conservadas en genes diferentes. Sin embargo, las regiones 3' UTR de las variantes del gen *PsARF/XYL* resultan llamativamente cortas, de aproximadamente 8 nucleótidos (**Fig. 5.10**). Este hecho, si bien torna menos contundente la afirmación anterior, no la invalida. La longitud mínima de la región 3' UTR observada en plantas es de 13 nucleótidos con un promedio de 207 nucleótidos (Mignone *et al.*, 2002). Al analizar las regiones 3' de genes homólogos a *PsARF/XYL* de pera japonesa y manzana, se observó un alto contenido de adeninas en la porción UTR antes del sitio de clivaje y poliadenilación del pre-ARNm y regiones 3' UTR más largas (datos no mostrados). Es posible que durante la aplicación de la técnica de RACE 3' para el gen *PsARF/XYL* el cebador oligodT empleado se haya apareado con estas regiones de alto contenido en adeninas río arriba del sitio de poliadenilación propiamente dicho, dando origen a productos de amplificación de menor longitud o incompletos. De todas formas, las dos variantes de RACE 3' clonadas resultaron idénticas apoyando la idea de que su procedencia es la misma, un único gen y que por lo tanto las dos variantes de ADNc obtenidas son variantes de splicing de *PsARF/XYL*.

A pesar de los diferentes intentos, no se logró clonar exitosamente la regiones 5' UTR específica de 'Vri' (utilizando cebadores reversos complementarios al último intrón en la técnica de RACE 5'), siendo la región 5' UTR informada en esta tesis aquella proveniente del uso de un cebador reverso complementario a una región codificante cercana al extremo 5' (el cebador reverso complementario al intrón generaba productos de PCR más largos con los cuales era más compleja la aplicación de la técnica). Si fuese factible comparar las regiones 5' UTR de las dos secuencias de ADNc y las mismas resultaran idénticas, se contaría con evidencia terminante de que se está en presencia de dos transcritos de un mismo gen, a lo que se procederá ya fuera del marco temporal de esta tesis.

#### **7.4 El gen *PsARF/XYL* de ciruelo japonés codifica una GH de la familia 3 y su estructura es similar a una $\beta$ -glucosidasa putativa de *Ricinus communis***

A partir de la clonación de dos variantes de ADNc y del aislamiento del gen *PsARF/XYL* de *Prunus salicina* 'Gigaglia', se deducen la/las proteína/s predicha/s a partir de sus secuencias. Los análisis en BLAST-NCBI determinan dominios conservados en GHs de la familia 3: por un lado, un dominio catalítico amino terminal y por el otro un dominio putativo de unión a hidrato de carbono COOH-terminal (**Fig. 5.12**). La presencia de un péptido señal de dirección a apoplasto y los dominios proteicos conservados indican que se trataría de una ARF/XYL de pared celular. Las GHs están agrupadas en más de 100 familias basadas en la nomenclatura de la base de datos CAZy, la cual describe familias de módulos relacionados estructuralmente, ya sea con la catálisis o con la unión a hidratos de carbono (Davies y Henrissat, 2005; URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>). La familia 3 de GH agrupa enzimas con especificidad de sustrato diferentes tales como  $\beta$ -glucosidasas, XYLs y ARFs (Tateishi *et al.*, 2005). Las enzimas relacionadas estructuralmente pertenecientes a la misma familia GH pueden tener distintas especificidades de sustrato mientras que una misma enzima puede hidrolizar un conjunto de diversos sustratos (Henrissat, 1991). En base a este último criterio, se han descrito algunas enzimas como 'bifuncionales' debido a su capacidad de hidrolizar dos sustratos, aunque la eficiencia de las hidrólisis sea muy diferente. Durante el transcurso

de esta tesis, otros autores han caracterizado ARF/XYL bifuncionales en forrajes (MsXyl1; Xiong *et al.*, 2007) y en pera (PpARF2; Tateishi *et al.*, 2005), presentando esta última un 89 % de homología con el producto del gen de ciruela japonesa denominado *PsARF/XYL*, clonado en esta tesis.

En general, existe mucha información en bases de datos sobre secuencias de ARNm codificantes de GHs de frutos, pero no así sobre los genes asociados. Esto, en parte, se debe al interés que se ha centrado en el análisis de la expresión de los genes relacionados a la maduración, el cual se lleva a cabo haciendo uso de la información que proviene de regiones codificantes. Probablemente también se deba a las ventajas del uso del ARNm total como material de partida para la clonación de secuencias (presencia de la cola poli(A), moléculas más pequeñas y mayor número de copias por célula para un determinado gen) comparado con el ADN genómico. No obstante, ciertos genes reportados en especies no relacionadas han arrojado niveles de homología que permitieron establecer comparaciones. En particular, el análisis de BLASTn permitió distinguir un gen putativo codificante de una  $\beta$ -glucosidasa periplásmica de *Ricinus communis* cuyos dominios conservados son similares a los del gen *PsARF/XYL* y cuya longitud y distribución de los exones resultó llamativamente similar en ambos casos (**Fig. 5.16**). Aunque aún queda por determinar la región 5' del gen objeto de estudio, es muy posible que se trate de dos genes ortólogos y, dado que se trata de especies no relacionadas, se infiere que el gen ancestral se habría conservado evolutivamente. Los análisis de Southern Blot para el gen homólogo *MdAFase I* permitieron establecer que el mismo se encuentra distribuido como única copia en el genoma de *Malus x domestica* (Goulao *et al.*, 2008). Aunque no se conoce el número de copias del gen *PsARF/XYL* en *Prunus salicina* es muy probable que los ADNc obtenidos provengan del mismo gen dada la similitud de ambas secuencias en la región 3' terminal no traducida (Figura **5.10**).

### **7.5 Las variantes de ADNc *PsARF/XYL* provienen probablemente de transcriptos alternativamente splicados**

La secuenciación de ADN genómico *PsARF/XYL* y su comparación con los ADNc obtenidos permitió establecer que la inserción de 116 pb hallada correspondía al intrón 3' terminal del gen (**Fig. 5.14**). La retención de un intrón en el pre-mRNA podía ser una consecuencia

de SA y no errores de la maquinaria biológica de splicing. Algunos transcritos primarios de ciertos genes son alternativamente spliceados, produciendo diferentes formas de ARN mensajero que codifican proteínas con diferencias funcionales. Ciertos eventos de SA son constitutivos con cocientes similares de ambas variantes de ARN mensajero en diferentes células mientras otros están sujetos a una regulación específica de desarrollo o específica de tejido (López, 1998). En esta tesis, hay evidencias que apoyan la existencia de SA regulado para el gen *PsARF/XYL* dado que la expresión de ambas variantes de ARNm muestra dependencia con el estado de desarrollo o maduración de los frutos (**Figs. 6.3, 6.4 y 6.5**), con los tejidos analizados (**Fig. 6.7**) y con los tratamientos aplicados en postcosecha (**Figs. 6.9 y 6.10**), lo cual constituye una prueba de regulación génica postranscripcional que se postula como la base de los eventos de SA en las células. De hecho, en plantas, se han observado eventos de SA similares a los ocurridos en mamíferos, siendo la retención de intrones el más común de este tipo de procesamientos en las plantas (Wang y Brendel, 2006).

En frutos, se informó la existencia de SA en el gen *PpETR1* de *Prunus persica*, codificante de un receptor de etileno, el cual produce tres transcritos maduros diferentes en su porción 3' (Bassett *et al.*, 2002). En uno de ellos, de traducirse, la retención del intrón terminal resultaría en una proteína truncada deficiente en un dominio conservado. Los análisis de expresión revelaron que sólo hubo leves diferencias en la abundancia de estos ARNm entre cultivares durante el desarrollo del fruto. Sin embargo, uno de los cultivares de maduración tardía mostró un aumento sustancial de la expresión del ARNm no spliceado en frutos pre-climatéricos. Se observaron variaciones en la abundancia de los transcritos *PpETR1* en el fruto mientras que su expresión fue esencialmente constitutiva en hojas.

Los resultados obtenidos por Bassett *et al.* (2002) en duraznos revela que los productos de SA son dependientes del estado de desarrollo o maduración e incluso del tejido analizado, de forma muy similar a lo hallado en esta tesis para el gen *PsARF/XYL*. Sin embargo, no hemos podido encontrar en la bibliografía ejemplos de SA en glicosidasas de pared celular, siendo este el primer caso del que disponemos información.

## **7.6 Los genes *PpARF1* y *PpARF/XYL* de durazno se expresan diferencialmente durante el crecimiento y la maduración del fruto**

Los análisis de la expresión génica de *PpARF1* (clonado en esta tesis) y *PpARF/XYL* de *Prunus persica* (clonado por Hayama *et al.*, 2006) indican que estos genes se encuentran regulados a nivel transcripcional (**Figs. 4.7 a 4.10**). El gen *PpAz152*, el cual posee una marcada identidad de secuencia con *PpARF/XYL*, muestra un patrón de expresión similar dado que sus transcritos se hallaron también en estados tempranos de desarrollo del fruto (Ruperti *et al.*, 2002). Aunque se hallaron divergencias en los niveles de transcritos durante S3 entre *PpARF/XYL* (**Fig. 4.7**) y *PpAz152* (Ruperti *et al.*, 2002), las diferencias pueden ser atribuidas al momento exacto en el cual las muestras fueron obtenidas, dado que la longitud de las fases de desarrollo en el fruto de duraznero 'Springcrest' es diferente en Buenos Aires (donde se realizó esta tesis) y Padua, Italia (donde efectuaron su trabajo Ruperti *et al.*, 2002). Además, en esta tesis, se probó que la actividad de ARF no es uniforme en diferentes regiones del tejido de mesocarpo (**Fig. 4.6**), por lo tanto, la variación en los niveles de transcritos, puede derivar de diferencias en la composición de la muestra. Se ha sugerido que el producto del gen *PpAz152* estaría involucrado en la respuesta a patógenos, sugerencia basada en la expresión del gen en frutos jóvenes y en su característica de ser inducido por heridas. Las proteínas *PpARF1* y *PpARF/XYL*, cuando estén presentes, podrían estar implicadas en respuestas de defensa contra patógenos. Aunque no existe un ejemplo para tal función en frutos, algunos hongos patógenos en plantas tienen polisacáridos ricos en arabinosa y podrían requerirse ARFs para la lisis de sus micelios.

El gen *PpARF1* se expresó durante la maduración (**Fig. 4.8**), como es el caso de sus homólogos de manzana (Goulao *et al.*, 2008), y de pera europea (Sekine *et al.*, 2006). Ruperti *et al.* (2002), mediante Northern blot, encontraron que los transcritos *PpAz152* se acumulan significativamente durante las etapas avanzadas del ablandamiento del fruto y Hayama *et al.* (2006) encontraron niveles crecientes de ARNm homólogo a *PpAz152* durante la maduración. En nuestro estudio, los niveles de transcritos *PpARF1* y *PpARF/XYL* alcanzaron un máximo durante R4 y R5 respectivamente (**Fig. 4.8**), estados en los que se había detectado la mayor actividad de ARFs (**Fig. 4.5**). Esto también coincide con estudios previos donde se observaron en R4 y R5 pérdidas masivas de



arabinosa desde glicanos de matriz unidos débilmente, y un aumento en el contenido de arabinosa polimérica de la fracción soluble en CDTA (Brummell *et al.*, 2001). *PpARF/XYL* fue previamente propuesto como un gen relacionado al ablandamiento, con una acumulación de transcritos coincidente con la producción autocatalítica de etileno en el fruto (Hayama *et al.*, 2006). En esta tesis se verifica que la producción de etileno tiene un pico en R4 y declina levemente en R5 (**Fig. 4.4**), mientras que los niveles máximos de transcritos *PpARF1* y *PpARF/XYL* se alcanzan durante R4 y R5 respectivamente (**Fig. 4.8**). Estos resultados podrían implicar una respuesta de los genes de estudio al etileno. Sin embargo, para probar la participación directa del etileno, se requieren experimentos con etileno o algún compuesto análogo, y con inhibidores de la acción del etileno (como por ejemplo 1-MCP o tiosulfato de plata, siendo que el 1-MCP no presenta una eficiencia elevada en durazno). Por otro lado, nuestros resultados muestran que la acumulación de transcritos *PpARF1* y *PpARF/XYL* en el fruto comienza antes del pico climatérico (**Fig. 4.7**). Además, la mayor acumulación de transcritos *PpARF1* ocurre en S2 y la de *PpARF/XYL* en S3 temprano, incluso cuando los niveles de etileno son tan bajos como  $0,05 \mu\text{L kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ , sugiriendo por lo tanto que la transcripción de estos genes podría estar regulada por otros factores distintos al etileno. Los resultados presentados no contradicen la hipótesis de una eventual respuesta por parte de *PpARF/XYL* a la acción del etileno, pero sugieren que la expresión podría depender además de otros factores. Previamente se ha sugerido un importante rol de las auxinas durante la maduración de durazno, así como una interrelación entre las auxinas y el etileno (Trainotti *et al.*, 2007). Esta interacción entre auxinas y etileno fue avalada por experimentos de microarreglos que demuestran cambios significativos en la transcripción durante el comienzo de la maduración y un efecto del 1-MCP sobre la expresión de ciertos genes relacionados al metabolismo de las auxinas (Ziliotto *et al.*, 2008). Aunque en esta tesis no se realizaron experimentos para examinar la respuesta sobre la transcripción de los genes *PpARF/XYL* y *PpARF1* a la aplicación de auxinas, se probó con anterioridad que diferentes ARFs resultan moduladas por auxinas de síntesis en otros sistemas, como es el caso de discos de pericarpo de tomate (Sozzi *et al.*, 2002b) y de callos de manzana (Alayón-Luacés *et al.*, 2008).

### ***7.7 La expresión de los genes PpARF1 y PpARF/XYL de durazno y de sus homólogos en ciruelo japonés varía con la localización del tejido en el fruto***

Los frutos carnosos, sobre todo durante la madurez, constituyen un material biológico marcadamente variable en cuanto a sus parámetros de ablandamiento, de color y en general de todas sus características físico-químicas. Debido a esto, resultó de particular interés evaluar las diferencias relativas de expresión de los genes de estudio entre diferentes tejidos del fruto. Se consideró importante esta evaluación a la hora de realizar análisis de la expresión génica para comparar adecuadamente entre frutos de diferente estado o procedencia. Todos los genes analizados, tanto de ciruela como de durazno, adoptaron patrones de expresión similares, mostrando variaciones en los niveles de transcriptos entre los tejidos del fruto. La expresión máxima se halló en todos los casos en el mesocarpo interno, encontrándose un mínimo en el mesocarpo externo y una expresión intermedia en el epicarpo, tanto en durazno (**Fig. 4.9**) como en ciruela japonesa (**Fig. 6.6**).

La división celular continúa por un largo período de tiempo en la epi- e hipodermis, debido a la expansión del fruto y a su crecimiento en diámetro. Esto puede explicar parcialmente la mayor acumulación de los transcriptos en la piel respecto del mesocarpo externo. Debido a que el mesocarpo de los frutos contiene al menos dos diferentes tejidos y a que estos muestran una marcada diferencia en la expresión de los genes de interés, es factible que distintos macrodominios revelen un metabolismo de polisacáridos diferente en la pared celular. De hecho cuando la piel es separada, la homogeneización del mesocarpo entero podría enmascarar cambios sutiles asociados con el ablandamiento o la maduración dentro de tipos de tejidos específicos. Aunque en este estudio no fue seguido el patrón de expresión espacial durante el ablandamiento y la maduración, es posible que los duraznos maduros posean tejidos con distinto grado de ablandamiento y con diferentes patrones de expresión para *PpARF1* y *PpARF/XYL* dado que el ablandamiento normalmente comienza en el interior del fruto y procede hacia el exterior. La exposición de duraznos al etileno o a sus análogos es un tratamiento de rutina en protocolos de laboratorio, dado que el etileno difunde rápidamente dentro de los tejidos del fruto. Sin embargo, no se puede descartar que los frutos tratados con

etileno puedan mostrar ciertos cambios en su patrón de expresión con mayor acumulación de transcritos *PpARF/XYL* en el mesocarpo externo al compararlos con frutos no tratados maduros. En otros frutos climatéricos como el tomate se encontraron niveles de poligalacturonasa –otra enzima de pared cuya transcripción es dependiente del etileno– más elevados en la zona central (columela), atribuibles a que el ACC y la enzima ACC sintasa se acumulan mucho más rápidamente en el sector central del fruto que en el pericarpo externo durante las etapas tempranas de la maduración (Tieman y Handa, 1989). Como consecuencia, la síntesis de etileno de la zona central de los frutos parece preceder a la de otras zonas. Si bien el etileno es un gas que difunde rápidamente de unos tejidos del fruto a otros, también podría haber diferencias entre tejidos en cuanto a la sensibilidad al etileno.

### **7.8 Los genes *PpARF1* y *PpARF/XYL* y sus homólogos de ciruelo japonés se expresan en tejidos vegetativos y reproductivos**

Tanto los genes *PpARF1* y *PpARF/XYL*, como sus homólogos en ciruelo japonés (*PsARF1* y *PsARF/XYL*) se expresaron de forma variable en otros tejidos de la planta diferentes al fruto (Figs. 4.10 y 6.7). Ruperti *et al.* (2002) detectaron ARNm correspondiente a *PpAz152* en flores en todos los estados de desarrollo y durante la senescencia de las hojas. Aunque la expresión de los genes analizados no resultó específica de fruto, no se descarta su desempeño potencial en el ablandamiento del mismo, tal como ocurre con el gen de tomate codificante de la enzima  $\beta$ -galactosidasa II (Smith *et al.*, 1998).

Las proteínas *PpARF1* y *PpARF/XYL*, cuando estén presentes, podrían estar implicadas en procesos de crecimiento y ablandamiento del fruto, aunque el contenido de arabinosa de la pared celular no cambie significativamente durante el crecimiento (Brummell *et al.*, 2004) lo cual sugiere una reorganización de pectinas y/o glicanos de matriz dentro de la pared celular más que su movilización desde la misma. Por otra parte, aunque *PpARF/XYL* fue previamente propuesto como un gen relacionado al ablandamiento del fruto cuyo ARNm se acumula en coincidencia con la producción autocatalítica de etileno del fruto (Hayama *et al.*, 2006), nuestros resultados sugieren que la acumulación de transcritos de *PpARF1* y *PpARF/XYL* comienza antes del climaterio. Más aún, ambos genes se expresan en diferentes tiempos de desarrollo y órganos vegetales incluso

cuando los niveles de etileno son casi imperceptibles, sugiriendo que la transcripción de estos genes estaría regulada por otros factores distintos del etileno. De hecho, tanto las rutas metabólicas dependientes como las independientes del etileno son operativas en frutos maduros de duraznero. Los resultados presentados aquí no contradicen la posible respuesta del gen *PpARF/XYL* al etileno (Hayama *et al.*, 2004) pero sí sugieren una expresión independiente del etileno, tal como previamente fuera descrito para el gen *PpAz152* (Ruperti *et al.*, 2002).

### **7.9 Las dos variantes de ARNm del gen *PsARF/XYL* se expresan durante el crecimiento del fruto y en otros tejidos**

Los análisis de expresión durante el crecimiento de la ciruela japonesa indicaron que los dos tipos de transcritos del gen *PsARF/XYL* se expresan durante todo el crecimiento del fruto a niveles variables, con una única excepción en los frutos de 49 Ddpf que se encuentran en el inicio de la fase de crecimiento exponencial y en los cuales solo se detectó de forma considerable la variante totalmente splicada 'Vn' (**Fig. 6.3**). Los cambios en la solubilización, despolimerización y composición de los polisacáridos de las paredes celulares de 'Gigalia' durante el desarrollo fueron descritos recientemente (Ponce *et al.*, 2010). En frutos preclimáticos de 73 días de edad, los autores observaron una importante pérdida de arabinosa de la fracción de pared enriquecida en pectinas unidas covalentemente, siendo la arabinosa el principal azúcar neutro y el de comportamiento más dinámico durante el crecimiento junto con la galactosa. En esta tesis, durante el transcurso de la fase S3, se detectó un aumento notable y progresivo de la variante que retiene intrón 'Vri' mientras los transcritos totalmente splicados se expresaron prácticamente de forma similar durante esta fase (**Fig. 6.3**). De hecho, la expresión de 'Vri' resultó entre 3 y 4 veces mayor que la expresión de 'Vn' en frutos preclimáticos de 65 y 72 Ddpf (**Fig. 6.4**). Dado que las pérdidas masivas de arabinosa provienen de las fracciones enriquecidas en pectinas y no de los glicanos de matriz, Ponce *at al.* (2010), postulan que enzimas con actividad de ARF y ARF/XYL serían responsables de la despolimerización de las cadenas laterales de los ramnogalacturonanos, ricas en arabinosa. Si bien no se cuenta con evidencias referidas a la funcionalidad de las proteínas (aunque detectamos su transcritos mediante RT-PCR y

RACE 3', no tenemos pruebas de su asociación a polirribosomas ni sus productos fueron sometidos a detección con anticuerpos mediante western Blot), ni a su acción sobre sustratos *in vivo*, la correlación temporal de la expresión génica sugiere que la pérdida de arabinosa de las fracciones enriquecidas en pectinas podría ser llevada a cabo por las proteínas codificadas por los transcritos de *PsARF/XYL*.

Por otro lado, aunque la expresión de ambas variantes de splicing tuvo cierta variación durante el crecimiento de los frutos, no se observaron patrones de expresión excluyentes donde se exprese únicamente una variante y no la otra o viceversa. Resultados similares se hallaron en otros tejidos donde los cocientes de expresión 'Vri'/Vn' resultaron cercanos a la unidad (**Figs. 6.7 y 6.8**). Esto podría indicar que, o bien la variante que retiene intrón es improductiva durante el desarrollo del fruto y en órganos vegetativos y reproductivos - por lo que actuaría "apagando" la expresión de la proteína *PsARF/XYL* funcional - o que ambos transcritos dan origen a proteínas cuyas función es requerida durante todo el desarrollo del fruto e incluso en otros tejidos diferentes. La regulación precisa de las isoformas de splicing es probablemente requerida para la correcta función en la que se hallan implicadas, como se ve ilustrado en ciertas enfermedades humanas cuyo origen es la alteración del cociente entre dos proteínas, productos de SA, a partir de un gen único (Roberts y Smith, 2002). Por otro lado, se ha postulado que la producción de transcritos 'sin sentido' tiene valor en la regulación postranscripcional negativa de algunos genes dado que estos transcritos 'aberrantes' son enviados a degradación por poseer codones de terminación prematuros (NMD), modulando los niveles de proteína funcional presente en determinadas condiciones celulares. Además se han presentado evidencias de la existencia de un acoplamiento entre SA y NMD (Lewis *et al.*, 2003). Los genes spliceados alternativamente podrían generar algunas isoformas que son candidatas a NMD y otras que se traducen normalmente. Al acoplar SA con NMD, una célula puede regular negativamente la expresión de un gen bajo condiciones específicas. En estos casos no es importante la forma en que el SA afecta la región codificante de un transcrito sino el hecho de que lo 'marca' y direcciona a su degradación por NMD, constituyendo una nueva forma de regulación postranscripcional. A este tipo de regulación se la ha denominado RUST ('Unproductive Splicing and Translation'; Lewis *et al.*, 2003). Aunque NMD ha sido descubierto en mamíferos actualmente se sabe que el mismo es extensivo

a todos los eucariotas, entre ellos las plantas (Kertész *et al.*, 2006). No se descarta que los transcritos de *PsARF/XYL* que introducen un codón de terminación prematuro debido a SA, puedan ser sujetos de degradación por NMD y actúen regulando negativamente la cantidad de proteína funcional *PsARF/XYL*.

### **7.10 La variante totalmente splicada de ARNm del gen *PsARF/XYL* se induce durante el climaterio y al aplicar etileno**

Ni durante el climaterio de ciruela japonesa ni al aplicar etileno en condiciones saturantes sobre frutos pre-climatéricos, se lograron detectar los transcritos 'Vri' de forma considerable mediante la técnica de RT-PCR (Figs. 6.5, 6.9 y 6.10). La sensibilidad de la técnica permite establecer que existe cierta expresión de la variante que retiene intrón durante el climaterio (cebadores F2-Rintro, Fig. 6.5), sin embargo, al compararla con la obtenida durante el crecimiento (Fig. 6.3), se observa que la expresión es despreciable durante la maduración. De hecho, la misma es absolutamente indetectable en frutos maduros al utilizar cebadores F2-R3, que amplifican las dos variantes de ADNc (Fig. 6.5). Los frutos tratados con 1-MCP durante 24 h mostraron una expresión de 'Vn' relativamente mayor que los frutos 'control 24 h' (Fig. 6.9 B y Fig 6.10). Aunque estos resultados parecen contradecir el papel presunto del etileno en la inducción de 'Vn', dado que en este caso sería de esperar menor o igual expresión de 'Vn' en frutos tratados con 1-MCP que en frutos 'control 24', se hipotetiza que los frutos de ambos tratamientos producen muy poco etileno; los resultados observados podrían deberse a variaciones de los cocientes 'Vri'/Vn' en los frutos pre-climatéricos de 72 Ddpf y, en tal caso, los resultados no serían atribuibles al tratamiento. Alternativamente, el 1-MCP podría haber afectado la normal síntesis de etileno, ya que algunos genes codificantes de ACC sintasa pertenecientes al llamado "Sistema 1" de producción de etileno (activos durante la fase "vegetativa" del crecimiento del fruto) responden a un mecanismo de retroalimentación negativa, y no positiva (Barry *et al.*, 2000). Sin embargo podemos destacar, que el procesamiento alternativo de los transcritos *PsARF/XYL* se ve afectado a las pocas horas del tratamiento con etileno y que el mismo favorece el splicado completo de los transcritos ya que fue imposible detectar la variante de ADNc que retiene intrón con la técnica utilizada. Los resultados sugieren que la transición de los

frutos de la última 'fase de crecimiento' a la 'fase de maduración' trae aparejada la inducción de la variante de ARNm totalmente splicada (funcional) cuya acción sería requerida para el metabolismo de los hidratos de carbono de la pared celular. Durante la maduración de los frutos de 'Gigaglia' ocurre una importante solubilización y despolimerización de pectinas unidas iónicamente y una importante pérdida de arabinosa (Ponce *et al.*, 2010). El presunto papel de *PSARF/XYL* -variante 'vn'- durante la maduración podría involucrar la liberación de arabinosa de sustratos específicos, como es el caso de las pectinas unidas iónicamente a la pared celular, siendo la acción de 'Vri' preponderante durante el crecimiento y, en particular, durante la etapa S3, cuando ocurre la mayor pérdida de arabinosa desde pectinas unidas covalentemente (Ponce *et al.*, 2010). De hecho, la forma de ARNm con intrón parece estar regulada negativamente durante esta etapa final del fruto. Es posible que dicha regulación se produzca por la presencia del etileno, dado que la expresión 'Vri' deja de ser considerable a las pocas horas de aplicación de esta hormona (**Fig. 6.10**), mientras hallamos una expresión muy exacerbada de 'Vn' frente a los mismos tratamientos.

Las células pueden cambiar los patrones de SA en respuesta a una señal, lo que crea diferentes variantes de una proteína con diferentes propiedades biológicas. La selección de los sitios alternativos de splicing parece ser la clave en la regulación del proceso y se rige por la dinámica de la formación de complejos de proteínas en los pre-ARNm. Se ha postulado que diferentes quinasas y fosfatasa actuarían regulando las proteínas de reconocimiento de los sitios de splicing en el pre-ARNm (Stamm, 2007). En esta tesis se halló una correlación positiva entre los niveles de etileno endógeno durante el climaterio de los frutos y la expresión diferencial de una de las variantes de splicing, aquella totalmente splicada. Así mismo, se halló que esta variante se induce fuertemente a las pocas horas de la aplicación de etileno en condiciones saturantes. Existe un antecedente que avala la hipótesis de que el etileno puede modificar patrones de splicing. Se trata del gen *PK12* de tabaco, codificante de una proteína-quinasa de la familia LAMMER, el cual se identificó mediante una búsqueda diferencial de transcritos inducidos por etileno (Sessa *et al.*, 1996). Los autores encontraron que la aplicación de etileno en hojas de tabaco induce fuertemente la acumulación de transcritos de *PK12* así como también la actividad de quinasa *PK12*. Esta quinasa, a su vez, media la fosforilación de factores de splicing SR, cuya actividad influye sobre los patrones de

splicing constitutivos y alternativos de los pre-ARNms blanco (Savaldi-Goldstein *et al.*, 2000). Las formas estructurales de las proteínas SR, su localización y la interacción entre ellas y con otros componentes del spliceosoma sugieren fuertemente que están involucradas en eventos tempranos del ensamblado del spliceosoma y en la selección del sitio de splicing (Reddy, 2004). En *Arabidopsis thaliana* se vió que la sobreexpresión de *PK12* de tabaco altera el patrón de splicing de genes endógenos y causa defectos en el desarrollo (Savaldi-Goldstein *et al.*, 2003). En base a nuestra información y a los antecedentes reseñados, hipotetizamos que el etileno podría constituir una señal que genera cambios en proteínas regulatorias de splicing de *Prunus salicina* afectando en este caso los patrones de SA del gen *PsARF/XYL*.

### **7.11 *PsARF1* es regulado negativamente por etileno en condiciones saturantes**

Los niveles de los transcritos de *PsARF1* de 'Gigaglia' disminuyen drásticamente al aplicar etileno durante 24 h en condiciones de saturación siendo prácticamente indetectables en los frutos tratados mediante la técnica de RT-PCR. El efecto negativo del etileno sobre la expresión este gen, no se observa ni en frutos control (frutos con una producción de etileno indetectable mediante cromatografía gaseosa), ni en frutos tratados con 1-MCP durante 24 h (**Figs. 6.9 y 6.10**). Además, los transcritos *PsARF1* mostraron una disminución rápida frente a la aplicación de etileno (notable a las 3 h y 6 h de la aplicación, **Fig. 6.10**). Al aplicar 1-MCP durante 24 h, la expresión de *PsARF1* fue similar al control. Esto posiblemente se deba a que la cantidad endógena de etileno en los frutos pre-climatéricos, indetectable mediante cromatografía gaseosa pero probablemente presente a niveles basales, no sea suficiente para la regulación negativa del gen *PsARF1*. Al comparar lo obtenido en 'control 24 h' y 'etileno 24 h' para el gen *PsARF1* notamos que la expresión del gen se encuentra negativamente regulada por etileno. Esto podría explicar la disminución de los transcritos de *PsARF1* en frutos M3 (con respecto a los frutos M2 o M4) ya que son los mayores productores de etileno. Itai *et al.* (2003), clonaron y caracterizaron el gen *LeARF1* de tomate el cual presenta un importante porcentaje de homología con la secuencia parcialmente clonada en esta tesis



correspondiente al gen *PsARF1* de ciruela. El gen *LeARF1* se expresa significativamente durante el desarrollo de tomate pero disminuye notablemente durante la maduración; sin embargo la acumulación de sus transcritos se restaura al aplicar sobre los frutos 1-MCP, inhibidor de la acción del etileno, por lo que los autores postulan que la expresión del gen *LeARF1* estaría regulada negativamente por esta hormona.

En esta tesis, los frutos expuestos a 3 h y 6 h de etileno mostraron una acumulación de transcritos *PsARF1* menor a los frutos control pero fácilmente detectable (**Fig. 6.10**), al igual que en frutos de grado de ablandamiento M3 – pico en la producción de etileno endógeno-, donde la expresión del gen fue relativamente menor que en otros frutos maduros pero igualmente significativa (**Fig. 6.5**). A pesar del importante efecto negativo en la expresión del gen *PsARF1* al aplicar 24 h de etileno en postcosecha sobre frutos pre-climatéricos, los transcritos *PsARF1* se detectan tanto durante el desarrollo normal de los frutos (**Fig. 6.3**) como durante la maduración (**Fig. 6.5**), cuando los tejidos producen niveles de etileno mensurables (**Figs. 6.1 y 6.2**). Según lo expuesto, es muy probable que la expresión del gen *PsARF1* se vea regulada negativamente por el etileno al igual que el gen *LeARF1* pero que el umbral necesario para la represión total del gen sea más alto que los niveles de producción de etileno climatérico máximos alcanzados por los frutos de *Prunus salicina* ( $< 10 \text{ nL g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ).

### **7.12 El gen *PsARF/XYL* podría codificar proteínas activas con diferente afinidad al sustrato o ser regulado negativamente por SA**

La hidrólisis enzimática de las uniones glicosídicas toma lugar vía catálisis ácida, la cual requiere dos restos esenciales: un dador de protones y una base nucleófila (Davies y Henrissat, 1995). Algunas GH tienen una estructura modular que consiste de un dominio catalítico y uno o más dominios no catalíticos, alguno de los cuales están involucrados en la unión al sustrato, pero la mayoría de ellos son de función desconocida (Davies y Henrissat, 1995). Salvo raras excepciones, los dos aminoácidos catalíticos identificados fueron los restos de aspartato y glutamato.

Itai *et al.* (1999) describieron la enzima JPRXYL (que presenta una alta identidad de secuencia con *PsARF/XYL*) y determinaron que JPRXYL contiene un resto de aminoácido

(Asp-292 en el contexto SDC) correspondiente al primer sitio activo de la familia  $\beta$ -glucosidasa, el cual se encuentra conservado en microorganismos (*Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger*). En el año 2003, Lee RC *et al.*, caracterizaron una GH de la familia 3 de cebada (ARA-I acc: AY029259) con actividad de ARF y de XYL (bifuncional). De nuevo, hallaron el resto Asp en la posición 275 como nucleófilo catalítico putativo y Glu-481 como ácido/base catalítico putativo en el contexto DQSIERE. En esta tesis se observan los dos aminoácidos del sitio activo probables en las secuencias 'Vri' y 'Vn' de la proteína PsARF/XYL (**Fig. 5.19**). La porción proteica COOH-terminal faltante en 'Vri' forma parte de un dominio conservado en GHs de la familia 3 que ha sido involucrado en la unión a hidrato de carbono (Varghese *et al.*, 1999). Se ha establecido a partir de estructuras tridimensionales que estas enzimas contienen dos dominios. Un bolsillo está presente en la interfase de los dos dominios donde se encuentran los aminoácidos del sitio activo putativo (Asp285 y Glu491). El bolsillo en la interfase de los dos dominios es probablemente el sitio activo de enzima. Dado que los aminoácidos del sitio activo provienen de ambos dominios, la actividad podría estar regulada a través de la disposición espacial de estos dos dominios. Además hay sitios en el segundo dominio que pueden permitir la unión a hidratos de carbono. Este sitio de unión no catalítico a hidratos de carbono se postuló que podría tener como función el anclaje de la enzima a la pared celular. Los aminoácidos del sitio activo se conservan en ambas variantes aunque se observa truncado el dominio COOH cuya función putativa es la unión a hidratos de carbono.

En esta tesis se ha descrito el aislamiento y la caracterización del gen *PsARF/XYL* de *Prunus salicina*, el cual genera dos formas diferentes de transcritos alternativamente spliceados. Aunque no se tiene evidencia directa de la producción de estas proteínas en frutos, la deducción de las secuencias proteicas a partir de los dos transcritos indica que, de traducirse, podría tratarse de dos isoenzimas funcionales. El procesamiento alternativo del pre-ARNm puede generar isoformas proteicas con diferentes propiedades biológicas, ya sea generando cambios en las interacciones proteína-proteína, en la localización subcelular o en la capacidad catalítica (Stamm, 2007). De traducirse, los transcritos 'Vri' podrían generar proteínas con una capacidad catalítica alterada debido a un menor acceso al sustrato.

Por otro lado, se ha visto que el SA puede estar acoplado a mecanismos de degradación de transcritos 'incorrectos' como por ejemplo aquellos que poseen codones de terminación prematuros (Smith y Valcarcel, 2000). Queda por determinar si los transcritos *PsARF/XYL* dan origen a proteínas funcionales y, de ser así, en qué radica la diferenciación funcional entre ambas. Alternativamente, el gen *PsARF/XYL* podría estar sujeto a eventos de splicing improductivos cuyos transcritos son enviados a degradación como parte de una estrategia de regulación genética aún no dilucidada en ninguna glicosidasa de pared celular conocida.

## CAPÍTULO 8

---

### Consideraciones finales

En las últimas décadas la biología molecular se ha aplicado al conocimiento del proceso de crecimiento y maduración de los frutos centrándose principalmente en la clonación y caracterización de genes relacionados a dicho proceso. Los genes codificantes de enzimas de pared celular y aquellos implicados en la biosíntesis/regulación del etileno han sido preponderantemente los objetos de estudio. En la mayoría de los casos, se han buscado correlaciones positivas entre los parámetros que caracterizan a los frutos maduros – deseables para el consumo humano, pero también más perecederos – y los niveles de expresión de los genes estudiados. Para ello se recurre a la búsqueda de los transcriptos más abundantes en frutos con estas características que potencialmente puedan clasificarse como ‘genes de la maduración’. Aunque se ha avanzado en el estudio de las glicosidasas de pared celular acentuando su relevancia durante el ablandamiento, cada vez resulta más notoria la redundancia funcional de estas enzimas y la necesidad de una acción concertada entre ellas para explicar un mismo fenómeno. Algunos genes implicados en la maduración conforman familias multigénicas que se expresan diferencialmente durante el desarrollo y la maduración o frente a tratamientos de postcosecha de aplicación comercial. En ciertas ocasiones se han denominado o presentado como ‘isoformas’ siendo su origen difícilmente comprensible dado que muchas veces el término hace alusión a la imposibilidad de correlacionar positivamente actividades enzimáticas y la expresión de algunos genes.

En esta tesis se ha avanzado sobre el conocimiento acumulado hasta la fecha en lo que respecta a la clonación de genes de maduración y su caracterización transcripcional en Prunoideas y en particular de ciruelo japonés, del que se disponen relativamente escasos antecedentes. Entre los resultados obtenidos se destaca esta suerte de expresión ‘universal’ de los genes estudiados en todos los tejidos y momentos de desarrollo, mientras sus homólogos en especies relacionadas han sido clasificados por sus autores como ‘específicos de frutos’ o ‘específicos de la maduración’. La existencia de eventos de SA tiene pocos ejemplos en frutos y ninguno conocido en enzimas de pared celular. Este

podría ser el primer ejemplo en frutos donde se ponga de relieve que la complejidad de un proceso programado y regulado como la maduración -implicando numerosas proteínas que actúan concertadamente- pueda provenir de un número reducido de genes regulados postranscripcionalmente mediante splicing alternativo. Por último, podemos destacar el papel del etileno en la regulación de los eventos de splicing alternativo en glicosidasas de pared celular, donde una vez más se destaca la importancia de esta hormona en la maduración de los frutos climatéricos.

## Referencias

---

- Abdi N**, Holford P, McGlasson WB, Mizrahi Y (1997). Ripening behaviour and responses to propylene in four cultivars of Japanese type plums. *Postharvest Biology and Technology* 12: 21-34.
- Alayón-Luacés P**, Pagano EA, Mroginsky LA, Sozzi GO (2008). Four Glycoside Hydrolases are differentially modulated by auxins, cytokinins, abscisic acid and gibberellic acid in apple fruit callus cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 93(3): 257-263.
- Altschul SF**, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- Aspinall GO** (1980). Chemistry of cell-wall polysaccharides. En *'The biochemistry of plants'*, Preiss J (ed) 3: 473-500.
- Baron-Epel O**, Gharyal PK, Schindler M (1988). Pectins as mediators of wall porosity in soybean cells. *Planta* 175: 389-95.
- Bassett CL**, Artlip TS, Callahan AM (2002). Characterization of the peach homologue of the ethylene receptor, *PpETR1*, reveals some unusual features regarding transcript processing. *Planta* 215: 679-688.
- Bergt SM** (1995). Exon definition in vertebrate splicing. *Journal of Biological Chemistry* 270: 2411-2414.
- Bleecker AB**, Kende H (2000). Ethylene: A Gaseous Signal Molecule in Plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16: 1-18.
- Bolaños JF**, Rodríguez R, Guillen R, Jimenez A, Heredia A (1995). Activity of cell wall associated enzymes in ripening olive fruit. *Physiologia Plantarum* 93(4): 651-658.
- Bonghi C**, Ferrarese L, Ruperti B, Tonutti P, Ramina A (1998). Endo- $\beta$ -1,4-glucanases are involved in peach fruit growth and ripening and regulated by ethylene. *Physiologia Plantarum* 102: 346-352.
- Boothby D** (1980). The pectic components of plum fruits. *Phytochemistry* 19: 1949-1953.
- Boothby D** (1983). Pectic substances in developing and ripening plum fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 34: 1117-1122.

- Bouranis DL**, Niavis CA (1992). Cell wall metabolism in growing and ripening stone fruits. *Plant & Cell Physiology* 33: 999-1008.
- Brice RE**, Morrison IM (1982). The degradation of isolated hemicellulose and lignin-hemicellulose complexes by cell-free rumen hemicellulases. *Carbohydrate Research* 101: 93-100.
- Brown RM Jr**, Saxena IM, Kudlicka K (1996). Cellulose biosynthesis in higher plants. *Trends in Plant Science* 1: 149-55.
- Brown JWS**, Simpson CG (1998). Splice site selection in plant preRNAm splicing. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 77-95.
- Brummell DA**, Labavitch JM (1997). Effect of antisense suppression of endopolygalacturonase activity on polyuronide molecular weight in ripening tomato fruit and in fruit homogenates. *Plant Physiology* 115: 717-725.
- Brummell DA**, Harpster MH (2001). Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 47: 311-340.
- Brummell DA**, Dal Cin V, Crisosto CH, Labavitch JM (2004). Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *Journal of Experimental Botany* 55: 2029-2039.
- Brummell DA** (2006). Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biology* 33: 103-119.
- Campbell MA**, Haas BJ, Hamilton JP, Mount SM, Buell CR (2006). Comprehensive analysis of alternative splicing in rice and comparative analyses with *Arabidopsis*. *BMC Genomics* 7: 327.
- Carpita N**, McCann MC (2000). The cell wall. En '*Biochemistry and Molecular Biology of Plants*', Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL, (Eds.), American Society of Plant Physiologists, Rockville MD: 52-108
- Carpita N**, Tierney M, Campbell M (2001). Molecular biology of the plant cell wall: searching for the genes that define structure, architecture and dynamics. *Plant Molecular Biology* 47: 1-5.
- Chalmers DJ**, Van den Ende B (1975). A reappraisal of the growth and development of peach fruit. *Australian Journal of Plant Physiology* 2: 623-634.

- Cleemput G**, Hessing M, van Oort M, Deconynck M, De Cour JA (1997). Purification and characterization of a  $\beta$ -xylosidase and an endoxylanase from wheat flour. *Plant Physiology* 113: 377-386.
- Coutinho PM**, Henrissat B (1999). Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. En '*Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering*', Gilbert HJ, Davies G, Henrissat B, Svensson B (Eds), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK: 3-12.
- Crisosto CH**, Mitchell FG (2002). Postharvest handling systems: stone fruits. En '*Postharvest Technology of Horticultural Crops*', Kader AA (Ed), 3rd ed, University of California, Agriculture and Natural Resources, Publication 3311, California, USA: 345-352.
- Crisosto CH** (1994). Stone fruit maturity indices: a descriptive review. *Postharvest News and Information* 5(6): 65-68.
- Crosgrove DJ** (1997). Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 13: 171-201.
- Davies G**, Henrissat B (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Current Biology* 3: 853-859.
- Dawson DM**, Melton LD, Watkins CB (1992). Cell wall changes in nectarines (*Prunus persica*): Solubilization and depolymerization of pectic and neutral polymers during ripening and in mealy fruit. *Plant Physiology* 100: 1203-1210.
- Dinesh-Kumar SP**, Baker BJ (2000). Alternatively spliced N resistance gene transcripts: Their possible role in tobacco mosaic virus resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 1908-1913.
- Downs CG**, Brady CJ, Gooley A (1992). Exopolygalacturonase protein accumulates late in peach fruit ripening. *Physiologia Plantarum* 85: 133-140.
- El-Sharkawy I**, Kim WS, El-Kereamy A, Jayasankar S, Svircev AM, Brown DCW (2007). Isolation and characterization of four ethylene signal transduction elements in plums (*Prunus salicina* L.). *Journal of Experimental Botany* 58(13): 3631-3643.
- El-Sharkawy I**, Kim WS, Jayasankar S, Svircev AM, Brown DCW (2008). Differential regulation of four members of the ACC synthase gene family in plum. *Journal of Experimental Botany* 59(8): 2009-2027.
- El-Sharkawy I**, Sherif S, Mila I, Bouzayen M, Jayasankar S (2009). Molecular characterization of seven genes encoding ethylene-responsive transcriptional



- factors during plum fruit development and ripening. *Journal of Experimental Botany* 60(3): 907-922.
- Emanuelsson O**, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of Molecular Biology* 300: 1005-1016.
- Fulton LM**, Cobbett CS (2003). Two  $\alpha$ -l-arabinofuranosidase genes in *Arabidopsis thaliana* are differentially expressed during vegetative growth and flower development. *Journal of Experimental Botany* 54(392): 2467-2477.
- Glover H**, Brady C (1994). Purification of three pectin esterases from ripe peach fruit. *Phytochemistry* 37: 949-955.
- Gniadkowski M**, Hemmings-Mieszcak M, Klahre U, Liu H-X, Filipowicz W (1996). Characterization of intronic uridine-rich sequence elements acting as possible targets for nuclear proteins during premRNA splicing in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Nucleic Acids Research* 24: 619-627.
- Goulao LF**, Cosgrove DJ, Oliveira CM (2008). Cloning, characterisation and expression analyses of cDNA clones encoding cell wall-modifying enzymes isolated from ripe apples. *Postharvest Biology and Technology* 48: 37-51.
- Gross KC**, Sams CE (1984). Changes in cell wall neutral sugar composition during fruit ripening: a species survey. *Phytochemistry* 23: 2457-2461.
- Guillén D**, Sánchez S, Rodriguez-Sanoja R (2010). Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85: 1241-1249.
- Hallett IC**, MacRae EA, Wegrzyn TF (1992). Changes in kiwifruit cell wall ultrastructure and cell packing during postharvest ripening. *International Journal of Plant Science* 153: 49-60.
- Harker FR**, Redgwell RJ, Hallett IC, Murray SH, Carter G (1997). Texture of fresh fruit. *Horticultural Reviews* 20: 121-224.
- Harker FR**, Sutherland PW (1993). Physiological changes associated with fruit ripening and the development of mealy texture during storage of nectarines. *Postharvest Biology and Technology* 2: 269-277.
- Hayama H**, Ito A, Moriguchi T, Kashimura Y (2003). Identification of a new expansin gene closely associated with peach fruit softening. *Postharvest Biology and Technology* 29: 1-10.

- Hayama H**, Shimada T, Fujii H, Ito A, Kashimura Y (2006). Ethylene regulation of softening and softening-related genes in peach. *Journal of Experimental Botany* 57: 4071-4077.
- Henrissat B** (1991). A Classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochemical Journal* 280: 309-316.
- Henrissat B**, Romeu A (1995). Families, superfamilies and subfamilies of glycosyl hydrolases. *Biochemical Journal* 311: 350-351.
- Hebsgaard SM**, Korning PG, Tolstrup N, Engelbrecht J, Rouze P, Brunak S (1996). Splice site prediction in *Arabidopsis thaliana* pre-mRNA by combining local and global sequence information. *Nucleic Acids Research* 24(17): 3439-3452.
- Huber DJ** (1984). Strawberry fruit softening: the potential roles of polyuronides and hemicelluloses. *Journal of Food Science* 49: 1310-1315.
- Huber DJ**, O'Donoghue EM (1993). Polyuronides in avocado (*Persea americana*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits exhibit markedly different patterns of molecular weight downshifts during ripening. *Plant Physiology* 102: 473-480.
- Itai A**, Yoshida K, Tanabe K, Tamura F (1999). A  $\beta$ -D-xylosidase-like gene is expressed during fruit ripening in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Journal of Experimental Botany* 50(335): 877-878.
- Itai A**, Ishihara K, Bewley D (2003). Characterization of expression, and cloning, of  $\beta$ -D-xylosidase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase in developing and ripening tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruit. *Journal of Experimental Botany* 54: 2615-2622.
- Jarvis MC** (1992). Control of thickness of collenchyma cell walls by pectins. *Planta* 187: 218-220.
- Jarvis MC**, Briggs SPH, Knox JP (2003). Intercellular adhesion and cell separation in plants. *Plant, Cell and Environment* 26: 977-989.
- Kader AA**, Mitchell FG (1989). Maturity and quality. En '*Peaches, Plums and Nectarines: Growing and Handling for Fresh Market*', LaRue JH, Johnson RS (Eds), University of California, Publication 3331: 191-196.
- Karakurt Y**, Huber DJ (2002). Cell wall-degrading enzymes and pectin solubility and depolymerization in immature and ripe watermelon (*Citrullus lanatus*) fruit in response to exogenous ethylene. *Physiologia Plantarum* 116: 398-405.

- Kertész S**, Kerényi Z, Mérai Z, Bartos I, Pálffy T, Barta E, Silhavy D (2006). Both introns and long 3'-UTRs operate as cis-acting elements to trigger nonsense-mediated decay in plants. *Nucleic Acids Research* 34(21): 6147-6157.
- Krecic AM**, Swanson MS (1999). hnRNP complexes: composition, structure and function. *Current Opinion in Cell Biology* 11: 363-371.
- Kubo N**, Harada k, Hirai A, kadowaki K (1999). A single nuclear transcript encoding mitochondrial RPS14 and SDHB of rice is processed by alternative splicing: common use of the same mitochondrial targeting signal for different proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 9207-9211.
- Kupferman EM**, Loescher WH (1980). Glycosidase activities and development of peach fruit mesocarp tissues. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 105: 452-454.
- Lee DH**, Kang S, Suh S, Byun JK (2003). Purification and characterization of a  $\beta$ -galactosidase from peach (*Prunus persica*). *Molecules and Cells* 15(1): 68-74.
- Lee RC**, Hrmova M, Burton RA, Lahnstein J, Fincher GB (2003). Bifunctional Family 3 Glycoside Hydrolases from Barley with  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase and  $\beta$ -D-Xylosidase Activity. *The Journal of Biological Chemistry* 278(7): 5377-5387.
- Lelièvre JM**, Tichit L, Dao P, Fillion L, Nam YW, Pech JC, Latche A (1997). Effects of chilling on the expression of ethylene biosynthetic genes in Passe-Crassane pear (*Pyrus communis*, L.) fruits. *Plant Molecular Biology* 33: 847-855.
- Letunic I**, Copley RC, Pils B, Pinkert S, Schultz J, Bork P (2006). SMART 5: domains in the context of genomes and networks. *Nucleic Acids Research* 34: 257-260.
- Lewis BP**, Green RE, Brenner SE (2003). Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 189-192.
- López AJ** (1998). Alternative splicing of pre-ARNm: developmental consequences and mechanisms of regulation. *Annual Review of Genetics* 32: 279-305.
- Lorković ZJ**, Wiczeorek Kirk DA, Lambermon MH, Filipowicz W (2000). Pre-mRNA splicing in higher plants. *Trends in Plant Science* 5(4): 160-167.
- Macknight R**, Bancroft I, Page T, Lister C, Schmidt R, Love K, Wetphal L, Murphy G, Sherson S, Cobbett C (1997). FCA, a Gene Controlling Flowering Time in Arabidopsis, Encodes a Protein Containing RNA-Binding Domains. *Cell* 89: 737-745.

- Manganaris GA**, Vicente AR, Crisosto CH, Labavitch JM (2008). Cell wall modifications in chilling-injured plum fruit (*Prunus salicina* Lindl). *Postharvest Biology and Technology* 48: 77-83.
- Mano S**, Hayashi M, Nishimura M (1999). Light regulates alternative splicing of hydroxypyruvate reductase in pumpkin. *The Plant Journal* 17: 309-320.
- Martínez GA**, Chaves AR, Civello PM (2004).  $\beta$ -Xylosidase activity and expression of a  $\beta$ -xylosidase gene during strawberry fruit ripening. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 89-96.
- McCann MC**, Roberts K (1991). Architecture of the primary cell wall. En 'Cytoskeletal Basis of plant Growth and Form', Lloyd CW (ed.), New York, Academic: 109-129.
- McCollum TG**, Huber DJ, Cantliffe DJ (1989). Modification of polyuronides and hemicelluloses during muskmelon fruit softening. *Physiologia Plantarum* 76: 303-308.
- Mignone F**, Gissi C, Liuni S, Pesole G (2002). Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biology* 3(3): 1-10.
- Mut P**, Bustamante C, Martínez G, Alleva K, Sutka M, Civello M, Amodeo G (2008). A fruit-specific plasma membrane aquaporin subtype PIP1;1 is regulated during strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit ripening. *Physiologia Plantarum* 132(4): 538-551.
- Ner-Gaon H**, Leviatan N, Rubin E, Fluhr R (2007). Comparative Cross-Species Alternative Splicing in Plants. *Plant Physiology* 144: 1632-1641.
- Nielsen H**, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* 10(1): 1-6.
- Ponce NM**, Ziegler VH, Stortz CA, Sozzi GO (2010). Compositional changes in cell wall polysaccharides from Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) during growth and on-tree ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(4): 2562-2570.
- Pressey R**, Avants JK (1973). Separation and characterization of endopolygalacturonase and exopolygalacturonase from peaches. *Plant Physiology* 52: 252-256.
- Ranwala AP**, Suematsu C, Masuda H (1992). The role of  $\beta$ -galactosidases in the modification of cell wall components during muskmelon fruit ripening. *Plant Physiology* 100: 1318-1325.

- Raynal J**, Mourgues J, Conte T (1991). Pectic substances from plum fruits (*Prunus domestica* L.) cv. d'ente. Fractional extraction and general characteristics. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 24(3): 263-265.
- Reddy ASN** (2004). Plant serine/arginine-rich proteins and their role in pre-mRNA splicing. *TRENDS in Plant Science* 9(11): 541-547.
- Redgwell RJ**, Fischer M, Kendal E, MacRae EA (1997). Galactose loss and fruit ripening: high-molecular-weight arabinogalactans in the pectic polysaccharides of fruit cell walls. *Planta* 203: 174-181.
- Roberts GC**, Smith CWJ (2002). Alternative splicing: combinatorial output from the genome. *Current Opinion in Chemical Biology* 6: 375-383.
- Ronen R**, Zauberman G, Akerman M, Weksler A, Rot I, Fuchs Y (1991). Xylanase and xylosidase activities in avocado fruit. *Plant Physiology* 95: 961-964.
- Rose JKC**, Hadfield KA, Labavitch JM, Bennett AB (1998). Temporal sequence of cell wall disassembly in rapidly ripening melon fruit. *Plant Physiology* 117: 345-361.
- Ross NW**, Johnson KG, Braun C, MacKenzie CR, Schneider H (1992). Enzymatic hydrolysis of water-soluble lignin-carbohydrate complexes from *Populus deltooides*: effect of combinations of  $\beta$ -mannanases, xylanase and acetyl xylan esterase. *Enzyme and Microbial Technology* 14: 90-95.
- Ruperti B**, Cattivelli L, Pagni S, Ramina A (2002). Ethylene-responsive genes are differentially regulated during abscission, organ senescence and wounding in peach (*Prunus persica*). *Journal of Experimental Botany* 53: 429-437.
- Savaldi-Goldstain S**, Sessa G, Fluhr R (2000). The ethylene-inducible PK12 kinase mediates the phosphorylation of SR splicing factors. *Plant Journal* 21(1): 91-96.
- Savaldi-Goldstein S**, Aviv D, Davydov O, Fluhr R (2003). Alternative splicing modulation by a LAMMER kinase impinges on developmental and transcriptome expression. *The Plant Cell* 15: 926-938.
- Schuler MA** (1998). Plant pre-mRNA splicing. En 'A Look Beyond Transcription: Mechanisms Determining ARNm Stability and Translation in Plants', Bailey-Serres J, Gallie DR (eds), American Society of Plant Physiologists: 1-19.
- Sekine D**, Munemura I, Gao M, Mitsuhashi W, Toyomasu T, Murayama H (2006). Cloning of cDNAs encoding cell-wall hydrolases from pear (*Pyrus communis*) fruit and their involvement in fruit softening and development of melting texture. *Physiologia Plantarum* 126: 163-174.

- Sessa G**, Raz V, Savaldi S, Fluhr R (1996). Pk12, a plant dual-specificity protein-kinase of the LAMMER family, is regulated by the hormone ethylene. *The Plant Cell* 8: 2223-2234.
- Shackel KA**, Greve C, Lavabitch JM, Ahmadi H (1991). Cell turgor changes associated with ripening in tomato pericarp tissue. *Plant Physiology* 97: 814-816.
- Shallom D**, Belakhov V, Solomon D, Shoham G, Baasov T, Shoham Y (2002). Detailed Kinetic Analysis and Identification of the Nucleophile in  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6, a Family 51 Glycoside Hydrolase. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 43667-43673.
- Shoham YZ**, Schwartz AK, Gat O, Zosim Z, Rosenberg E (1993). Delignification of wood pulp by a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Biodegradation* 3(25): 207-218.
- Simpson GG**, Filipowicz W (1996). Splicing of precursors to ARNm in higher plants: mechanisms, regulation and sub-nuclear organization of the spliceosomal machinery. *Plant Molecular Biology* 32: 1-41.
- Smith W**, Valcarcel J (2000). Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends in Biochemical Sciences* 25: 381-388.
- Smith DL**, Starrett DA, Gross KC (1998). A gene coding for tomato fruit  $\beta$ -galactosidase II is expressed during fruit ripening. Cloning, characterization, and expression pattern. *Plant Physiology* 117: 417-423.
- Sozzi GO**, Fraschina AA, Navarro AA, Cascone O, Greve LC, Labavitch JM (2002a).  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase activity during development and ripening of normal and ACC synthase antisense tomato fruit. *HortScience* 37: 564-566.
- Sozzi GO**, Greve LC, Prody GA, Labavitch JM (2002b). Gibberellic acid, synthetic auxins, and ethylene differentially modulate  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase activities in antisense 1 aminocyclopropane-1-carboxylic synthase tomato pericarp discs. *Plant Physiology* 129: 1330-1340.
- Sozzi GO**, Trincherro GD, Fraschina AA (2003). Delayed ripening of 'Bartlett' pears treated with nitric oxide. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 78: 899-903.
- Sozzi GO** (2007). Fisiología del crecimiento de los frutos. En '*Árboles Frutales: Ecofisiología, Cultivo y Aprovechamiento*', Sozzi GO (ed), Editorial Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina: 307-342.

- Srinivasan C**, Padilla IMG, Scorza R (2005). *Prunus* spp. Almond, apricot, cherry, nectarine, peach and plum. En '*Biotechnology of Fruit and Nut Crops*', Litz RE (Ed), CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK: 512-542.
- Staehelein LA**, Moore I (1995). The plant Golgi apparatus: structure, functional organization and trafficking mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46: 261-288.
- Stamm S** (2007). Regulation of alternative splicing by reversible protein phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 1223-1227.
- Tateishi A**, Kanayama Y, Yamaki S (1996).  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase from cell walls of Japanese pear fruits. *Phytochemistry* 42: 295-299.
- Tateishi A**, Mori H, Watari J, Nagashima K, Yamaki S, Inoue H (2005). Isolation, characterization, and cloning of  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase expressed during fruit ripening of Japanese pear. *Plant Physiology* 138: 1653-1664.
- Taylor MA**, Rabe E, Dodd MC, Jacobs G (1994). Effect of storage regimes on pectolytic enzymes, pectic substances, internal conductivity and gel breakdown in cold stored Songold plums. *The Journal of Horticultural Science* 69: 527-534.
- Thompson JD**, Higgins DJ, Gibson TJ (1994). CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Tieman DM**, Handa AK (1989). Immunocytolocalization of polygalacturonase in ripening tomato fruit. *Plant Physiology* 90: 17-20.
- Tonutti P**, Bonghi C, Ruperti B, Tornielli GB, Ramina A (1997). Ethylene evolution and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene expression during early development and ripening of peach fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 122: 642-647.
- Trainotti L**, Tadiello A, Casadoro G (2007). The involvement of auxin in the ripening of climacteric fruits comes of age: the hormone plays a role of its own and has an intense interplay with ethylene in ripening peaches. *Journal of Experimental Botany* 58: 3299-3308.
- Trincherò GD**, Sozzi GO, Covatta F, Frascina AA (2004). Inhibition of ethylene action by 1-methylcyclopropene extends postharvest life of 'Bartlett' pears. *Postharvest Biology and Technology* 32: 193-204.
- Varghese JN**, Hrmova M, Fincher GB (1999). Three-dimensional structure of  $\beta$ -D-glucan exohydrolase, a family 3 glycosyl hydrolase. *Structure* 7: 179-190.

- Valero C**, Crisosto CH, Slaughter D (2007). Relationship between nondestructive firmness measurements and commercially important ripening fruit stages for peaches, nectarines and plums. *Postharvest Biology and Technology* 44: 248-253.
- Verwoerd TC**, Dekker BMM, Hoekema A (1989). A small scale procedure for rapid Isolation of Plant RNA. *Nucleic Acids Research* 17: 23-62.
- Viikari L**, Ranuae M, Kantelien A, Linko M, Sundquist J (1987). Application of enzymes in bleaching. En '4th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry', EUCEPA, Paris: 151-154.
- Wade NL**, Kavanagh EE, Hockley DG, Brady CJ (1992). Relationship between softening and the polyuronides in ripening banana fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 60: 61-68.
- Wang B**, Brendel V (2006). Genomewide comparative analysis of alternative splicing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(18): 7175-7180.
- Weighardt F**, Biamonti G, Riva S (1996). The roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNP) in RNA metabolism. *BioEssays* 18: 747-756.
- Werneke JM**, Chatfield M, Ogren WL (1989). Alternative mRNA Splicing Generates the Two Ribulosebiphosphate Carboxylase/Oxygenase Activase Polypeptides in Spinach and *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 1: 815-825.
- Xiong J**, Balland-Vanney M, Xie Z, Schultze M, Kondorosi A, Kondorosi E, Staehelin C (2007). Molecular cloning of a bifunctional  $\beta$ -xylosidase/ $\alpha$ -L-arabinosidase from alfalfa roots: heterologous expression in *Medicago truncatula* and substrate specificity of the purified enzyme. *Journal of Experimental Botany* 58(11): 2799-2810.
- Yang SF**, Oetiker JH (1998). Molecular biology of ethylene biosynthesis and its application in horticulture. *Journal of the Japanese Society of Horticultural Science* 67: 1209-1214.
- Zhang N**, Portis AR (1999). Mechanism of light regulation of Rubisco: a specific role for the larger Rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-f. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 9438-9443.
- Ziliotto F**, Begheldo M, Rasori A, Bonghi C, Tonutti P (2008). Transcriptome profiling of ripening nectarine (*Prunus persica* L. Batsch) fruit treated with 1-MCP. *Journal of Experimental Botany* 59: 2781-2791.



**Zuzunaga M**, Serrano M, Martínez-Romero D, Valero D, Riquelme F (2001). Comparative Study of Two Plum (*Prunus salicina* Lindl.) Cultivars during Growth and Ripening. *Food Science and Technology International* 7(2): 123-130.