

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN ISOENZIMAS DE RAMNOGALACTURONANO LIASA DURANTE LA ONTOGENIA DEL FRUTO DE TOMATE (Solanum Iycopersicum L.)

Por:

Eduardo Antonio Trillo Hernández

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACION DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito para obtener el grado de

MAESTRIA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Eduardo Antonio Trillo Hernández, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias

Dr Martin Ernesto Tiznado Hernández Director de Tesis

osals

Dra Rosalba Troncoso Rojas Asesor

Dra Marisela Rivera Domínguez Asesor



Dra María Elena Báez Flores Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

Dr. Pablo Wong González Director General

Agradecimientos

Quiero agradecer a CONACYT por el apoyo económico.

Gracias a CIAD, por brindar la infraestructura necesaria, también un programa competente de posgrado.

Agradezco el apoyo económico del CB-2012-177248 "Función Fisiológica de la Enzima Ramnogalacturonano Liasa en el Comportamiento Postcosecha de Frutos"

Agradezco a Dr. Martin Tiznado, por creer en mi, compartir sus conocimientos, tener paciencia y ser un modelo que inspira alumnos en la ciencia, además de pagar los burros cuando íbamos por las muestras. También agradezco a Dra. Rosalba Troncoso por su orientación incondicional durante el posgrado, agradezco también a Dra. Marisela Domínguez, por su postura, criticas objetivas a lo largo de la investigación y sus conocimientos de ingeniería genética.

A mi familia de laboratorio Heriberto Garcia, Guillermo Berumen, Alelhi Ochoa, Rigel Fernández por estar conmigo y cooperar con la investigación.

También agradezco el apoyo del Dr. Miguel Hernández Oñate, Dr. Alexel Burgara, MC. Ángel Javier y Dra. Mitzuco Danutt que sin su ayuda mi experimento hubiera demorado aún más.

Además agradezco al Laboratorio de Genética y Biología Molecular de Plantas, al Laboratorio de Nutrición Molecular, en especial a la Dra. Maricela Montalvo y a la Dra. Silvia Moya

A mis padres por su apoyo moral, amor y comprensión.

A todos ¡MUCHAS GRACIAS!

Dedicada para mis hermanos Christopher, Mónica y Santiago, que son mi motivación, son los mejores!

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN1
II. ANTECEDENTES4
II.1 El Crecimiento y Desarrollo del Fruto de Tomate Implica Crecimiento por División y Expansión Celular4
II.2 División Celular, Número de Células5
II.2.1 Expansión Celular7
II.3 La Pared Celular del Tomate está Compuesta por Diferentes Estructuras Formadas de Polisacáridos: Celulosa, Hemicelulosa y Pectina7
II.3.1 Celulosa y Hemicelulosa8
II.3.2 Pectinas
II.4 La Pectina es el Componente Funcional más Importante de la Pared Celular
II.5 Se Conoce el Mecanismo Bioquímico de la Enzima Ramnogalacturonano Liasa, sin Embargo es poco lo que se sabe Acerca de sus Funciones Fisiológicas12
II.6 Mecanismo Bioquímico de la Ramnogalacturonano Liasa13
II.6.1 Funciones fisiológicas13
II.7 Existen 15 Genes que Codifican para la Enzima Ramnogalacturonano Liasa en el Genoma del Tomate14
III.HIPOTESIS
IV. OBJETIVOS16
IV.1 Objetivo General
IV.2 Objetivos Específicos16
V. MATERIALES Y METODOS
V.1 Material Vegetal17
V.2 Registro de Unidades Calor17
V.3 Estados de Desarrollo Evaluados18
V.4 Extracción de ARN y Síntesis de ADNc18
V.5 Análisis <i>in-silico</i> de secuencias18
V.6 Diseño de Oligonucleótidos19
V.7 Cuantificación de Expresión Relativa Mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real19
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓNES21
VI.1 Unidades calor por día para el cultivar Rutgers21

VI.2	Análisis in silico de genes ramnogalacturonano liasa activos en fruto 22		
Anális	sis de Homología	22	
Anális	sis de Dominios Funcionales2	24	
VI.3	Extracción de ARN y síntesis de la cadena complementaria2	26	
VI.4 liasa	Diseño especifico de oligonucleótidos para genes ramnogalacturonar 28	10	
VI.5 Solyc de rai	Expresión relativa de los genes Solyc04g076630.2, 04g076660.2.1 y Solyc11g011300.1.1 que codifican para isoenzimas mnogalacturonano liasa	29	
Rang	os dinámicos	30	
Cuan Solyc	tificación de transcritos; Solyc04g076630.2, Solyc04g076660.2.1 y 11g011300.1.1	31	
VIII.	PERSPECTIVAS	,5 36	
IX.	REFERENCIAS	8	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de pared celular propuesto por Nicholas Carpita en 19935
Figura 2. Modelo estructural de homogalacturonano, (Wolf, Hématy et al.
2012)9
Figura 3. Modelo estructural de ramnogalacturonano II, (Wolf, et al. 2012).10
Figura 4. Modelo de ramnogalacturonano I, (Wolf, et al. 2012)10
Figura 5. Estructura terciaria de las enzimas12
Figura 6 Análisis de secuencias de aminoácidos homólogas en
frutos modelo de estudio para genes ramnogalacturonano liasa. (A)
Secuencias homólogas de Solyc04g076660.2.1. (B) Secuencias
homólogas de Solyc04g076630.2 (C) Secuencias homólogas de
Solyc11g011300.1.1. El número en las ramificaciones representa el
porcentaje de interacciones positivas entre las secuencias de
aminoácidos por el pMethod de un total de 1000 interacciones para
cada árbol filogenético23
Figura 7. Análisis de dominios funcionales en secuencias de aminoácidos
para las isoenzimas de ramnogalacturonano liasa activas en fruto
de tomate. Dominio I Rhamnogal_lyase; corresponde al sitio
catalítico. Fn III y CMB-like corresponde a la región funcional de
unión a sustrato. La línea roja corresponde a la secuencia con
denominación péptido señal25
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa, ARN. (A) Marcador de peso
molecular 1 kb plus, (B) 5DDF, (C) 10DDF, (D) 30 DDF, (E) 40 DDF
y (F) Estado Verde Maduro27
Figura 9. RT-PCR semicuantitativa de TIP 41. Amplificación usada como
control en la síntesis de primera cadena. TEST, ensayo en ADNc y
NTC, ensayo en ARN libre de ADN genómico. 1. Marcador de peso
molecular 50 pb. 2, 3 y 4: 5 DDF. 5, 6 y 7: Verde Maduro28
Figura 10. Validación Solyc11g011300 y TIP 41; Validación Solyc04g076660
y PP2Acs; Validación Soly04g07663031
Figura 11. Expresión relativa de Solyc04g076660.2.1 en diferentes etapas de
desarrollo en fruto de tomate Solanum lycopersicum cv Rutgers32

- Figura 12. Expresión relativa de Solyc04g076630.2 en diferentes etapas de desarrollo en fruto de tomate Solanum lycopersicum cv Rutgers ..33
- Figura 13. Expresión relativa de Solyc11g011300.1.1 en diferentes etapas de desarrollo en fruto de tomate Solanum lycopersicum cv Rutgers ...34

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Cuadro Ciclos de PCR con HotStart-IT SYBR Green20
Cuadro 2. Fenología de fruto de tomate Solanum lycopersicum L. cv Rutgers
en base a la fecha y la zona agrícola de Hermosillo, Sonora21
Cuadro 3 Secuencias ramnogalacturonano liasa homólogos en frutos24
Cuadro 4. Oligonucleótidos para genes ramnogalacturonano liasa, diseñados
de acuerdo a la base de datos ITAG 2.3
Cuadro 5. Eficiencias de oligonucleótidos ramnogalacturonano liasa v2 y su
gen de referencia para la medición de transcritos

RESUMEN

Un buen modelo de estudio para evaluar la función fisiológica de las enzimas de pared celular en fruto es el tomate, ya que su genoma se encuentra completamente secuenciado, tiene un fruto carnoso y un ciclo de vida relativamente corto. La pared celular está compuesta por regiones funcionales y estructuralmente diferentes conocidas como celulosa, hemicelulosa y pectina. La pectina es el componente más complejo y está formada por polímeros de homogalacturonano, ramnogalacturonano У ramnogalacturonano I (RG-I). El RG-1 puede ser degradado por la enzima ramnogalacturonano liasa (RGLiasa). El objetivo del presente trabajo fué evaluar la expresión de genes que codifican diferentes isoenzimas de RGLiasa en fruto de tomate Solanum lycopersicum L cv Rutgers durante la ontogenia. Se marcaron flores no polinizadas y se cosecharon frutos de tomate en las etapas de desarrollo de 5, 10, 30 y 40 días después de floración (DDF), verde maduro (VM), cambiante (CAM) y rojo maduro (RM). Se evaluaron los cambios en expresión de los genes Solyc04g076660.2.1, Solyc07g046630.2 y Solyc11g011300.1.1 mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, para lo cual se diseñaron oligonucleótidos en base a las regiones no similares de los genes. Se observaron niveles altos de expresión del gen Solyc04g076660.2.1 en 10 DDF y la etapa VM. El gen Solyc04g076630.2 mostró un ligero aumento de expresión en 30 DDF y RM. Más aún, la expresión más elevada se observó en VM. La expresión del gen Solyc11g011300.1.1 mostró valores muy bajos durante el desarrollo del fruto de tomate y un aumento progresivo desde la etapa VM hasta la etapa RM, donde mostró los niveles de expresión más elevados. Se concluyó que el patrón de expresión de los genes Solyc04g076660.2.1 y Solyc07g046630.2 correlaciona con los estados de desarrollo, donde el fruto se encuentra creciendo mediante expansión celular. Además, la expresión del gene Solyc11g011300.1.1 correlaciona con la pérdida de firmeza que ocurre durante la maduración. Con los datos experimentales generados en este trabajo y datos obtenidos de la literatura, se creó un modelo describiendo la regulación del gen Solyc11g011300.1.1.

xi

Palabras clave: Solanum lycopersicum, pared celular, ramnogalacturonano-

l, ramnogalacturonano liasa

ABSTRACT

An adequate model to study the physiological function of plant cell wall enzymes in fruit is tomato, because the genome sequence is complete, it produces a fleshy fruit and its life cycle is relatively short. The cell wall is made of three different domains known as cellulose, hemicellulose and pectin. Pectin, the most complex domain, is made of homogalacturonan, ramnogalacturonan-II and ramnogalacturonan-I (RG-I). The RG-I can be degraded by the ramnogalacturonan lyase enzyme (RGlyase). The aim of the present work was to evaluate the expression of genes encoding different isoenzymes of RG-lyase. Unpollinated tomate flowers were tagged and tomato fruits at stages of development with 5, 10, 30 and 40 days after anthesis (DAA) as well as mature green (MG), turning (TU) and red ripe (RR). The changes in expression of the genes Solyc04g076660.2.1, Solyc07g046630.2 and Solyc11g011300.1.1 were evaluated by quantitative PCR with oligonucleotides designed against not conserved regions of the genes. It was found large expression level of the gene Solyc04g076660.2.1 at 10 DAA and MG stage. The gene Solyc04g076630.2 showed a slight increase in expression at 30 DAA and RR stage. Further, the highest expression was observed at MG. The expression of the gene Solyc11g011300.1.1 show low levels during the tomato fruit development and increasing levels from MG until RR in which it showed the highest expression level. It was concluded that the expression pattern of the genes Solyc04g076660.2.1 y Solyc07g046630.2 correlates with the stage of development in which the fruit is growing by cell expansion. Besides, the expression of the gene Solyc11g011300.1.1 correlates with the loss of firmness during fruit ripening. With the data generated in the present work and obtained from the literature, it was created a model describing the regulation of expression of the Solyc11g011300.1.1 gene.

Keywords: Solanum lycopersicum, fruit, cell wall, ramnogalacturonan-I and rhamnogalacturonan lyase.

I. INTRODUCCIÓN

Los frutos de tomate se han cultivado en diferentes partes del mundo. El posible origen del fruto está en la región comprendida entre el este de Ecuador y norte de Chile incluyendo la región de las islas Galápagos. México ocupa el tercer lugar como país exportador de tomate, siendo Estados Unidos el país que más importa este fruto. Datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (S., Molina *et al.* 2003) el tomate tiene diferentes usos como fruto fresco, procesado y medicinal. En cuanto al aporte nutricional del fruto de tomate, reportes del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos indican que el tomate contiene las vitaminas A, D, B-12 y B-6, B-1 B-2 y ácido ascórbico y es rico en minerales (Gustavsson, Cederberg *et al.* 2011).

El tomate es un fruto perecedero que puede ser afectado por diversos factores como; plagas, infecciones por hongos y diversas enfermedades las cuales incrementan las pérdidas durante la poscosecha. De acuerdo Barbosa S. *et al.* (2003), en países en desarrollo, las pérdidas poscosecha de frutos frescos varían entre 15 a 60%. Para que estos factores afecten al fruto durante la poscosecha necesitan atravesar una protección externa conocida como la pared celular. La pared celular es uno de los componentes externos de la célula vegetal, que en células perimetrales de diversos frutos se encuentra por debajo de una capa de ceras llamada cutícula. La pared celular no solo le da estructura a la célula, sino también confiere forma, rigidez, además, participa en la respuesta ante diferentes tipos de estrés (Sénéchal, Wattier *et al.* 2014a).

La pared celular está compuesta por diferentes regiones que son estructuralmente diferentes como son celulosa, la cual se encuentra formada por polímeros de glucanos unidos mediante enlace β (1-4); hemicelulosa,

formada por enlaces β (1-4) pero ésta a diferencia de la celulosa se encuentra conformada por glucanos, xilanos y glucomananos (Scheller y Ulvskov 2010) y las pectinas. Este componente es el más complejo de la pared celular primaria en dicotiledóneas y desempeña una función fundamental en el control de la adhesión celular (Naran, Pierce y Mort 2007) y por consecuencia tienen influencia en las propiedades reológicas de la pared (Sénéchal *et al.* 2014a). Por otro lado, existen evidencias experimentales que sugieren que la pared celular cumple una función importante durante la vida postcosecha de los frutos por lo que algunas alteraciones en los polímeros que conforman a la pared celular, ocasionan diferentes respuestas en la célula como expresión de genes, activación del metabolismo secundario, reforzamiento de la pared y la síntesis de especies reactivas de oxigeno (Sénéchal, Wattier *et al.* 2014b).

Una de las principales características de la pared celular de las especies dicotiledóneas son sus características viscoelasticas, las cuales son importantes para sus funciones fisiológicas. Existen varias enzimas que se encargan de modificar a los polímeros que componen a la pared celular, entre las que cabe citar; β -galactosidasa (Sampedro, Gianzo *et al.* 2012), expansinas pectinmetilesterasa (Peaucelle, Braybrook y Höfte 2012), transglicosilasas (Mohler, Simmons y Fry 2013), ramnogalacturonano liasa (Naran *et al.* 2007), entre otras.

Actualmente se conoce el mecanismo bioquímico mediante el cual la ramnogalacturonano liasa (RGLiasa) modifica al ramnogalacguronano I (RG-I) de la pared celular (Ridley, O'Neill y Mohnen 2001), sin embargo la función fisiológica de esta modificación no ha sido elucidada completamente. La RGLiasa se encuentra en la pared de las células vegetales (Yapo Beda M. 2011) y forma parte de las enzimas de algunos hongos (Hamann 2014). El polímero base del RG-I se encuentra formado de una cadena compuesta de disacárido $(1\rightarrow 2)$ a -L-ramnosil- $(1\rightarrow 4)$ a-D repeticiones del ácido galacturónico (Burton, Gidley y Fincher 2010). El RG-I puede estar ramificado por arabinanos, galactanos y arabino galactanos del tipo I y II (Dinand, Excoffier et al. 1997, Ridley et al. 2001). En plantas modelo como A. thaliana, se ha encontrado la presencia de RGLiasa, sin embargo para poder estudiar la función de esta enzima en frutos se utiliza como modelo la planta de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). El presente trabajo tiene como objetivo estudiar el perfil de expresión de los genes que codifican para RGLiasa en diferentes etapas de la ontogenia del fruto de tomate *Solanum lycopersicum* L. variedad Rutgers.

II. ANTECEDENTES

II.1 El Crecimiento y Desarrollo del Fruto de Tomate Implica Crecimiento por División y Expansión Celular

El control del tamaño del fruto es un proceso complejo controlado genéticamente, en este caso nos centraremos en los cambios que ocurren a nivel de la pared celular. Las paredes de las células vegetales son diversas y pueden diferir un poco entre especies, pero a pesar de esta diversidad, la arquitectura de la pared celular consiste de tres partes. Las microfibrillas de celulosa, caracterizadas por ser rígidas se encuentran unidas mediante los polímeros de hemicelulosa. Según el modelo propuesto por Nicholas Carpita (figura 1) la pectina cubre los dos componentes mencionados, así mismo se pueden encontrar proteínas estructurales embebidas en la matriz de polímeros (Wolf, Hématy y Höfte 2012). El crecimiento de la célula depende del equilibrio entre la extensibilidad de la pared celular y la fuerza ejercida por la presión de turgencia de las células. La deformación permanente de la pared celular produce el crecimiento de la célula y este implica alteraciones que se deben a las propiedades viscoelásticas de la pared celular (Wolf *et al.* 2012).

Una gran variedad de fenómenos pueden determinar el tamaño final del fruto de tomate. Algunos autores como Gillaspy, Ben-David y Gruissem (1993) y más recientemente Seymour, Østergaard *et al.* (2013) han desarrollado descripciones de la complejidad de los procesos de división y elongación celular utilizando como fruto modelo al tomate en una línea mutante conocida como "<u>non ripening</u>" (Nor). La fase inicial de la división celular es responsable de la formación del ovario, la cual da paso a la diferenciación del meristemo floral en inflorescencia. La segunda fase de división celular tiene lugar durante la antesis, la cual se inicia con la llegada del polen a los ovarios de la flor

(Bertin N. 2005). Después de que el fenómeno de división celular termina, el fruto de tomate crece por elongación o expansión celular, que es donde los frutos experimentan un aumento de volumen drástico, sin embargo estos procesos pueden variar según el tipo de tejido del fruto. El número de células que conforman al ovario en las primeras dos fases de división celular determinan el tamaño del fruto, ya que durante el proceso de elongación celular el aumento de volumen es similar en todas las células que conforman al fruto (Fanwoua, de Visser *et al.* 2013).



Figura 1. Modelo de pared celular propuesto por Nicholas Carpita en 1993

II.2 División Celular, Número de Células

La división de una célula crea dos o varias células con características similares a la célula original, capacidad que pierden conforme los ciclos de división aumentan (mientras más células son, cada ciclo disminuyen las células que pueden dividirse) (Bertin, Génard y Fishman 2003). La división celular activa en el pericarpio es limitada a un periodo inicial que comprende de 10 a 14 días después de que ocurre la polinización (De Jong, Mariani y Vriezen 2009), iniciando el crecimiento del fruto, sin embargo este se divide en secciones de división y elongación celular, que ocurren en orden después de antesis¹ (Coombe 1976, Bertin N 2005). Los fenómenos que causan las diferencias en el proceso de división celular no son del todo conocidos, como en el caso del cv. "moneymaker" donde estos procesos se han estudiado sin lograr su total comprensión (Sun, Xu et al. 2010). La división celular que le da cuerpo a la inflorescencia del fruto de tomate es acompañada de cambios denominados como endorreduplicación² los cuales agilizan la respuesta en la proliferación celular durante la antesis, este proceso generalmente inicia 10 días antes del inicio de la floración (Carrari y Fernie 2006). Algunos autores que analizaron células en donde la endorreduplicación se ha realizado por más de 3 ciclos, concluyen que la célula no está lista para para iniciar la mitosis (Fanwoua et al. 2013). Durante el proceso de antesis, las células ya se encuentran diferenciadas y han desarrollado el tubo polínico, ovario, entre otros órganos que conforman el aparato reproductor de la planta. En antesis, la flor que después será un fruto, inicia la proliferación celular hasta que el ovario sea fecundado. Este hecho inicia la división activa con disminución gradual del ciclo (cada periodo de división serán menos las células que lleguen a la fase de mitosis) de división celular durante los primeros 5 días después de la polinización (Bertin et al. 2003) aunque otros autores señalan que este podría alargarse hasta 10 días después de la polinización (De Jong et al. 2009). Una vez que culmina la fase de división celular, el siguiente paso en la formación del fruto es el crecimiento por expansión celular.

¹ En botánica el termino antesis es usado para describir a la floración

² Se conoce como endorreduplicación al fenómeno de duplicar en varias ocasiones a los cromosomas (fase S de ciclo celular) sin llegar al proceso de división celular (fase m de ciclo celular)

II.2.1 Expansión Celular

El crecimiento del fruto por expansión celular provoca la forma característica del fruto de tomate. En la mayoría de los frutos la división celular finaliza varios días después de la antesis. El tomate es un claro ejemplo ya que de los 7 a 10 días después de la antesis inicia el proceso de elongación celular. La fase de expansión y/o elongación difiere entre los tejidos del fruto, y la duración de este periodo es determinada en parte por factores ambientales, de los cuales dependera el tamaño del fruto (Salisbury, Ross y Velázquez 1994). Por ejemplo, en el caso de la papa (Solanum tuberculum) la elongación in vitro del tubérculo según Xu, Vreugdenhil y Lammeren (1998) tiene una duración de 10 días. Es en este periodo donde las células que conforman al fruto, en especial las células de pericarpio tienen un aumento de volumen de hasta 10,000 veces su tamaño inicial (Fanwoua et al. 2013). La expansión termina cuando el fruto comienza el proceso de maduración, dicha etapa es clasificada como rompiente (breaker). El o los mecanismo que inician el fenómeno de maduración no son del todo conocidos, pero se sabe que en él están involucradas fitohormonas como las auxinas, ácido abscísico y etileno.

II.3 La Pared Celular del Tomate está Compuesta por Diferentes Estructuras Formadas de Polisacáridos: Celulosa, Hemicelulosa y Pectina

La pared de las células vegetales cumple diferentes funciones entre las que se pueden mencionar protección del ataque de patógenos, le proporciona forma a la célula , además de permitir la comunicación entre la población que conforma al tejido (Scheller y Ulvskov 2010). De acuerdo a esto, se ha demostrado experimentalmente que si la pared celular es eliminada, las células tienden a tomar una forma esférica (Buchanan y Jones 2007), por lo que la pared celular le asegura a la célula la rigidez y forma. La pared celular primaria es dinámica en ciertas regiones, uno de ellos es la pectina (Peaucelle *et al.* 2012, Wolf *et al.* 2012). La pared celular constituye una barrera física

que hace frente al ataque de patógenos (Scheller y Ulvskov 2010), con ello, es la parte de la célula que tiene interacción inicial con los patógenos, que reconociendo cualquier alteración sobre sus componentes, puede iniciar señales para activar la respuesta de la célula y la activación del mecanismo de defensa. De acuerdo a Wolf *et al.*, (2012) los oligogalacturónidos o fragmentos derivados de la degradación del homogalacturonano pueden inducir cambios en la expresión de genes, cierre de estomas, engrosamiento de la pared celular y síntesis de especies reactivas de oxígeno.

II.3.1 Celulosa y Hemicelulosa

La celulosa y hemicelulosa forman cadenas resistentes a la degradación y contribuyen a la rigidez de la pared celular. La celulosa es una estructura semicristalina formada de cadenas, compuestas con de unidades de glucosa unidos con enlaces glicosídico β (1 \rightarrow 4) que interaccionan entre sí a través de puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals para dar lugar a la fibrilla de celulosa en la pared celular. Las hemicelulosas son estructuras flexibles, clasificadas como heteropolisacáridos con enlaces β (1 \rightarrow 4), compuestas de xiloglucanos, xilanos, mananos y glucomananos (Ridley *et al.* 2001, Scheller y Ulvskov 2010). Autores como Eckardt (2008) atribuyen a la hemicelulosa la función de reticular a las fibras de celulosa para formar una red que funciona como principal soporte de carga en la pared celular primaria.

II.3.2 Pectinas

La pectina es la parte más compleja y dinámica de la pared celular. Las pectinas son un grupo muy diverso de heteropolisacáridos, mezcla de polímeros ácidos y neutros muy ramificados, de alto peso molecular que constituye el 30% del peso seco de la pared celular primaria (Scheller y Ulvskov 2010). Evidencias experimentales sugieren que cualquier alteración sobre el dominio que esté funcional repercute directamente en la función de

la pared celular según Rivera Domínguez *et al.*, 2008 mismo que se encuentra compuesta por tres dominios principales; homogalacturonano (HG), ramnogalacturonano I (RG-I) y ramnogalacturonano II (RG-II) los cuales se encuentran unidos por enlaces covalentes y dan cuerpo a la macroestructura de la pectina (O'Neill, Ishii *et al.* 2004). Sus entrecruzamientos mediante enlaces iónicos entre sus diferentes componentes de las pectinas pueden formar geles complejos hidratados o mucilagos. Las pectinas también contribuyen con la flexibilidad de la pared, separación de microfibrillas, ajuste de microambientes e interaccionan con las células adyacentes a través de la lámina media (Braidwood, Breuer y Sugimoto 2014).

Homogalacturonano (HG) Es una cadena lineal con enlaces alfa-D ácido galactopiranosil urónico (GalpA), la cadena principal puede contener grupos laterales de xilosa y puede estar esterificado con grupos metilo o acetilo en el ácido carboxílico hasta un 85% de su estructura (Ridley *et al.* 2001). El HG es sintetizado en el Golgi y luego secretado totalmente metilado a la pared celular (Sénéchal *et al.* 2014b), donde se incorpora a las otras estructuras pécticas. Así mismo el HG puede ser modificado por enzimas como <u>pectin metil e</u>sterasa (PME), <u>pectinacetil e</u>sterasa (PAE) <u>poligalacturonasa (PG) o <u>p</u>ectato <u>l</u>iasa (PL), entre otras.</u>



Figura 2. Modelo estructural de homogalacturonano, (Wolf, Hématy et al. 2012)

Ramnogalacturonano II (RG-II). Es el polímero de pectinas con una composición mas compleja y está presente en la pared primaria como un dímero entrecruzado por 1:2 enlaces borato-diol ester. Este tipo de

entrecruzamiento es formado entre el OH-2 y OH-3 del residuo de apiosil en cada monómero de la sub unidad básica del RG-II (Ridley *et al.* 2001). La conformación espacial del RG-II toma una estructura en forma de red debido a las interacciones iónicas con el ion Ca⁺², a través del polímero de HG (figura 3) y que da como resultado una red péctica en tres dimensiones. La red que forma el RG-II interacciona con las microfibrillas de celulosa mediante enlaces no covalentes, principalmente con las unidades de xiloglucano.



Figura 3. Modelo estructural de ramnogalacturonano II, (Wolf, et al. 2012)

Ramnogalacturonano I (RG-I). Es un polisacárido péctico, considerado como el segundo más abundante en la matriz péctica (10-25% del total del contenido). Su estructura base está formada de repeticiones de azucares de ramnosa y ácido D-galacturónico unidas por enlace (1 \rightarrow 2) α -L-ramnosil-(1 \rightarrow 4) ácido α -D-galactosilurónico y puede tener cadenas laterales compuestas de azucares neutros como arabinanos, galactanos y arabinogalactanos (Ridley *et al.* 2001).



Figura 4. Modelo de ramnogalacturonano I, (Wolf, et al. 2012)

El RG-I se encuentra enriquecido con HG. El RG-I es altamente dinámico ya que las ramificaciones de sus cadenas laterales le permiten interaccionar con los diferentes polímeros de la pared celular, por lo que Yapo, *et al.*, (2011) lo describe como un polímero complejo. Existen otros modelos que esquematizan a la estructuras que forman a la pectina, pero el propuesto por Carpita *et al.*, (1993) es el más exacto y con mayor evidencia experimental (Vincken, Schols *et al.* 2003, Yapo Beda M 2011). La enzima RGLiasa degrada la cadena principal del RG-I y se cree que estos cambios pueden estar implicados en la regulación de la porosidad de la pared, separación y expansión celular, cambios de textura durante la maduración y formación de moléculas de señalización (oligosacáridos) que pueden iniciar el camino de traducción de señales hacia el núcleo actuando como segundos mensajeros.

II.4 La Pectina es el Componente Funcional más Importante de la Pared Celular

La mezcla de sustancias pécticas es fisiológicamente activa durante la ontogenia del fruto. Una de las funciones de las susstancias pécticas es participar en la adhesión entre las células (Naran et al. 2007) principalmente durante el desarrollo. En frutos, el ablandamiento y la pérdida de firmeza son cambios que acompañan a los procesos de madurez y senescencia. Fanwoua et al. (2013) encontró mediante análisis histológicos sugieren que la pérdida de la firmeza se debe a una desorganización de la lámina media, por acción de enzimas que degradan principalmente las pectinas en la etapa final senescente del fruto. Se ha observado que el polímero RG-I cumple una función en el mantenimiento de la firmeza en dos cultivares de manzana (Peña y Carpita 2004). Muchas de las enzimas de pared celular pueden estar involucradas en la inducción de la respuesta para la protección de la planta a heridas o ataque de hongos patógenos activando enzimas de defensa como glucanasas y quitinasas (El Ghaouth, Arul et al. 1992). Sin embargo es difícil elucidar la función fisiológica de cualquier enzima, ya que la manera más adecuada de hacerlo es creando el organismo transgénico con niveles alterados de la actividad enzimática.

II.5 Se Conoce el Mecanismo Bioquímico de la EnzimaRamnogalacturonano Liasa, sin Embargo es poco lo que se sabeAcerca de sus Funciones Fisiológicas

La RGLiasa es una enzima que se encuentra en la pared celular de células vegetales. Naran et al. (2007) detectaron mediante sustrato especifico y cuantificaron la enzima RGLiasa en cotiledón de algodón. Los autores reportaron que los productos de la actividad de RGLiasa son fragmentos formados de disacáridos compuestos por $(1 \rightarrow 2) \alpha$ -L-ramnosil- $(1 \rightarrow 4)$ ácido α -D-galactosilurónico, con un extremo no reductor de ramnosa y ácido galacturónico insaturado (Δ -4-5). En base a su mecanismo de acción, se clasifica a la RGLiasa dentro de la familia P4 de las polisacárido liasas caracterizada por tener plegamientos tipo β -sandwich y hojas- β (figura 5), las cuales utilizan el mecanismo catalítico de eliminación tipo beta (Lombard, Bernard et al. 2010). En términos generales, la estructura terciaria de la RGLiasa consiste de tres regiones funcionales. La región que se encuentra en la region N-terminal corresponde al sitio catalítico y los dos restantes (región media y C-terminal) corresponden a unión a sustrato (Lombard et al. 2010). La especificidad de las enzimas polisacáridos liasas a menudo depende de la interacción con cationes divalentes (principalmente Ca²⁺), los cuales cumplen un papel importante para la funcionalidad de la región Cterminal de la secuencia proteica.



Figura 5. Estructura terciaria de las enzimas liasas de la familia 4

II.6 Mecanismo Bioquímico de la Ramnogalacturonano Liasa

La RGLiasa pertenece a la familia de polisacáridos liasa. Esta enzima puede interrumpir la continuidad de las cadenas de ramnogalacturonano I mediante el mecanismo de β -eliminación, generando un residuo de ácido hexenurónico insaturado y un nuevo extremo reductor (CAZY.org/fPL4). La enzima RGLiasa al igual que las otras enzimas ha sido caracterizada en otros organismos como *Dickeya chrysanthemi* (CAD27359.1) y algunas especies de *Aspergillus* permitiendo elucidar el mecanismo de catalisis. La β -eliminación es específico de las enzimas liasas y puede ser detectada por una característica insaturación que se forma en el residuo de ácido galacturónico que la enzima induce durante la catálisis.

II.6.1 Funciones fisiológicas

Las funciones fisiológicas de la RGLiasa son hipotéticas y muy diversas, descritas a continuación. Se ha sugerido que cumple una función en la expansión celular en tejidos vegetales (Naran *et al.* 2007), los productos de la degradación del RG-I pueden ser señales para la activación de vías metabólicas alternativas para la síntesis del ascorbato (Vicente, Saladie *et al.* 2007), es necesario el esqueleto de RG-I y sus cadenas laterales de arabinano y galactano para mantener la funcionalidad e integridad de la pared celular (Oomen, Doeswijk-Voragen *et al.* 2002), polímeros formados por el disacárido (1 \rightarrow 2) α-L-ramnosil-(1 \rightarrow 4) ácido α-D-galactosiluronico cumplen una función como moléculas señal para activar el mecanismo de defensa (Ridley *et al.* 2001). Sin embargo, es necesario generar más información científica para apoyar en la elucidación de las posibles funciones de RGLiasa en los frutos.

II.7 Existen 15 Genes que Codifican para la Enzima Ramnogalacturonano Liasa en el Genoma del Tomate

La secuenciación del genoma del tomate fue publicada por en el 2012. El genoma del tomate cuenta con 35,004 grupos de genes. Los resultados fueron obtenidos mediante secuenciación de ARN-Seq utilizando la plataforma de Ilumina 2500. Los análisis de bioinformática mostraron que los 30,855 genes tiene similitud con Arabidopsis thaliana. De los 12 cromosomas que contiene el tomate, en el cromosoma 4 y 11 se encuentran los genes que codifican para isoenzimas de RGLiasa, los cuales son identificados por el locus Solyc04q076630.2, Solyc04q076660.2.1, Solyc04q076650.1, Solyc11g011310 y Solyc11g011320.1.1, que se encuentran disponibles en la base de datos de solgenomics.net. Tiznado, et al (2011) estudió la expresión de diversos genes que codifican para la enzima RGLiasa en fruto tomate cultivar Ailsa Craig, donde se observó que los genes Solyc11g011300.1.1, Solyc04g076650.1 y Solyc12g088050 están expresados en la etapa de división celular después de la polinización. Por otro lado, se observó la expresión del gen Solyc11g011300.1.1 durante la maduración. A pesar de lo que se conoce, es necesario realizar más estudios para poder responder a las siguientes preguntas: ¿Qué genes RGLiasa se encuentran expresados durante el desarrollo y maduración del fruto? y ¿Cuándo están activos los genes de RG liasa?. Esta información servirá para correlacionar la actividad de los genes y los cambios a fisiológicos que presenta la pared celular durante el desarrollo y maduración del fruto.

III. HIPOTESIS

Los genes Solyc04g07630.2, Solyc04g07660.2.1 y Solyc11g011300.1.1 de ramnogalacturonano liasa tienen una expresión diferencial durante el desarrollo y maduración del fruto de tomate.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo General

Evaluar la expresión de genes Solyc04g076630.2, Solyc11g011300.1.1 y Solyc04g076660.2.1 que codifican para isoenzimas de ramnogalacturonano liasa durante la ontogenia del fruto de tomate.

IV.2 Objetivos Específicos

1. Obtener frutos de tomate y determinar las etapas que representativas a la ontogenia del fruto.

2. Aislar ARN del pericarpio de tomate

3. Diseñar oligonucleótidos específicos para los genes Solyc04g076630.2, Solyc11g011300.1.1 y Solyc04g076660.2.1

4. Cuantificar los niveles de expresión de los genes mencionados en frutos de tomates con diferentes estados de madurez mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

V. MATERIALES Y METODOS

V.1 Material Vegetal

Se germinaron semillas de tomate cv. Rutgers. Posteriormente, las plántulas se colocaron en charolas de germinación con capacidad de 60 pozos con una proporción de 50/50 arena y mezcla comercial Mix Growth[®] con un riego diario y una aplicación semanal de solución Hoagland y MiracleGro[®]. En el momento en que las plántulas alcanzaron un tamaño mayor a 7 cm (aproximadamente 30 días después de la germinación) fueron trasplantadas a bolsas con capacidad de 20 libras con una proporción 20/80 arena y mezcla comercial Mix Growth[®]. Después de 45 días de germinación, se plantaron en suelo dentro de un invernadero tipo multitúnel ubicado en latitud 110°53'08.5"W y longitud 20°16'56.8"N. A los 90 días después de que las semillas germinaron, se marcaron las flores que estaban totalmente abiertas, asegurando la polinización de la flor mediante un movimiento suave de las anteras utilizando brochas de textura suave.

V.2 Registro de Unidades Calor

En el periodo de cultivo que comprendió de septiembre a diciembre del año 2014, se registraron las temperaturas máximas y mínimas con la finalidad de registrar etapas fenológicos para este cultivar y establecer estados de desarrollo en base a las unidades térmicas tomando en cuenta el umbral de crecimiento del fruto siguiendo la metodología descrita por el departamento de agricultura de la Universidad de California Davis, CA, EUA.

V.3 Estados de Desarrollo Evaluados

Se realizó un muestreo de frutos con 5, 10, 30 y 40 días después de floración. Asimismo, se obtuvieron frutos en estado verde maduro, cambiante y rojo maduro, siguiendo las recomendaciones del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. El material vegetal fue transportado hasta las instalaciones del Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular de Planas en las instalaciones del Centro de investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. donde se realizó una disección de los tejidos, separando el pericarpio del fruto, mismo que fue congelado con nitrógeno líquido y almacenado a -80°C hasta su análisis.

V.4 Extracción de ARN y Síntesis de ADNc

Para la extracción del ARN total en las muestras de 5, 10, 30 y 40 días después de la floración se utilizó RNeasy[®] plant mini kit siguiendo las indicaciones del proveedor; mientras que en las muestras de tomate verde maduro, cambiante y rojo maduro se utilizó la técnica del Borato caliente reportado por Larry Smart y Thea Wilkins, 1995. Se realizó la cuantificación del ARN utilizando Nanodrop 2000 y se verificó la integridad del mismo mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% en buffer TAE con fuente de poder Biorad[®].

La síntesis de la cadena complementaria se realizó utilizando el kit comercial "Super Script II invitrogen[®]", agregando 200 unidades de transcriptasa reversa en un volumen total de 20 μ I. Se dio inicio a la síntesis de la primer cadena con 1 μ g de ARN total libre de ADN genómico utilizando los oligonucleótidos reversos específicos para amplificar los transcritos diana a una concentración de 10 μ M.

V.5 Análisis in-silico de secuencias

Se obtuvieron las secuencias de RNAm de la base de datos de SGN (solgenomics.net). Estas secuencias se analizaron mediante el software SignalP 4.1 (cbs.dtu.dk/services/SignalP), Domain Finder NCBI (.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi), SMART pFam (smart.embl-heidelberg.de) y MEGA 6 para determinar la presencia del péptido señal, regiones con funciones específicas y análisis filogenético.

V.6 Diseño de Oligonucleótidos

Se diseñaron oligonucleótidos *in-silico* utilizando las secuencias de ARN mensajero de los genes Solyc04g076630.2, Solyc11g011300.1.1 y Solyc04g076660.2.1, las cuales fueron obtenidas de la base de datos de SGN (solgenomics.net). Las secuencias fueron alineadas con el programa MEGA 6 para encontrar y excluir regiones similares entre los genes. Las secuencias de nucleótidos de los genes de ramnogalacturonano liasa fueron cargadas en la base de datos QuantPrime (Arvidsson, Kwasniewski *et al.* 2008) así como la base de datos de *Solanum lycopersicum* ITAG 2.3 para llevar a cabo el diseño de los oligonucleótidos.

V.7 Cuantificación de Expresión Relativa Mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real

La expresión de genes fue cuantificada en dos pasos, utilizando el método de $2^{\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen 2001) mediante el kit HotStart-IT SYBR® Green affimetrix. Las reacciones para PCR se realizaron utilizando 10 µl HotStart-IT SYBR Green, 0.5 µl de oligonucleótidos sentido a una concentración de 250 nM y 0.5 µl de oligonucleótidos anti sentido a una concentración de 250 nM. La cantidad de DNAc se agregó diluyendo el stock en un volumen de 5 µl añadiendo un total de 100 ng totales de ADN, y se ajustó el volumen mediante agua grado PCR para obtener un volumen final de 20 µl. El termociclador utilizado fue StepOne ApliedBiosystems de Thermofisher bajo las condiciones descritas en el cuadro 1.

	Ciclos	Tiempo	Temperatura ℃
	1	2 min	95
	40	15 seg	95
_	40	30 seg	60

Cuadro 1. Cuadro Ciclos de PCR con HotStart-IT SYBR Green

El ensayo de rangos dinámicos fue realizado con los diferentes tiempos de muestreos, eligiendo tiempos específicos para cada uno de los genes de ramnogalacturonano liasa Solyc04g076630.2, Solyc04g076660.2.1 y Solyc04g011300.1.1. Para la validación de los oligonucleótidos, se siguió la metodología reportada por Nolan, Hands y Bustin (2006) utilizando cinco puntos de dilución, partiendo de 100 ng totales en el punto de dilución mayor y continuando con un factor de dilución 1:5 en los siguientes puntos de dilución. Cada dilución se cuantifico por triplicado en muestras independientes.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓNES

VI.1 Unidades calor por día para el cultivar Rutgers

La medición de grados día nos permite calcular con precisión el avance en el desarrollo de un cultivo utilizando el calor acumulado durante el día, con la finalidad de predecir etapas fenológicas en el cultivo y establecer los estados de desarrollo del fruto. El principio de la técnica consiste en el registro de temperaturas máximas y mínimas, comenzando desde el día del trasplante al suelo (www.ipm.ucdavis.edu/index.html). Durante el periodo el cultivo se obtuvo la acumulación de calor que recibió el cultivo logrando registrar las diferentes fases fenológicas para el cultivar Rutgers, logrando encontrar la primera inflorescencia a los 452.9 GDA, las etapas de división celular del fruto al correspondiente a los 5DDF con 576.6 unidades térmicas (Cuadro 2). Las unidades térmicas acumuladas para el evento fenológico de 10 DDF (727.8) coinciden con lo reportado por Ardila, Fischer y López (2012) para el cultivar Beverly en la región de Bogotá Colombia el cual mostró 736 unidades térmicas. Estas diferencias en las unidades térmicas probablemente se deben a las diferencias entre las condiciones climatológicas de las dos regiones mencionadas y entre los cultivares utilizados en los experimentos.

Cuadro 2. Fenología de fruto de tomate Solanum lycopersicum L. cv Rutgers en base a la fecha y la zona agrícola de Hermosillo, Sonora

	Estado Fenólogico	GDA (10)	Fecha	Ardila R. y cols 2011
1	Primera inflorecencia	453.9	21-oct-14	
2	Flor abierta	519.45	25-oct-14	
3	5 DDF	576.6	29-oct-14	
4	10 DDF	727.8	15-nov-14	736
5	30 DDF	879.35	05-dic-14	
6	40 DDF	1013.8	30-dic-14	
7	Fin del cultivo	1008.7	02-ene-15	

*GRA: Grados Día Acumulados

VI.2 Análisis in silico de genes ramnogalacturonano liasa activos en fruto

Análisis de Homología debido а que los genes RGLiasa Solyc04q011300.1.1, Solyc04q076630.2 y Solyc04q06660.2.1 forman parte de una familia de isoenzimas, fue necesario discriminar similitues mediante interacciones de alineamiento (MUSCLE, pMethod) y diferencias filogenéticas (MEGA 6, Bootstrap method) para encontrar su homólogo. Uno de los análisis bioinformáticos que se realizaron con las secuencias de los genes ramnoglacturonano liasa Solyc04g011300.1.1, Solyc04q076630.2 V Solyc04g06660.2.1 fue encontrar sus genes homólogos³ en otras especies de plantas así como en frutos modelo. El análisis se realizó a nivel aminoácido encontrando que los genes de ramnogalacturonano liasa son conservados en al menos 92 especies de plantas de las que se tiene registro en el banco mundial de genes del National Center of Biotechnology Information (NCBI), por lo que se puede decir que estos genes se encuentran conservados en el reino plantae. Además, se incluyeron en el análisis algunas especies modelos como: Solanum tuberosum, Fragaria ananassa, Vitis vinífera, Prunus pérsica, Citrus sinensis, Citrus clementina, Mangifera indica y Arabidopsis thaliana, con la finalidad de encontrar genes homólogos en fruto.

Se encontró que los genes Solyc04g011300.1.1, Solyc04g076630.2 y Solyc04g066602.1 no solo estaban presente en la planta sino también en fruto (figura 6), lo que confirma lo reportado por Tiznado Hernández *et al.* (2011). Estos autores reportan genes activos en fruto en diferentes estados fenológicos en *Solanum lycopersicum* L. de los cuales, los genes Solyc04g011300.1.1, Solyc04g076630.2 y Solyc04g06660 son reportados como activos en fruto de tomate con 5, 15 y 30 DDF (<u>d</u>ías <u>d</u>espués de <u>f</u>loración) en verde maduro y rompiente.

³ El termino de genes homólogo hace referencia a la secuencia de aminoácidos más parecida en otros organismos basándose en un porcentaje de similitud



Figura 6 Análisis de secuencias de aminoácidos homólogas en frutos modelo de estudio para genes ramnogalacturonano liasa. (A) Secuencias homólogas de Solyc04g076660.2.1. (B) Secuencias homólogas de Solyc04g076630.2 (C) Secuencias homólogas de Solyc11g011300.1.1. El número en las ramificaciones representa el porcentaje de interacciones positivas entre las

secuencias de aminoácidos por el pMethod de un total de 1000 interacciones para cada árbol filogenético.

El uso de los análisis filogenéticos nos permitió encontrar los genes homólogos entre diferentes especies para cada uno de los genes estudiados en el presente trabajo. En la figura 6 se encuentran los genes más similares en base a su distancia filogenética con lo que se puede decir que cada uno de los genes analizados tiene un homólogo en los frutos modelo, además en el cuadro 3 se incluye una lista de los diferentes números de acceso en la base de datos de transcritos de los frutos.

Erutos Modolo	Genes homólogos ramnogalacturonano liasa				
	Solyc11g011300 Solyc04g076630		Solyc04g076660		
Fragaria ananassa	FAN_iscf00232901.1	FAN_iscf00189873.1	FAN_iscf00051550.1		
Solanum tuberosum	6364645.1	6338131.1	6338024.1		
Vitis vinífera	10664440.1	10664440	VIT_18s001g07850.t01		
Prunus pérsica	7225130.1	7224652.1	7224652.1		
Citrus sinensis	6466349.1	6472411.1	KDO81266.1		
Citrus clementina	6426234.1	6433775.1	6433775.1		
Mangifera indica	MIN002771	MIN089054	MIN002771		
Arabidopsis thaliana	At2g22620		At4g24430		

Cuadro 3 Secuencias ramnogalacturonano liasa homólogos en frutos

Análisis de Dominios Funcionales es una herramienta para conocer la posible función de una proteína comparando la secuencia de aminoácidos con anotaciones similares en otras secuencias de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos para los genes Solyc04g011300.1.1, Solyc04g076630.2 y Solyc04g06660.2.1 fueron analizadas con el sistema SMART® P-fam (Letunic, Doerks y Bork 2014) logrando identificar tres dominios funcionales (Figura 7). En diversas especies de hongos como *Aspergillus sojae, aculeatus, clavatus, flavus, kawachii, nidulans, niger, oryzae, terreus* por mencionar algunas, se han encontrado secuencias de RGLiasa (Yoshino-Yasuda, Karita *et al.* 2012). Utilizando SMART® -Pfam software, se logró obtener el tamaño y posible función de los dominios funcionales que presentan esto genes, los cuales se encuentran ubicados dentro de la clasificación P4 de enzimas (EC 4.2.2) RGLiasa según la clasificación CAZY. El dominio I (Rhamnogal_lyase) tiene un tamaño no mayor a 240 aminoácidos y se encuentra agrupado en la super

familia cl15675. Esta región funcional rompe a los enlaces glicosídicos alfa-1,4 entre ramnosa y acido D-galacturonico mediante eliminación tipo beta. Debido a la baja identidad que tiene el dominio I (Rhamnogal_lyase) con su dominio homologo RGLiasa en *Aspergillus aculeatus*, se puede decir que hay rasgos filogénicos evolutivos que marcan un posible nacimiento de una sub familia con diferencias entre el reino plantae y el reino fungi. Sin embargo, la maquinaria necesaria para llevar a cabo el rompimiento del enlace glicosídico α -1,4 ha sido conservada en estas regiones funcionales ya que realizan la actividad catalítica sobre el RG-I mediante la beta eliminación ha sido conservada (McDonough, Kadirvelraj *et al.* 2004).



Figura 7. Análisis de dominios funcionales en secuencias de aminoácidos para las isoenzimas de ramnogalacturonano liasa activas en fruto de tomate. Dominio I Rhamnogal_lyase; corresponde al sitio catalítico. Fn III y CMB-like corresponde a la región funcional de unión a sustrato. La línea roja corresponde a la secuencia con denominación péptido señal.

En la figura 7 se esquematizan los dominios funcionales de RGLiasa, dominio Fn III y dominio CMB-like (<u>M</u>ódulo de <u>U</u>nión a <u>C</u>arbohidratos) cumplen la función de interacción con el sustrato. Particularmente el dominio Fn III se encuentra agrupado dentro de la super familia cl21470 y es el dominio funcional de menor tamaño (87-95 aminoácidos). El Fn III se encuentra asociado a enzimas agrupadas en la familia CPM14N/E como peptidasas (dominio carboxilo terminal) y carboxipeptidasa (anotaciones putativas de regulación, interacción y plegamiento). De acuerdo a la Batch Web Conservated Domain Search Tool, las enzimas activas en esta familia cumplen una gran variedad de funciones celulares como procesamiento prehormona, alteraciones proteína-proteína o proteína-célula y regulación transcripcional (Lombard *et al.* 2010). Por otro lado, algunas enzimas que contienen este dominio según Domain Families-NCBI participan regulando la actividad de enzimas o se encuentran involucrados en interacción con membranas celulares.

El Módulo de Unión a Carbohidrato (CMB-like), se encuentra agrupado dentro de la súper familia cl15687 y debido a la complejidad del RG-I, se espera que los residuos conservados (Arg-Gli-X-Trp-Arg-Gli) que se encuentran participando activamente en este módulo de unión a carbohidrato se agrupen en la superficie de la proteína, en una región donde la proteína puede acomodar aproximadamente 12 unidades del disacárido de ramnosa - ácido D galacturónico. Evidencia experimental (datos no publicados de nuestro grupo de trabajo) sugiere que la proteína obtenida a partir de la secuencia Solyc11g011300.1.1 tiene mayor actividad cuando se encuentra en contacto con ion calcio debido a su similitud con la familia pectato liasa (familia P4) lo que coincide con lo reportado con McDonough et al. (2004) ya que ellos concluyen que el ion calcio no es necesario para la actividad catalítica del RGl pero es posible que altere la conformación espacial de módulo de unión a carbohidrato (CMB-like) influyendo en la eficiencia de la reacción. La secuencia de aminoácidos del gen Solyc04g076660.2.1 incluye un segmento péptido señal el cual tiene una longitud de 24 aminoácidos. Las enzimas que contienen este patrón de aminoácidos en el extremo N-terminal por lo regular son excretadas al exterior de la membrana plasmática.

VI.3 Extracción de ARN y síntesis de la cadena complementaria

Se obtuvo ARN total de frutos de tomate con 5, 10, 30 y 40 DDF (<u>d</u>ías <u>d</u>espués de <u>f</u>loración) y en estado verde maduro (VM), cambiante (CAM) y rojo maduro (RM), con relación 260/280 mayores a 1.80 siguiendo la técnica del borato

caliente reportada por Larry Smart y Thea Wilkins (1994). Para los estados de madurez verde maduro, cambiante y maduro, se obtuvieron rendimientos en el rango de 849- 272 ng/g x PF (gramos de peso fresco). Para los estados de desarrollo 5, 10, 30 y 40 días después de floración, se utilizó el kit comercial RNeasy plant kit[®], obteniendo rendimientos en el rango de 87-150 ng/100mg PF. Se evaluó la integridad del ARN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% logrando distinguir las subunidades 28S y 18S del ARN ribosomal claramente en el gel (figura 8).



Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa, ARN. (A) Marcador de peso molecular 1 kb plus, (B) 5DDF, (C) 10DDF, (D) 30 DDF, (E) 40 DDF y (F) Estado Verde Maduro

La síntesis del ADNc se realizó utilizando el kit "Superscript II invitrogen[®]" siguiendo los lineamientos del fabricante, partiendo de 1 µg de ARN total. Para verificar la calidad de la genoteca, se realizó la amplificación del gene constitutivo TIP 41 (Czechowski, Stitt *et al.* 2005, Dekkers, Willems *et al.* 2012) que codifica para una proteína de unión (Solyc10g049850) de *Solanum lycopersicum* L.



Figura 9. RT-PCR semicuantitativa de TIP 41. Amplificación usada como control en la síntesis de primera cadena. TEST, ensayo en ADNc y NTC, ensayo en ARN libre de ADN genómico. 1. Marcador de peso molecular 50 pb. 2, 3 y 4: 5 DDF. 5, 6 y 7: Verde Maduro

VI.4 Diseño especifico de oligonucleótidos para genes ramnogalacturonano liasa

Para la versión 2 de oligonucleótidos (RGLv.2) se utilizó el software quantprime reportado por Arvidsson et al. (2008). Una vez asignadas las secuencias de transcritos diana, se integró la base de datos ITAG 2.3 de la base de datos solgenomics network lo cual aseguro la especificidad. Se lograron diseñar tres pares de oligonucleótidos para cada uno de los genes diana (cuadro 4), los cuales se evaluaron experimentalmente. Se logró el tamaño genes observar de amplicón esperado para los ramnogalacturonano liasa. En el análisis con ADN genómico, no se observó producto de amplificación lo que nos indica que los oligonucleótidos amplificaran solo transcrito y por electroforesis en el de garosa se observó una

sola banda, lo que nos permitió pasar al siguiente paso que es el análisis de la expresión mediante PCR-cuantitativa

Nombre de oligo	tamaño	Secuencia
Soly04630.1F	24	TGGTATGACGCGAAAGAACAGATG
Soly04630.1R	24	CGCGAAACTATAAGGCCAACAGTC
Soly04630.2R	23	TCGCGAAACTATAAGGCCAACAG
Soly04630.3R	24	CTCGCGAAACTATAAGGCCAACAG
Soly04650.1F	22	ATGGCACGTATCAAGGAACGAC
Soly04650.1R	23	GGATTATTCACCCGAACCTGCAC
Soly04650.2F	24	GAATGGCACGTATCAAGGAACGAC
Soly04650.2R	24	CGGATTATTCACCCGAACCTGCAC
Soly04650.3F	23	AATGGCACGTATCAAGGAACGAC
Soly04650.3R	23	GGATTATTCACCCGAACCTGCAC
Soly04660F	23	AGCCAGAGTTAAGAGGAGAGGTC
Soly04660R	24	ACCGGATCGAAATTCATCACTTGG
Soly11300.1F	24	TGTTGTGGAGTTTACCATGGTTGC
Soly11300.1R	22	TGCCATTGCTCATCGTCACTTG
Soly11300.2R	23	ATGCCATTGCTCATCGTCACTTG
Soly11300.3R	24	AATGCCATTGCTCATCGTCACTTG
Soly11320.1F	22	GGTGCACCATCATGACAATCGC
Soly11320.1R	23	AGTGTCACGGGAGGAGAAACTTG
Soly11320.2R	24	CGTTAGTGTCACGGGAGGAGAAAC
Soly11320.3R	22	GTGTCACGGGAGGAGAAACTTG

Cuadro 4. Oligonucleótidos para genes ramnogalacturonano liasa, diseñados de acuerdo a la base de datos ITAG 2.3

VI.5 Expresión relativa de los genes Solyc04g076630.2,Solyc04g076660.2.1 y Solyc11g011300.1.1 que codifican para isoenzimas de ramnogalacturonano liasa

La cuantificación relativa es la comparación cuantitativa del ácido nucleico diana, en este caso los genes ramnogalacturonano liasa con respecto a un gen de referencia. Para este experimento se determinó la expresión relativa de los genes Solyc04g076630.2, Solyc04g076660.2.1 y Solyc11g011300.1.1 por el método $2^{\Delta Ct}$ reportado por Livak y Schmittgen (2001) para ello se utilizó el kit comercial Affimetrix USB el cual contiene al fluoroforo SYBR[®] Green. Mediante el ensayo de disociación, se logró corroborar la especificidad de los oligonucleótidos en el sistema con el que se trabajó. De manera general, el perfil de expresión fue analizado en dos pasos (Retrotranscripción-qPCR). Las

ventajas de hacerlo en dos pasos es que se pueden cuantificar muchos blancos con poca muestra y el ADN puede ser conservado para experimentos posteriores.

Rangos dinámicos

El ensayo de rangos dinámicos nos permite observar el comportamiento de los oligonucleótidos en el sistema que se va a usar y nos da información para realizar la cuantificación de los ARNm de los genes ramnogalacturonano liasa. La eficiencia de los oligonucleótidos, además de precisar la cantidad de ADNc a utilizar durante la cuantificación, nos dice que tanto producto es formado durante los ciclos de PCR. Como resultado del ensayo de validación con los oligonucleótidos RGLv2 se encontró que Solyc04g076630.2 puede ser cuantificado con el gen ubiquitina (Solyc07g064130.1.1) ya que al calcular el coeficiente de regresión de la Δ Ct, el valor es menor a 0.15 (cuadro 6) mientras que para el gen Solyc04g076660.2.1 se calibró con el gen TIP 41 (Solyc10g049850.1.1) las gráficas se encuentran a continuación en la figura 10.





Figura 10. Validación Solyc11g011300 y TIP 41; Validación Solyc04g076660 y PP2Acs; Validación Soly04g076630.

Durante el ensayo de validación, se aseguró que los amplicones formados en cada uno de los puntos de dilución así como sus respectivas replicas mantuvieran la misma Tm obtenida durante el ensayo de disociación. Para el amplicón del gene Solyc11g011300.1.1, los valores de Tm =78.4, para el amplicón Solyc04g0766630.2 la Tm= 77.6 y para el amplicón Solyc04g076660.2.1 Tm= 77.2. Para conocer el tamaño del amplicón, se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Cuadro 5. Eficiencias de oligonucleótidos ramnogalacturonano liasa v2 y su gen de referencia para la medición de transcritos

Gen	Eficiencia	R ² de ∆Ct
Solyc04g076630	100.23	0 1 2 0 2
Ubiquitina (Solyc07g064130.1.1)	96.95	0.1303
Solyc04g076660	100.00	0 1001
PP2Acs (Solyc05g006590.2.1)	95.23	0.1091
Solyc11g011300	101.6	0 1206
TIP 41 (Solyc10g049850.1.1)	9158	0.1206

Cuantificación de transcritos; Solyc04g076630.2, Solyc04g076660.2.1 y Solyc11g011300.1.1

En la figura 11, se observa la expresión relativa del gene Solyc04g076660.2.1 durante la ontogenia del fruto de tomate. Se observó un incremento en expresión a los 10 días después de floración y en la etapa verde maduro. Se observaron valores muy pequeños en los otros estados de desarrollo evaluados. Los resultados de este experimento son similares a lo encontrado Tiznado *et al.,* (2011) Estos autores realizaron un experimento en *Solanum lycopersicum* variedad *Ailsa Craig,* encontrando que la expresión de

Solyc04g076660.2.1 (AW944746) fue elevada en los estados de desarrollo de 5, 15 y 30 días después de floración, además de en la etapa verde maduro.





En la figura 12 se observan los resultados de la evaluación de la expresión relativa del gen Solyc04g076630.2 durante la ontogenia del fruto de tomate. Se observó el nivel de expresión más alto en la etapa verde maduro, mientras que en los otros estados de madurez y desarrollo la expresión de este gen fue mínima. Tiznado, et al., 2011 observaron una alta expresión del gen Solyc04g076630.2 a los 5 días después de floración en Ailsa Craig, lo que no coincide con los datos del presente experimento, ya que en esta misma etapa, se encontraron valores demasiados bajos de expresión. Sin embargo, la expresión reportada en el estado verde maduro es similar a lo encontrado en este trabajo. Estas diferencias muy posiblemente se deben a que se utilizaron diferentes variedades de tomate en los dos trabajos.

Según el banco de genes del NCBI mediante alineamiento local de transcritos existen secuencias similares como BT021099.1, BT015775.1, AY057715.1, AtMYST6 por mencionar algunas. Estos transcritos tienen dominios con actividad liasa por similitud con los dominios funcionales, tienen su anotación de localización en la membrana plasmática y distribuidos en la etapa de antesis; ubicados en la diferenciación de los pétalos y en la etapa de

expansión que abarca después de una semana que la flor abierta es polinizada, que es un tiempo de aproximadamente 5 días.



Solyc04g076630.2

Figura 12. Expresión relativa de Solyc04g076630.2 en diferentes etapas de desarrollo en fruto de tomate Solanum lycopersicum cv Rutgers

expresión del gen Solyc11g011300.1.1 durante la Los cambios en la ontogenia del fruto de tomate se muestran en la figura 13. Se puede observar que niveles bajos de expresión se encuentran en etapas donde el fruto está creciendo por expansión celular hasta los 40 días después de floración. Por otro lado se observa un aumento gradual comenzando en la etapa verde maduro y mostrando su valor más alto en la etapa rojo maduro. Molina-Hidalgo, Franco et al. (2013) realizaron un experimento en Fagaria ananassa donde silenciaron mediante Ti (infección por agrobacterium) al gen FaRGliasa (FAN_iscf00232901.1.g00001.1, CO381780.1) el cual es el homologo filogenéticamente de Solyc11g011300.1.1. Mediante cortes histológicos, observaron que la pared celular del fruto control disminuía conforme la madurez del fruto avanzaba, mientras que en la pared celular del fruto transgénico se observó que la pared celular no disminuyó conforme la maduración avanzo, mostrando menos cambios en la firmeza. Ellos concluyen FaRGliasa (FAN_iscf00232901.1.g00001.1, que el gen

CO381780.1) podría estar desempeñando un papel fundamental en el catabolismo de la pared celular, mediante la degradación de la lámina media en *Fagaria ananassa* en etapa maduro. Considerando estos datos y la homología de este gene con el Solyc11g011300.1.1, podemos sugerir que muy posiblemente este gene cumple una función durante el ablandamiento del fruto de tomate, aunque más evidencias experimentales se requieren para soportar esta afirmación.



Figura 13. Expresión relativa de Solyc11g011300.1.1 en diferentes etapas de desarrollo en fruto de tomate Solanum lycopersicum cv Rutgers

VII. CONCLUSIONES

La expresión del gen Solyc11g011300.1.1 coincide con el proceso de maduración del fruto tomate *Solanum lycopersicum* L cv Rutgers y posiblemente participe en el fenómeno de reducción en la firmeza.

El patrón de expresión del gene Solyc04g076630.2 correlaciona con las etapas iniciales del fenómeno de maduración del fruto de tomate.

La mayor expresión del gene Solyc04g076660.2.1 coincide con el estado de desarrollo donde el fruto se encuentra creciendo por expansión celular.

VIII. PERSPECTIVAS

La degradación del polímero RG-I modifica de manera significativa la lamina media de la pared celular y la firmeza del fruto, pero no debemos olvidar que el RG-I contiene ramificaciones de arabinosa, galactosa, o arabinogalactosa. Pero esto que tiene que ver con la degradación del RG-I?. Experimentos en *Solanum pimpinellifolium* (Chu, Jiang *et al.* 2015)dieron como resultado un mutante al que llamaron FIN, el cual contenía una deleción en el locus que codifica para hidroxiprolina arabinosil transferasa, enzima que degrada las ramificaciones del RG-I el resultado fue un incremento en el tamaño del fruto. Podría ser la pared celular un organelo cuya modificación repercuta en mayor productividad para los sectores alimentarios?. Por lo pronto se propone un modelo en base a los resultados experimentales de este trabajo y datos obtenidos de revisión de literatura donde se plantea la regulación de la expresión del gene Solyc11g011300.1.1 durante la ontogénica del fruto de tomate y la correlación de este comportamiento con la presencia de elementos de respuesta a etileno y auxina en el promotor del gen.

Según los resultados de este trabajo, el gen Soly11g011300.1.1 tiene aumento progresivo de la expresión conforme avanza la madurez del fruto. Esto lo podemos relacionar con los fenómenos que están ocurriendo en ese momento en el fruto como son perdida de firmeza, además, según datos no publicados (Berumen G. *et al.*, 2016) en el equipo de trabajo indican que el promotor del gen Soly11g011300.1.1 contiene elementos de respuesta a auxina y etileno. Si observamos el aumento de síntesis de etileno se encuentra al inicio de la maduración, desencadenando una serie de fenómenos que permite una serie de cambios importantes en el fruto y con la evidencia experimental en un homólogo del gen Soly11g011300.1.1 la tenemos en el trabajo Molina Hidalgo *et al.*, (2013) en su homólogo de este gen en fresa.



Figura 14. Modelo propuesto para la expresión del gen Solyc11g011300.1.1 durante la ontogenia del fruto de tomate cultivar Rutgers. Las diferentes etapas de la ontogenia del fruto se clasificaron por DDF: días después de floración. VM: verde maduro. CAM: cambiante. RM: rojo maduro.

Solyc11g011300

IX. REFERENCIAS

(Last update: 2015-12-11 © Copyright 1998-2015). "Carbohydrates Active Enzyme." from <u>http://www.cazy.org/PL4.html</u>.

G. Árdila, G. Fischer and H. E. B. López (2012). "Caracterización del crecimiento del fruto y producción de tres híbridos de tomate (Solanum lycopersicum L.) en tiempo fisiológico bajo invernadero." <u>Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas</u> **5**(1): 44-56.

S. Arvidsson, M. Kwasniewski, D. Riano-Pachon and B. Mueller-Roeber (2008). "QuantPrime - a flexible tool for reliable high-throughput primer design for quantitative PCR." <u>BMC Bioinformatics</u> **9**(1): 465.

N. Bertin (2005). "Analysis of the tomato fruit growth response to temperature and plant fruit load in relation to cell division, cell expansion and DNA endoreduplication." <u>Ann Bot</u> **95**(3): 439-447.

N. Bertin (2005). "Analysis of the tomato fruit growth response to temperature and plant fruit load in relation to cell division, cell expansion and DNA endoreduplication." <u>Annals of botany</u> **95**(3): 439-447.

N. Bertin, M. Génard and S. Fishman (2003). "A model for an early stage of tomato fruit development: cell multiplication and cessation of the cell proliferative activity." <u>Annals of Botany</u> **92**(1): 65-72.

L. Braidwood, C. Breuer and K. Sugimoto (2014). "My body is a cage: mechanisms and modulation of plant cell growth." <u>New Phytologist</u> **201**(2): 388-402.

B. B. Buchanan and R. L. Jones (2007). <u>Biochemistry and Molecular Biology</u> <u>of Plants</u>, I.K. International Publishing House Pvt. Limited.

R. A. Burton, M. J. Gidley and G. B. Fincher (2010). "Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls." <u>Nature chemical biology</u> **6**(10): 724-732.

N. C. Carpita and D. M. Gibeaut (1993). "Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth." <u>The Plant Journal</u> **3**(1): 1-30.

F. Carrari and A. R. Fernie (2006). "Metabolic regulation underlying tomato fruit development." <u>Journal of Experimental Botany</u> **57**(9): 1883-1897.

B. Coombe (1976). "The development of fleshy fruits." <u>Annual Review of Plant</u> <u>Physiology</u> **27**(1): 207-228.

W. CY and W. TA (1994). "A Modified Hot Borate Method Significantly Enhances the Yield of High-Quality RNA from Cotton (Gossypium hirsutum L.)."<u>Analytical Biochemistry</u> **223:7-12**.

T. Czechowski, M. Stitt, T. Altmann, M. K. Udvardi and W.-R. Scheible (2005). "Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization in Arabidopsis." <u>Plant Physiology</u> **139**(1): 5-17.

Y. H. Chu, K. Jiang, C. Brooks, M. Ogawa-Ohnishi, G. Xiong, M. Pauly, J. Van Eck, Y. Matsubayashi, E. van der Knaap and Z. B. Lippman (2015). "A cascade of arabinosyltransferases controls shoot meristem size in tomato." <u>Nat Genet</u>.

M. De Jong, C. Mariani and W. H. Vriezen (2009). "The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set." <u>Journal of experimental botany</u>: erp094.

B. J. W. Dekkers, L. Willems, G. W. Bassel, R. P. van Bolderen-Veldkamp, W. Ligterink, H. W. M. Hilhorst and L. Bentsink (2012). "Identification of Reference Genes for RT–qPCR Expression Analysis in Arabidopsis and Tomato Seeds." Plant and Cell Physiology **53**(1): 28-37.

E. Dinand, G. Excoffier, Y. Lienart and M. R. Vignon (1997). "Two rhamnogalacturonide tetrasaccharides isolated from semi-retted flax fibers are signaling molecules in Rubus fruticosus L. cells." <u>Plant physiology</u> **115**(2): 793-801.

N. A. Eckardt (2008). "Role of Xyloglucan in Primary Cell Walls." <u>The Plant</u> <u>Cell</u> **20**(6): 1421-1422.

A. El Ghaouth, J. Arul, J. Grenier and A. Asselin (1992). "Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits." <u>Phytopathology</u> **82**(4): 398-402.

J. Fanwoua, P. H. de Visser, E. Heuvelink, X. Yin, P. C. Struik and L. F. Marcelis (2013). "A dynamic model of tomato fruit growth integrating cell division, cell growth and endoreduplication." <u>Functional Plant Biology</u> **40**(11): 1098-1114.

G. Gillaspy, H. Ben-David and W. Gruissem (1993). "Fruits: a developmental perspective." <u>The Plant Cell</u> **5**(10): 1439.

J. Gustavsson, C. Cederberg, U. Sonesson, R. Van Otterdijk and A. Meybeck (2011). "Global food losses and food waste." <u>Food and Agriculture</u> Organization of the United Nations, Rom.

T. Hamann (2014). "The plant cell wall integrity maintenance mechanism - A case study of a cell wall plasma membrane signaling network." <u>Phytochemistry</u>.

I. Letunic, T. Doerks and P. Bork (2014). "SMART: recent updates, new developments and status in 2015." <u>Nucleic Acids Research</u>.

K. J. Livak and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT method." <u>methods</u> **25**(4): 402-408.

V. Lombard, T. Bernard, C. Rancurel, H. Brumer, P. Coutinho and B. Henrissat (2010). "A hierarchical classification of polysaccharide lyases for glycogenomics." <u>Biochem. J</u> **432**: 437-444.

B. W. P. Martin E. Tiznado, Matheus R. Benatti, Nicholas C. Carpita, Maureen C. McCann, Avtar K. Handa, Tatsiana Datsenka (2011). A Tomato Putative Rhamnogalacturonan Lyase Gene Family Exhibits Differential Expression During Tomato Fruit and Plant Growth and Development, Horticulture, Purdue University.

M. A. McDonough, R. Kadirvelraj, P. Harris, J.-C. N. Poulsen and S. Larsen (2004). "Rhamnogalacturonan lyase reveals a unique three-domain modular structure for polysaccharide lyase family 4." <u>FEBS letters</u> **565**(1): 188-194.

K. E. Mohler, T. J. Simmons and S. C. Fry (2013). "Mixed-linkage glucan: xyloglucan endotransglucosylase (MXE) re-models hemicelluloses in

Equisetum shoots but not in barley shoots or Equisetum callus." <u>New</u> <u>Phytologist</u> **197**(1): 111-122.

F. J. Molina-Hidalgo, A. R. Franco, C. Villatoro, L. Medina-Puche, J. A. Mercado, M. A. Hidalgo, A. Monfort, J. L. Caballero, J. Muñoz-Blanco and R. Blanco-Portales (2013). "The strawberry (Fragaria×ananassa) fruit-specific rhamnogalacturonate lyase 1 (FaRGLyase1) gene encodes an enzyme involved in the degradation of cell-wall middle lamellae." Journal of Experimental Botany **64**(6): 1471-1483.

R. Naran, M. L. Pierce and A. J. Mort (2007). "Detection and identification of rhamnogalacturonan lyase activity in intercellular spaces of expanding cotton cotyledons." <u>The Plant Journal</u> **50**(1): 95-107.

T. Nolan, R. E. Hands and S. A. Bustin (2006). "Quantification of mRNA using real-time RT-PCR." <u>Nat. Protocols</u> 1(3): 1559-1582.

M. A. O'Neill, T. Ishii, P. Albersheim and A. G. Darvill (2004). "RHAMNOGALACTURONAN II: Structure and Function of a Borate Cross-Linked Cell Wall Pectic Polysaccharide." <u>Annual Review of Plant Biology</u> **55**(1): 109-139.

R. J. Oomen, C. H. Doeswijk-Voragen, M. S. Bush, J. P. Vincken, B. Borkhardt, L. A. van den Broek, J. Corsar, P. Ulvskov, A. G. Voragen, M. C. McCann and R. G. Visser (2002). "In muro fragmentation of the rhamnogalacturonan I backbone in potato (Solanum tuberosum L.) results in a reduction and altered location of the galactan and arabinan side-chains and abnormal periderm development." <u>Plant J</u> **30**(4): 403-413.

A. Peaucelle, S. Braybrook and H. Höfte (2012). "Cell wall mechanics and growth control in plants: the role of pectins revisited." <u>Frontiers in plant science</u> **3**.

M. J. Peña and N. C. Carpita (2004). "Loss of highly branched arabinans and debranching of rhamnogalacturonan I accompany loss of firm texture and cell separation during prolonged storage of apple." <u>Plant physiology</u> **135**(3): 1305-1313.

B. L. Ridley, M. A. O'Neill and D. Mohnen (2001). "Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling." <u>Phytochemistry</u> **57**(6): 929-967.

Rivera Domínguez Marisela, Troncoso Rojas Rosalba and T. H. M. Ernesto (2008). <u>Utilization of Transgenic Plants to Study Plant Cell Wall Physiology</u> and Biochemistry. In: A Transgenic Approach in Plant Biochemistry and Physiology.

B. C. S., F. Molina, A. S.M., L. M. A. and C. J.W. (2003). "Handling and preservation of fruits and vegetables by combined methods for rural areas." <u>FAO Agricultural Services Bulletin 149</u>.

F. B. Salisbury, C. W. Ross and V. G. Velázquez (1994). <u>Fisiología vegetal</u>, Grupo Editorial Iberoamérica.

J. Sampedro, C. Gianzo, N. Iglesias, E. Guitián, G. Revilla and I. Zarra (2012). "AtBGAL10 Is the Main Xyloglucan β-Galactosidase in Arabidopsis, and Its Absence Results in Unusual Xyloglucan Subunits and Growth Defects." <u>Plant</u> <u>Physiology</u> **158**(3): 1146-1157.

H. V. Scheller and P. Ulvskov (2010). "Hemicelluloses." <u>Annual Review of</u> <u>Plant Biology</u> **61**(1): 263-289.

F. Sénéchal, C. Wattier, C. Rustérucci and J. Pelloux (2014a). "Homogalacturonan-modifying enzymes: structure, expression, and roles in plants." Journal of experimental botany: eru272.

F. Sénéchal, C. Wattier, C. Rustérucci and J. Pelloux (2014b). "Homogalacturonan-modifying enzymes: structure, expression, and roles in plants." <u>Journal of Experimental Botany</u>.

G. B. Seymour, L. Østergaard, N. H. Chapman, S. Knapp and C. Martin (2013). "Fruit Development and Ripening." <u>Annual Review of Plant Biology</u> **64**(1): 219-241.

W. Sun, X. Xu, H. Zhu, A. Liu, L. Liu, J. Li and X. Hua (2010). "Comparative Transcriptomic Profiling of a Salt-Tolerant Wild Tomato Species and a Salt-Sensitive Tomato Cultivar." <u>Plant and Cell Physiology</u> **51**(6): 997-1006.

A. R. Vicente, M. Saladie, J. K. Rose and J. M. Labavitch (2007). "The linkage between cell wall metabolism and fruit softening: looking to the future." <u>Journal of the Science of Food and Agriculture</u> **87**(8): 1435-1448.

J.-P. Vincken, H. A. Schols, R. J. Oomen, M. C. McCann, P. Ulvskov, A. G. Voragen and R. G. Visser (2003). "If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture." <u>Plant physiology</u> **132**(4): 1781-1789.

S. Wolf, K. Hématy and H. Höfte (2012). "Growth control and cell wall signaling in plants." <u>Annual review of plant biology</u> **63**: 381-407.

X. Xu, D. Vreugdenhil and A. A. M. v. Lammeren (1998). "Cell division and cell enlargement during potato tuber formation." <u>Journal of Experimental Botany</u> **49**(320): 573-582.

B. M. Yapo (2011). "Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins—A new hypothetical model." <u>Carbohydrate Polymers</u> **86**(2): 373-385.

B. M. Yapo (2011). "Rhamnogalacturonan-I: A Structurally Puzzling and Functionally Versatile Polysaccharide from Plant Cell Walls and Mucilages." <u>Polymer Reviews</u> **51**(4): 391-413.

S. Yoshino-Yasuda, S. Karita, M. Kato and N. Kitamoto (2012). "Sequence Analysis and Heterologous Expression of Rhamnogalacturonan Lyase A Gene (AsrgIA) from Shoyu Koji Mold, Aspergillus sojae KBN1340." <u>Food Science and Technology Research</u> **18**(6): 901-909.