

Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A. C

**CARACTERIZACIÓN Y EXPRESIÓN DEL GEN MITOCONDRIAL
CITOCROMO b (cob) DE *Vitis vinifera* L.**

POR

Begonia Silva Moreno

Tesis aprobada por la

Coordinación de Tecnología de Origen Vegetal

Corno requisito parcial para obtener el fJrado de

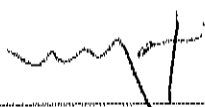
Maestria en Ciencias

Heramosillo, Sonora

Agosto del 2004

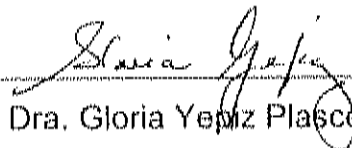
APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Begonia Silva Moreno, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.

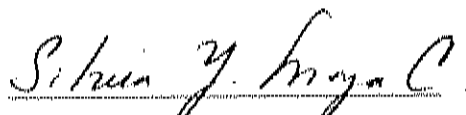


Dra. María A. Islas Osuna

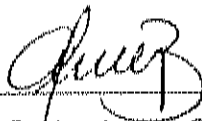
Directora de Tesis



Dra. Gloria Yepiz Plascencia



Dra. Silvia Y. Moya Camarena



M.C. Jesús M. García Robles

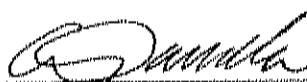


~~Dr. Luis S. Gutiérrez Millán~~

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD).

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



Dr. Alfonso Gardea Béjar

Director General

AGRADECIMIENTOS

A CONACyT, por el apoyo económico otorgado, para poder realizar este proyecto.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C (CIAD), por prestarme sus instalaciones, para poder realizar mi maestría y a todo su personal por la atención y amabilidad que me brindaron.

A mi asesora de tesis Dra. Maria Islas Osuna, por arriesgarse a aceptarme como su primera alumna, por su paciencia y buena disponibilidad.

A los integrantes de mi comité de tesis, Dra Gloria Yepiz, Dra. Silvia Moya, M.C. Jesús Manuel García y el Dr. Luis Enrique Gutiérrez, por la disposición y asesoría que me brindaron.

Al Ing. Rodolfo Romo, Dr. Reginaldo Baez, M.C Jesús Manuel García, Dra. Gloria Yepiz y Dr. Rogerio Sotelo, por las facilidades brindadas para la realización de este trabajo.

Al personal del Laboratorio de Biología Molecular y de Organismos Acuáticos: Karina, Alma, Gaby, Enrique y Alonso por sus atenciones prestadas, amabilidad y paciencia.

A todo el personal de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal, especialmente a Moniquita, Elsa, Deysi, Graciela y Luis porque me hicieron pasar una estancia muy placentera y agradable.

A mis grandes amigos: Nidia, Alejandra, Bárbara, Lili, Claus, Majo, Chayito, Erika, Carlitos, Javier, Raquel, Ana, Francelia y Angélica por contagiarme de alegría, animarme y estar conmigo en todo momento.

A todos mis compañeros de generación "2002-2004", por ser un gran grupo y unos excelentes compañeros.

A los integrantes del Mariachi Juvenil Sonora, por animarme y compartir tan buenos momentos conmigo, especialmente a David, Víctor y Astrit.

A mi hermana Martha porque me tuvo mucha paciencia y me ayudó a resolver muchos problemas técnicos, así como a mi hermana Violeta, porque con su gran sentido del humor, me dio fuerzas para seguir adelante y por último a mi prima Rosario que siempre estuvo conmigo.

A todos los que rezan y se preocupan por mí. Gracias.

DEDICATORIA

A Dios que me da salud, vida y la oportunidad de disfrutar todos mis triunfos y derrotas.

A mi mamá, por darme siempre su bendición, cuidados, compartir mis logros y por ser un ejemplo viviente para mí, de dedicación, constancia, sacrificio y honestidad.

A mi papá, por ser un padre excepcional, que siempre lucha y que nunca se rinde y que por su culpa, ahora he terminado la maestría. Gracias papá.

A mis hermanas Martha y Violeta, por ser como son y apoyarme siempre de una forma muy original y particular.

A mis abuelitos Angel y Guillermina, por el amor incondicional que me dan.

A la memoria de mi abuelita Rosita, que aunque la conocí poco, siempre estará en mi corazón y será una fuente de inspiración para mí.

A toda mi familia que está conmigo y engrandecen cada logro mío.

*“No conquistarás el océano, si no tienes el valor de
dejar de ver la playa.”*

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	xii
INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES.....	3
Variedades de vid (<i>Vitis vinifera</i> L.).....	3
Origen.....	3
Identificación.....	4
Mitocondria.....	5
Estructura y función.....	5
Localización y función del citocromo <i>b</i> (COB) en la mitocondria.....	6
Genoma mitocondrial en plantas.....	9
Importancia del estudio del genoma mitocondrial en plantas.....	9
Tamaño y forma molecular.....	9
Genes mitocondriales.....	10
Expresión.....	12
Migración.....	13
Gen citocromo <i>b</i> (<i>cob</i>).....	13
HIPÓTESIS.....	15
OBJETIVOS.....	15
Objetivo general.....	15
Objetivos específicos.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
Recolección de hojas de vid.....	16

Extracción de ADN genómico	16
Amplificación del gen <i>cob</i> por PCR.....	17
Clonación del gen <i>cob</i> de <i>vid</i>	18
Ligación y Transformación.....	19
Extracción de ADN plasmídico.....	20
Análisis de clones recombinantes.....	21
Secuenciación de clones recombinantes.....	22
Secuenciación de productos de PCR del gen <i>cob</i>	23
Análisis de secuencias nucleotídicas de <i>cob</i>	24
Extracción de ARN total de <i>vid</i>	24
Amplificación del ARNm de <i>cob</i> por transcripción reversa-PCR (RT-PCR).....	25
Secuenciación y análisis de los ADNc de <i>cob</i>	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
Extracción de ADNg y amplificación del gen <i>cob</i> de <i>vid</i> por PCR.....	28
Clonación.....	31
Obtención de las secuencias nucleotídicas del gen <i>cob</i> de <i>vid</i>	34
Validación de la secuencia nucleotídica de <i>cob</i> de <i>vid</i> a partir de muestras individuales.....	36
ARN total de <i>Vitis vinifera</i> L. y análisis de la amplificación de los ADNc de <i>cob</i> de <i>vid</i>	41
Identificación y cuantificación de los sitios de edición del ARNm de <i>cob</i>	43
Comparación de la secuencia de aminoácidos del COB de <i>vid</i> con el COB de otros organismos.....	49
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	51
BIBLIOGRAFÍA.....	52

LISTA DE TABLAS

Tabla I	Genes mitocondriales identificados en planta.....	11
Tabla II	Tamaño del gen <i>cob</i> en algunas especies vegetales.....	14
Tabla III	Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen <i>cob</i> de vid.....	18
Tabla IV	Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de clones recombinantes.....	23
Tabla V	Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de productos de PCR del gen <i>cob</i> de vid.....	23
Tabla VI	Sitios y frecuencia de edición de <i>cob</i> en especies de plantas.....	47
Tabla VII	Cambios de aminoácidos de COB debidos al proceso de edición.....	48

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1	Estructura del complejo multienzimático <i>bc_I</i>	8
Fig. 2	Electroforesis en gel de agarosa al 1% de ADN _g de vid.....	29
Fig. 3	Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación por PCR del gen <i>cob</i> de vid.....	30
Fig. 4	Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los ADN _p para la identificación de plásmidos recombinantes (clones de <i>cob</i>).....	32
Fig. 5	Análisis electroforético en gel de agarosa al 1% de los plásmidos recombinantes digeridos y sin digerir del gen <i>cob</i>	33
Fig. 6	Estrategia de secuenciación del gen <i>cob</i> para las variedades de vid Perlette y Sugraone.....	34
Fig. 7	Diferencias entre las secuencias nucleotídicas del gen <i>cob</i> de tres variedades de vid.....	35
Fig. 8	Alineamiento de secuencias consenso de <i>cob</i> de muestras individuales de vid secuenciadas con los oligonucleótidos <i>cytb-f</i> y COB460.....	37
Fig. 9	Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas del gen <i>cob</i> de 5 variedades de vid.....	38
Fig. 10	Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del ARN total de vid.....	41
Fig. 11	Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de los ADN _c de <i>cob</i> obtenidos por transcripción reversa-PCR.....	42
Fig. 12	Comparación de la secuencia nucleotídica de los clones genómicos y ADN _c de <i>cob</i> de vid.....	44
Fig. 13	Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos del COB de vid con COB de otros organismos.....	50

RESUMEN

El gen mitocondrial citocromo b (cob) codifica para la enzima citocromo b (COB). la cual forma parte del centro catalítico del complejo III (bc₁) de la cadena respiratoria. En el presente trabajo se caracterizó el gen cob de 5 variedades de vid. Para lo cual se diseñaron oligonucleótidos para amplificar por PCR el gen cob del ADN de las variedades Princess, Perlette, Black Seedless, Flame Seedless y Sugraone, para posteriormente clonarlo y secuenciarlo. Por otra parte, se extrajo ARN total de vid y se sintetizó el ADN complementario (ADNc) de cob por transcripción reversa-PCR para determinar los sitios de edición de su ARNm. La secuencia nucleotídica del gen cob de las variedades Flame Seedless, Black Seedless y Princess se obtuvo a partir de los clones recombinantes y para el caso de las variedades Sugraone y Perlette la secuenciación fue directamente de los productos de PCR. El tamaño del gen cob de las 5 variedades de vid fue de 1182 pb con un marco de lectura continuo que codifica para 393 aminoácidos. No se encontraron polimorfismos en la secuencia nucleotídica de cob de las 5 variedades. Por otro lado, se encontraron 21 sitios de edición en el ARNm los cuales incrementaron la identidad de la secuencia de aminoácidos do COB de vid con COB de otros organismos.

INTRODUCCIÓN

La vid (*Vitis vinifera* L.) es una de las especies frutales de gran importancia porque constituye la base de las industrias más importantes del mundo (Reynier, 2002). A la fecha existen más de 15000 cultivares de vid, como resultado de mutaciones y cruzas entre variedades (Siles *et al.*, 2000). No obstante, estas cruzas han provocado que la diferenciación entre variedades de vid con apariencias muy similares sea muy complicada (Moreno *et al.*, 1995).

Actualmente es de gran importancia identificar correctamente las variedades de vid, debido a las nuevas regulaciones internacionales de comercio y al etiquetado de los vinos (Meredith, 2001). Anteriormente, la diferenciación de variedades se realizaba mediante la evaluación de los caracteres morfológicos de las plantas (métodos ampelográficos) (Siles, 2000). Sin embargo, a veces era difícil diferenciar clones de la misma variedad o cultivares muy cercanos (Moreno *et al.*, 1995). Por otra parte, estos criterios eran ambiguos porque carecían de definición y objetividad debido a las influencias ambientales (Tessler *et al.*, 1999).

Afortunadamente la aparición de los marcadores moleculares ayudó a eliminar los inconvenientes de una selección basada en el fenotipo, e identificar especies y variedades de una forma más repetitiva y rigurosa (Jones *et al.*, 1997). Los marcadores moleculares facilitaron la investigación para descubrir los orígenes y crear nuevas y mejores variedades (Meredith, 2001). En la actualidad para distinguir variedades de vid se utilizan los microsatélites, (SSR, siglas en inglés) (Sefc *et al.*, 1998; Meredith, 2001), ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD, siglas en inglés) (Moreno *et al.*, 1995) y Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP, siglas en inglés) (Bourquin, *et al.*, 1993). Sin embargo, se necesitan buscar alternativas rápidas y económicas para la diferenciación de variedades de vid (Tessier *et al.*, 1999; Siles *et al.*, 2000).

Una buena alternativa es el empleo de secuencias de genes mitocondriales. La secuenciación de genes, ha ayudado a comprender procesos evolutivos al determinar el porcentaje de identidad en sus secuencias nucleotídicas y encontrar su función (Muse, 2000). En particular las secuencias de los genes mitocondriales en plantas han ayudado a realizar estudios filogenéticos (Hiesel *et al.*, 1994). No obstante, estos análisis se deben realizar a partir de las secuencias del ARN mensajero debido al proceso de edición que existe en los genes mitocondriales de plantas (Hanson *et al.*, 1996).

Hasta el momento es muy poca la información de genes mitocondriales en vid, solo se ha secuenciado un fragmento del gen ARNr 18S en vid (Bertsch *et al.*, 2001). Por tal motivo, en el presente trabajo se caracterizó el gen mitocondrial citocromo *b* (*cob*) de vid (*Vitis vinifera* L.) y se evaluó su uso para diferenciar molecularmente 5 variedades de uva de mesa. Además, se determinó la secuencia nucleotídica del ARNm de *cob* para identificar los sitios de edición y deducir la secuencia de aminoácidos del COB.

ANTECEDENTES

Variedades de vid (*Vitis vinifera* L.)

La variedad es el término utilizado por el viticultor para designar un cultivar de vid. Anteriormente, la variedad se definía como un conjunto de individuos con caracteres morfológicos y tecnológicos comunes, que podían compartir el mismo nombre. Así, la variedad cultivada era en general una población de clones (variedad policlonal) en la que el clon designa el conjunto de copias exactas de la descendencia por vía vegetativa de una cepa madre. Actualmente, las variedades de una región de producción vitícola provienen de una o varias familias de variedades autóctonas, así como de importaciones procedentes de otras regiones o de otros países (Reynier, 2002).

Origen

La *Vitis silvestris* reagrupa las formas silvestres o lambruscas de *Vitis viniferas*. Las lambruscas son plantas dioicas cuyos frutos ácidos y poco azucarados solo se producen en las plantas femeninas. El número y la diversidad de formas, las semillas y las mutaciones han favorecido la aparición de formas hermafroditas (monoicas) más interesantes para el cultivo. Las variedades provienen así, de la selección hecha en estas poblaciones de lambruscas. Las variedades actuales provienen de la evolución y de la selección de las lambruscas indígenas, así como del cruzamiento natural de estas formas con las variedades importadas en diferentes épocas (Reynier, 2002). En el estado de Sonora las variedades de uva de mesa que más se cultivan son: Black Seedless, Perlette, Flame Seedless, Princess y Sugraone (Asociación Agrícola Local de productores de Uva de mesa, <http://www.aalpum.com.mx>).

Identificación

La ampelografía es la ciencia que estudia las diferentes variedades de vid y su nombre proviene del griego: *ampelos*, que significa "vid" y *grafos*, que significa "descripción". Tradicionalmente la identificación de variedades y clones de vid se realizaba por caracteres morfológicos en diferentes órganos de las plantas: hojas, bayas, raíces etc. (Reynier, 2002). Por otra parte, los criterios utilizados para la diferenciación de variedades de vid causaban ambigüedad, debido a las influencias ambientales (Tessier *et al.*, 1999).

Actualmente, se analiza el ADN para descubrir los orígenes y diferenciar variedades de vid (Meredith, 2001). Entre las técnicas más utilizadas se encuentran los microsatélites, (SSR, siglas en inglés) (Sefc *et al.*, 1998; Meredith, 2001), el ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD, siglas en inglés) (Moreno *et al.*, 1995) y Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP, siglas en inglés) (Bourquin, *et al.*, 1993). Sin embargo, estos métodos, poseen algunas ventajas y desventajas que se mencionan a continuación.

Microsatélites. Han sido muy utilizados para la identificación de variedades de vid, por ser muy polimórficos, específicos del locus y de herencia co-dominante (Meredith, 2001). Sin embargo, para diferenciar cultivares estrechamente relacionados (variedades sin semilla), son imprácticos porque requiere el análisis de una gran cantidad de locus y por lo tanto consumen mucho tiempo (Jones *et al.*, 1997; Sefc *et al.*, 1998; Siles *et al.*, 2000).

RAPD. Esta es una técnica, basada en la PCR y permite amplificar al azar segmentos inespecíficos del ADN genómico, creando de esta manera una huella única de marcadores polimórficos de ADN de doble cadena (Moreno *et al.*, 1995). Desafortunadamente, debido a la baja astringencia (T_m 30-35°C), el iniciador se puede unir de manera inespecífica a otras secuencias y esto

produce, resultados variables entre laboratorios (Jones *et al.*, 1997; Siles *et al.*, 2000).

RFLP. Esta técnica se basa en la detección de fragmentos de ADN de distinto tamaño (por digestión de enzimas de restricción) en diferentes organismos. Por otra parte, se requieren grandes cantidades de ADN y se consume mucho tiempo.

Debido a lo anterior, es recomendable buscar nuevas alternativas de diferenciación de variedades de vid en la región. Para ello, se recomienda el uso de genes que se codifican en el genoma de la mitocondria. Uno de los genes mitocondriales más estudiados es el gen citocromo *b* (*cob*). Este gen es uno de los más caracterizados en mamíferos y plantas (Zheng y Köller., 1997; Kroymann y Zetsche., 1997; Dawson *et al.*, 1984) y puede ser una nueva alternativa para la diferenciación de variedades de vid.

Mitocondria

Estructura y función

Las mitocondrias son organelos encargados de suministrar la mayor parte de la energía en forma de ATP, necesaria para la actividad celular (Wolstenholme y Fauron, 1995). Contienen dos membranas: una externa que limita al organelo y una interna que se proyecta hacia el interior en forma de crestas. El espacio entre estas dos membranas, es llamado espacio intermembranal. La membrana externa contiene proteínas de transporte, que permiten el paso de moléculas desde el citoplasma hasta el espacio intermembranal. La membrana interna contiene en su interior a la matriz en la cual se encuentran las enzimas encargadas del metabolismo energético, los ribosomas y varias copias del genoma mitocondrial (Lehninger, 1999). Algunos

vegetales contienen adicionalmente ADN ó ARN circular ó lineal, que parece replicarse de manera independiente al genoma mitocondrial (Wolstenholme y Fauron, 1995).

En la membrana interna se lleva a cabo la fosforilación oxidativa acoplada al transporte de electrones por los complejos multienzimáticos I, II, III, IV y la ATP sintetasa (ATPasa) (Saraste, 1999). Los complejos I (NADH deshidrogenasa) y II (Succinato deshidrogenasa) catalizan la oxidación de NADH y succinato, respectivamente, y transportan dos electrones a la ubiquinona para formar ubiquinol. El complejo III (citocromo bc_1) transfiere los electrones desde el ubiquinol hasta el citocromo c. Este último transporta los electrones hasta el complejo IV (citocromo c oxidasa) donde reduce el oxígeno hasta formar agua. Los complejos I, III y IV generan un gradiente electroquímico de protones en la superficie de la membrana interna, que se utiliza para la síntesis de ATP por la ATPasa (Lehninger, 1999). Adicionalmente, las mitocondrias de plantas contienen por lo menos dos tipos de enzimas NAD(P)H deshidrogenasas y una oxidasa alternativa (Mackenzie y McIntosh, 1999). Esta vía no involucra al citocromo oxidasa ni genera un gradiente de protones, por lo tanto, la energía que se libera es en forma de calor (Vedel *et al.*, 1999).

Localización y función del citocromo *b* (COB) en la mitocondria

El citocromo bc_1 es un dímero con 2 subunidades idénticas que contiene tres sitios catalíticos (citocromo b, proteína hierro sulfonada y citocromo c_1) y siete u ocho sitios no catalíticos (Fig. 1) (Saint-Georges *et al.*, 2002). El COB es la única proteína transmembranal del complejo y posee dos grupos hemo (b_L y b_H) (Di Rago *et al.*, 1989; Matsuno-Yagi y Hatefi, 2001). El complejo posee además dos sitios de unión al ubiquinol: El sitio Q_p (cerca del espacio intermembranal) y el sitio Q_n (cerca de la matriz). La oxidación del ubiquinol en el sitio Q_n libera dos electrones; uno se transfiere a la proteína hierro sulfonada,

después al citocromo c_1 y finalmente al citocromo c . El segundo electrón se transfiere al grupo hemo bL , después al grupo hemo bH y por último a la ubiquinona en el sitio Q_p . El mecanismo por el cual se transfieren los electrones al citocromo oxidasa, involucra al ciclo de la ubiquinona (Trumpower, 1990).

El COB tiene una participación muy importante dentro del complejo porque sus grupos hemo, son determinantes para la forma de los sitios Q_p y Q_n (Saint-Georges *et al.*, 2002; Trumpower, 1990). Estos sitios son un blanco específico para inhibidores que bloquean el transporte de electrones (Von Jagow *et al.*, 1984). Estos inhibidores incluyen a la antimicina y funiculosinas que se unen al sitio Q_n y al mixotiazol y estrobolurina A que se unen al sitio Q_p (Di Rago *et al.*, 1989). El COB es la única proteína del complejo que se codifica en el genoma mitocondrial (Saint-Georges *et al.*, 2002; Gutweniger *et al.*, 1981).

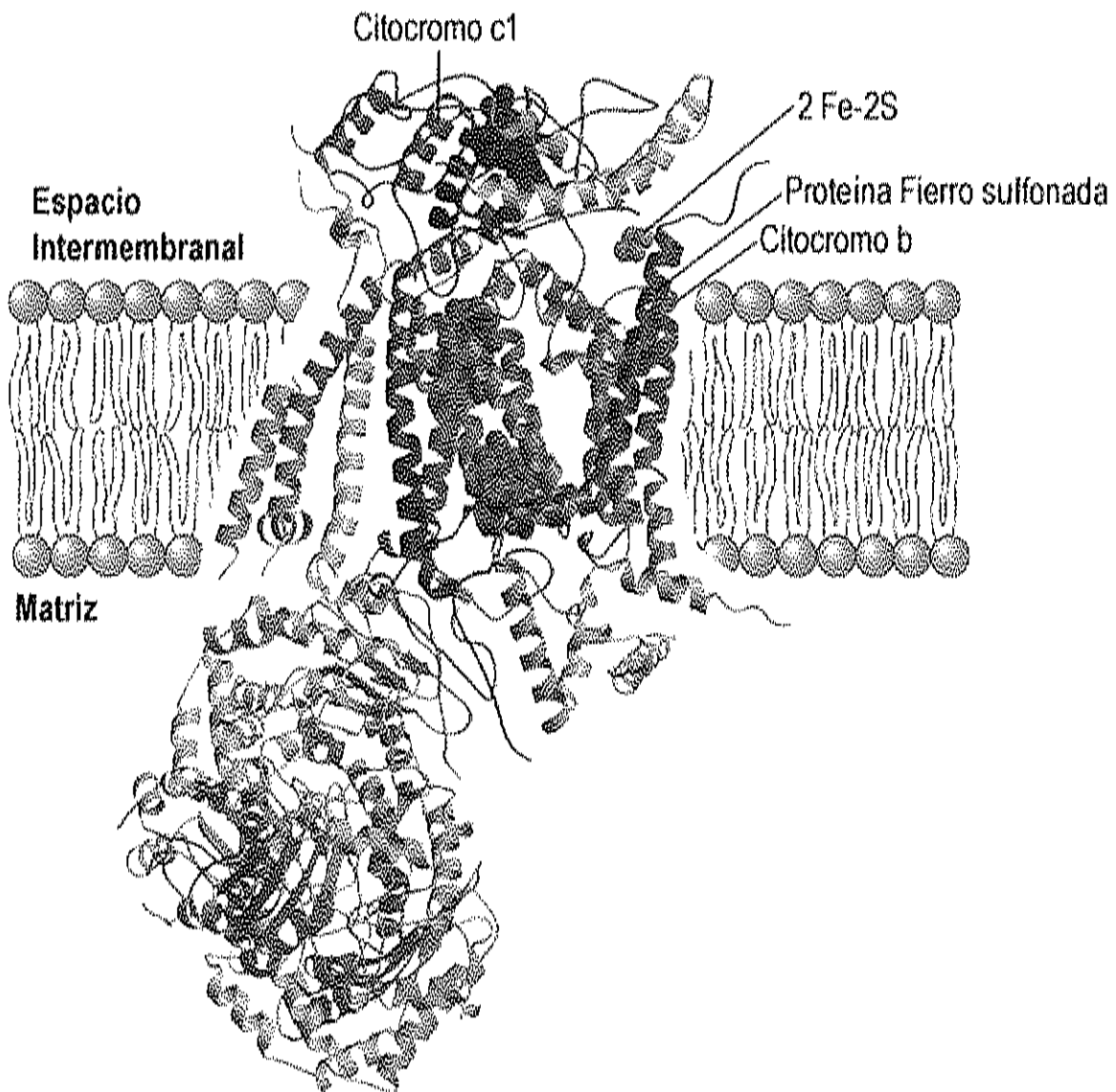


Figura 1: Estructura del complejo multienzimático bc_1

Fuente: Lehninger, 1999.

Genoma mitocondrial en plantas

Importancia del estudio del genoma mitocondrial en plantas

La función de la mitocondria ha sido muy estudiada en plantas, por su papel en la respiración (Buchanan *et al.*, 2000) y por la relación que existe entre la organización de sus genes con la susceptibilidad a enfermedades. A través de los años se ha demostrado que el polen defectuoso heredado maternalmente se asocia con cambios en los genomas mitocondriales. Esto se descubrió hace casi 30 años cuando se asoció la sensibilidad a clorosis en hojas de maíz y la esterilidad citoplasmática de polen (CMS) tipo T (Levings y Pring, 1976). Con este descubrimiento se mostró la importancia de la mitocondria y se impulsó la investigación de los genomas mitocondriales en plantas a nivel molecular.

Tamaño y forma molecular

El genoma mitocondrial (ADNmt) de plantas, es más grande y complejo comparado con el de animales (14-42 Kb) y hongos (18-176 Kb) (Backert *et al.*, 1997; Handa *et al.*, 1998; Oda *et al.*, 1992). Su tamaño varía desde 200 Kb como en especies de *Oenothera* y *Brassica*, hasta 2000 Kb como en melón (*Cucumis melo* L.) (Oda *et al.*, 1992; Handa *et al.*, 1998; Notsu *et al.*, 2002). Estas diferencias, se deben a la abundancia de secuencias intergénicas no codificantes, intrones, ADN de origen extramitocondrial (núcleo y cloroplasto) y genes funcionales ausentes en otras especies (Handa *et al.*, 1998; Kubo *et al.*, 2000; Vaillílingo *et al.*, 1998; Quiñones *et al.*, 1996; Zhuo y Bonen, 1993). Por otra parte, a pesar de su gran dimensión, el ADNmt, solo codifica para un pequeño número de ARN ribosomales, ARN de transferencia, proteínas ribosomales y del transporte de electrones (Wolstenholme y Fauron, 1995). Finalmente, aunque el ADN mitocondrial es pequeño comparado con el genoma

nuclear, su función es esencial en los todos los organismos eucariotes donde se encuentra (Buchanan *et al.*, 2000).

La complejidad y organización del ADNmt en plantas se ha determinado mediante mapeo de clones en cósmidos con enzimas de restricción, análisis de Southern blot y microscopía electrónica entre otros (Backert *et al.*, 1997). El ADNmt de plantas está formado por una gran molécula circular llamada cromosoma maestro y una colección de círculos pequeños que interactúan libremente con él (Robinson y Wolyn, 2002). Estos círculos contienen información limitada del cromosoma maestro y parecen derivarse de él, por recombinación homóloga (Robinson y Wolyn, 2002; Wolstenholme y Fauron., 1995). Sin embargo, esta organización no se cumple en todos los casos, ya que en *Nicotiana plumbaginifolia*, estos círculos subgenómicos no se han encontrado (Backert *et al.*, 1997).

Genes mitocondriales

Los genes codificados en el ADNmt son llamados genes mitocondriales (Tabla I) y poseen una velocidad de mutación nucleotídica muy baja, comparada con los genes nucleares (Städler y Delph, 2002). La identificación de estos genes, ha sido posible mediante la secuenciación completa de los genomas mitocondriales. A la fecha se han secuenciado los ADNmts de *Marchantia polymorpha* (Oda *et al.*, 1992), *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) (Unseld *et al.*, 1997), remolacha (*Beta vulgaris* L.) (Kubo *et al.*, 2000) y arroz (*Oriza sativa*) (Notsu *et al.*, 2002). Con esta información también se determinó su potencial codificante y la expresión y migración de sus genes. La presencia, ausencia e integridad de genes mitocondriales, varía en cada especie de planta.

Tabla I. Genes mitocondriales identificados en plantas

Producto para el que codifica	Genes
Aparato de transcripción	
ARNr	<i>rrn5, rrn18, rrn26</i>
Proteínas ribosomales	
Subunidad pequeña	<i>rps1, rps2, rps3, rps4, rps7, rps8, rps10, rps11, rps12, rps13, rps14, rps19</i>
Subunidad grande	<i>rpl1, rpl2, rpl5, rpl6, rpl16</i>
ARNI	Por lo menos 19
Subunidades de los complejos del transporte de electrones	
Complejo I	<i>nad1, nad2, nad3, nad4, nad4L, nad5, nad6, nad7, nad9</i>
Complejo II	<i>sdh4</i>
Complejo III	<i>cob</i>
Complejo IV	<i>coxI, coxII, coxIII</i>
ATPasa	<i>atp1, atp6, atp8, atp9</i>
Biogénesis del citocromo c	<i>ccb206, ccb228, ccb438, ccb577</i>

Fuente: Oda *et al.*, 1992; Unseld *et al.*, 1997; Kubo *et al.*, 2000; Notsu *et al.*, 2002.

Expresión

Los genes mitocondriales de las plantas poseen un modo específico de expresión genética en donde existen intrones con splicing *cis* y *trans*, edición del ARN y utilización de un código genético mitocondrial (Schuster y Brennicke, 1994). El splicing *trans* involucra un splicing intermolecular de exones de diferentes moléculas de ARN y se ha identificado en los genes *nad1*, *nad5*, *nad2* de vegetales (Schuster y Brennicke, 1994). La edición de ARNm en las mitocondrias de las plantas involucra un cambio post-transcripcional de citocina por uracilo y ocasionalmente de uracilo por citocina. Como resultado de la edición de ARN se producen cambios en los aminoácidos codificados o se crean codones de iniciación y terminación nuevos (Binder y Brennicke, 2003; Hanson *et al.*, 1996). El código genético mitocondrial se propuso en plantas, debido a que el codón CGG (codifica para arginina) codificaba para triptofano (TGG) en plantas. Sin embargo, actualmente se conoce que el código genético universal no difiere al código genético mitocondrial de las plantas, pero que algunos codones CGG especifican al UGG, como resultado de la edición del ARNm. (Hanson *et al.*, 1996). Todos los ARNs mitocondriales pueden ser editados, siendo los ARNm los que más se procesan (Binder y Brennicke, 2003; Hanson *et al.*, 1996).

Por otra parte la expresión de genes mitocondriales está finamente coordinada con la expresión de genes nucleares. La dependencia de la expresión genética de la mitocondria de la del núcleo se ha investigado ampliamente en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Chen *et al.*, 1999; Islas-Osuna *et al.*, 2003); donde mutaciones puntuales en genes mitocondriales se suprimen mediante mutaciones en genes nucleares que codifican para proteínas mitocondriales. Esto sugiere que existen interacciones entre genes y proteínas codificados en ambos genomas. Sin embargo, la forma en que se coordina la expresión de los genomas mitocondriales y nucleares no se ha determinado aún en vegetales.

Migración

Durante la evolución, la mayor parte del material genético presente en el endosimbionte ancestral (mitocondria) se perdió o migró hacia el genoma nuclear (Sandoval *et al.*, 2003). De esta manera, los genomas mitocondriales actualmente contienen una sola fracción de genes que estaban presentes en el endosimbionte (González-Halphen, 2003). Estudios con hibridización de Southern blot en plantas angiospermas, revelaron que una gran cantidad de los genes mitocondriales (16) que codifican para proteínas ribosomales migraron al genoma nuclear (Adams, 2003). Entre algunos ejemplos podemos mencionar a los genes: *rps12* en *Oenothera* (Grohmann *et al.*, 1992), *rpl5* y *rps14* en pasto (Sandoval *et al.*, 2003). De los genes que codifican para proteínas del transporte de electrones, actualmente solo se ha identificado la migración del gen citocromo *c* oxidasa subunidad II (*coxII*) en leguminosas (Adams *et al.*, 1999).

Gen citocromo *b* (*cob*)

El gen *cob* codifica para la proteína citocromo *b* (COB) del complejo III del transporte de electrones y se ha secuenciado en hongos, algas, mamíferos, invertebrados y plantas. En hongos y algas posee una organización compleja y un gran tamaño por la presencia de intrones (Zheng y Köller., 1997; Kroymann y Zetsche., 1997) mientras que en mamíferos y plantas es relativamente simple y más pequeño por la ausencia de intrones (Dawson *et al.*, 1984). Por otra parte, las secuencias nucleotídicas del gen *cob* en las especies vegetales muestran un porcentaje de identidad muy alto (93-96%). En la Tabla II se muestran los tamaños del gen *cob* de diferentes especies de plantas.

El proceso de edición del ARNm se ha encontrado en el gen *cob* de arroz (Ito *et al.*, 1996), enotera (*Oenothera berteriana*) (Schuster *et al.*, 1990), trigo (*Triticum aestivum*), Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) (Giegé y Brennicke.,

1999) y papa (*Solanum tuberosum*) (Zanlungo *et al.*, 1993), donde se encontraron seis sitios de edición idénticos entre las cinco plantas, nueve en arroz y trigo (monocotiledonias) y uno en papa y enotera (dicotiledoneas). A la fecha, no se ha reportado la secuencia nucleotídica del gen *cob* de vid, ni la edición de su ARNm.

Tabla II. Tamaño del gen *cob* en algunas especies vegetales

Planta	Tamaño (pb)	Clave de acceso en GenBank
Arroz	1194	D83009
Enotera	1185	X07126
Papa	1182	X58437
Tabaco	1182	U92011
Arabidopsis	1182	X67736
Calabaza	1178	AY305268.1

pb: pares de bases.

HIPÓTESIS

El gen *cob* de *Vitis vinifera* L. es similar en tamaño y secuencia nucleotídica al de otras plantas y su ARNm posee sitios de edición comunes entre estas; sin embargo, su secuencia nucleotídica difiere lo suficiente como para diferenciar variedades de vid.

OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar el gen *cob* de vid (*Vitis vinifera* L.) y evaluar su aplicación para identificar variedades a nivel molecular y localizar los sitios de edición de su ARNm.

Objetivos específicos

- Extraer el ADN genómico de vid y amplificar el gen *cob* de las variedades Perlette, Princess, Flame Seedless, Sagraone y Black Seedless.
- Clonar y secuenciar el gen *cob* de las diferentes variedades de vid y comparar sus secuencias nucleotídicas.
- Determinar los sitios de edición del ARNm de *cob* de vid.
- Comparar la secuencia de aminoácidos deducida para COB de vid con COB de otras especies de plantas y con COB de otros organismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de hojas de vid

Se recolectaron al azar hojas jóvenes de cinco variedades de vid (Princess, Black Seedless, Flame Seedless, Perlette y Sugraone) en el viñedo comercial Rancho Sonora, ubicado en Pesqueira, Sonora. Estas se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta su análisis. A partir de estas muestras, se obtuvo el ADN genómico (ADNg) de cada variedad.

Extracción de ADN genómico

Las extracciones de ADNg de las cinco variedades de vid se realizaron mediante el método descrito por Lodhi *et al.*, (1994). Las hojas congeladas de vid (*Vitis vinifera* L.) se pulverizaron en un mortero en presencia de nitrógeno líquido. Se pesaron 200 mg del polvo en un microtubo estéril y se adicionaron 400 μL del buffer de extracción (Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA 20 mM pH 8, NaCl 1.4 M, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) al 2% y β -mercaptoetanol al 0.2%). El β -mercaptoetanol se agregó al buffer de extracción justo antes de empezar la preparación del ADNg.

Las muestras se mezclaron con 200 μL de polivinilpolipirrolidona (PVPP) al 10% y se incubaron a 60°C durante 25 minutos. Posteriormente, se dejaron enfriar a temperatura ambiente; se les añadieron 600 μL de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se mezclaron suavemente hasta formar una emulsión. Las mezclas fueron centrifugadas a $6000 \times g$ por 15 minutos y la fase acuosa se transfirió a un microtubo estéril. A éste se le añadieron 0.5 volúmenes de NaCl 5 M (300 μL) y 2 volúmenes de etanol frío al 95% (900 μL) y se refrigeraron a

4°C por 5 minutos. Las muestras fueron centrifugadas de nuevo por 10 minutos a 10500 x *g* y el precipitado obtenido se lavó dos veces con etanol frío al 76%.

Después de secarse al aire, los extractos fueron resuspendidos en 50 μ L del buffer TE (Trizma base 10 mM, HCl 10 mM y EDTA 1 mM, pH 8.0) y se incubaron con 1 μ L de ARNasa A (10 mg/mL) a 37°C por 15 minutos. El ADNg se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando 5 μ L del extracto con 1 μ L de buffer carga 6X (40% azul de bromofenol y 0.25% de sacarosa) y el estándar de masa molecular λ ADN/*Hind* III (Promega). El gel se fotografió en un transiluminador UV con una cámara digital (Kodak Digital Science). Finalmente, la concentración del ADNg se determinó por espectrofotometría UV leyendo la longitud de onda de 260 nm, mientras que la pureza se determinó por la relación de absorbancias $A_{260/280}$.

Amplificación del gen *cob* por PCR

Para la amplificación del gen citocromo *b* (*cob*) de las cinco variedades de vid se utilizaron los oligonucleótidos *cy1b-f* (sentido) y *CYB2-R* (antisentido) (Tabla III). Estos se diseñaron en base a regiones conservadas de las secuencias del gen *cob* de cinco especies de plantas: *Oenothera berteriana*, *Arabidopsis thaliana*, tabaco (*Nicotiana tabacum*), papa (*Solanum tuberosum*) y arroz (*Oriza sativa*) (números de acceso en GenBank: X07126, X67736, U92011, X58437 y D83009, respectivamente). Los oligonucleótidos se sintetizaron y purificaron por Sigma-Genosys (E.U.A).

Tabla III. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen *cob* de vid

Nombre	Posición en <i>cob</i> de vid	Secuencias 5' - 3'	Temp. fusión	%GC
cytb-f	1-21	ATG ACT ATA AGG AAC CAA CGA	55,6°C	40
CYB2-R	1165-1182	TCA GGT GTG ATC AGT CTC	53,7°C	50

A las reacciones de amplificación se les agregaron 10 μ L del buffer de PCR 10X (Tris-HCl 100 mM pH 8.3, KCl 500 mM), 3 μ L de MgCl₂ (50 mM), 1 μ L de cada oligonucleótido (100 pmol/ μ L), 2 μ L de mezcla de dNTPs (10 mM), 1 μ L de ADNg (100 ng/ μ L) como molde y 2.5 U de ADN polimerasa *Taq* (Invitrogen) en un volumen final de 100 μ L. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Perkin Elmer Cetus 480, programado para iniciar a 94°C por 3 min y 25 ciclos con 94°C, 45 s; 50°C, 30 s; 72°C, 2 min y una extensión final de 72°C por 7 min.

El análisis de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer TBE 0.5X (Tris-borato 0.045 M, EDTA 0.001 M). Se analizaron 15 μ L de las reacciones de PCR, con 3 μ L de buffer carga 6X y como estándar de masa molecular λ ADN/*Hind* III- Φ X174/*Hae* III (Promega). El gel se tiñó con bromuro de etidio y se fotografió en un transiluminador UV con una cámara digital (Kodak, USA).

Clonación del gen *cob* de vid

Los amplicones (*cob*) de las variedades de vid se clonaron en el vector de clonación pCR[®]2.1 con el sistema de clonación T-A (TA Cloning, Invitrogen, Carlsbad, CA). Este plásmido contiene un sitio múltiple de clonación, el

promotor T7, genes de resistencia a kanamicina y ampicilina y el gen *LacZ* que codifica para la subunidad α de la β -galactosidasa. Cuando la secuencia del gen *LacZ* se interrumpe por un inserto de ADN, la bacteria no produce la β -galactosidasa y aparecen colonias de color blanco en el medio, en presencia del indicador X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactósido). Por el contrario, la ausencia del inserto en el vector produce a la β -galactosidasa la cual hidroliza el X-gal produciendo un color azul, por lo que las colonias aparecen de este color en el medio de cultivo. La clonación se llevó a cabo mediante dos pasos: Reacción de ligación de los productos amplificados por PCR y transformación de bacterias quimiocompetentes *E.coli* TOP 10 (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Ligación y Transformación

El fragmento obtenido por PCR (*cob*) fue ligado al vector de clonación pCR[®]2.1 (25 ng/ μ l) (TA-Cloning, Invitrogen, Carlsbad, CA), con la enzima T4 ADN ligasa. El vector y el inserto se disolvieron en agua estéril en una proporción molar 1:1, se añadieron 1 μ L de buffer de ligación 10X (Tris-HCl 60 mM pH 7.5, MgCl₂ 60 mM, NaCl 50 mM, 1 mg/mL de albúmina de suero de bovino (BSA), β -mercaptoetanol 70 mM, ATP 1 mM, ditiotretol 20 mM y espermidina (10 mM), y 1 μ L de la T4 ADN ligasa (4 U/ μ L), el volumen final de la reacción fue de 10 μ L. La reacción de ligación se incubó toda la noche a 14°C y se introdujo en bacterias *E. coli* competentes TOP 10 mediante un proceso llamado transformación, siguiendo las instrucciones de Invitrogen.

Brevemente, las reacciones de ligación se centrifugaron a 12000 x g por 15 segundos y se depositaron en hielo. Los viales de las células competentes *E.coli* TOP 10 que estaban almacenadas a -80°C, se colocaron en el hielo para su descongelación (~ 5-10 min). Se pipetearon 2 μ L de cada reacción de ligación directamente en el vial de las células competentes TOP 10 y se

mezclaron suavemente con la punta de la micropipeta. Se incubaron por 40 minutos en hielo, se les dió un choque térmico por 30 segundos en baño de agua a 42°C y se colocaron nuevamente en el hielo por 2 minutos. Se les adicionaron 250 µL del medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10mM, MgSO₄ 10 mM y glucosa 20 mM) y se agitaron horizontalmente por 1 hora en un agitador (VWR) a 225 rpm a 37°C.

Se sembraron de 10 a 200 µL de cada vial de transformación por separado, en placas de LB (10 g Triptona, 5 g extracto de levadura, 5 g NaCl, 1 mL de NaOH 1 N y 15 g de agar en 1 litro) conteniendo cada una 100 µg/mL de ampicilina y 40 µL X-gal (40 mg/mL). Las placas se incubaron a 37°C de 16 a 18 horas y posteriormente se almacenaron a 4°C hasta el análisis de las colonias blancas (recombinantes).

Extracción de ADN plasmídico

Para la extracción de ADN plasmídico (ADNp) de las colonias transformadas de *E.coli* TOP 10, se seleccionaron 10 colonias blancas que podrían tener el inserto ligado al vector. Cada colonia fue muestreada con un palillo de madera estéril y se inocularon en tubos conteniendo 3 mL del medio LB (10 g Triptona, 5 g extracto de levadura, 5 g NaCl y 1 mL de NaOH 1 N en 1 litro) conteniendo 100 µg/mL de ampicilina. Estos tubos se incubaron a 37°C con agitación a 225 rpm por 18 horas.

A la mañana siguiente se transfirieron 1.5 mL de cada cultivo a un microtubo y se centrifugaron por 30 segundos a 12000 x g. Las bacterias (sedimento) se resuspendieron en 100 µL de la solución I fría (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, pH8, EDTA 10 mM pH 8) y se incubaron en hielo por 10 minutos. Terminado el tiempo se agregaron 200 µL de la solución II recién preparada (NaOH 0.2 N, SDS al 1%) y se incubaron a 4°C por 10 minutos.

Posteriormente se mezclaron con 150 μL de la solución III fría (acetato de potasio 3 M, ácido acético glacial al 11.5%), se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente y fueron centrifugados por 10 minutos a 12000 x g . El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, donde se agregaron 270 μL de isopropanol. Se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos y fueron centrifugados por 10 minutos a 12000 x g . Por último el sedimento se lavó con alcohol al 70% y se dejó secar al aire libre a temperatura ambiente por 30 minutos y se resuspendió en 50 μL de agua estéril.

Para obtener ADN plasmídico de mayor pureza, las muestras se llevaron a un volumen final de 100 μL con agua estéril. Se mezclaron con 100 μL de fenol-cloroformo (1:1) y se centrifugaron por 5 minutos a 12000 x g . A los sobrenadantes se les añadieron 100 μL de cloroformo y se centrifugaron por 5 minutos a 12000 x g ; este paso se repitió dos veces. A la fase acuosa se le añadieron 10 μL de acetato de sodio 3 M (pH 5.2), 250 μL de etanol absoluto y se incubó a -20°C por 30 minutos. Terminado el tiempo de incubación, se centrifugó por 10 minutos a 12000 x g y el precipitado se lavó 2 veces con 250 μL de etanol al 70%. Por último el ADNp se resuspendió en 15 μL de agua estéril. El análisis del ADNp se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con 5 μL de ADNp y 1 μL de buffer carga 6X y como estándar de masa molecular $\lambda\text{ADN}/\text{Hind-}\Phi\text{X174}/\text{Hae III}$.

Análisis de clones recombinantes

Para comprobar que el inserto (*cob*) se ligó al vector de clonación pCR[®]2.1, se hicieron digestiones con endonucleasas de restricción. Debido a que este vector de clonación posee dos sitios de reconocimiento para la endonucleasa *Eco RI*, el vector se digirió con esta enzima. Las digestiones se realizaron con 1 μg de ADNp de los clones recombinantes, 0.2 μL de la enzima

Eco RI (12 U/ μ L) (Promega), 2 μ L del buffer H 10X (NaCl 50 mM, Tris-HCL 100 mM, MgCl₂ 10 mM, Tritón X-100 al 0.025% a pH 7.5), contenidos en un volumen final de 20 μ L. Los ADNp digeridos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Secuenciación de clones recombinantes

Los plásmidos que poseían el inserto del tamaño esperado se obtuvieron y purificaron con el sistema QIAGEN-tip 100 (Qiagen) a partir de cultivos de 25 mL. Las secuencias nucleotídicas del gen *cob* se obtuvieron mediante el método de terminación de cadena de dideoxidos (Sanger *et al.*, 1977) modificado en el Laboratorio de Secuenciación: Genomic Analysis and Technology Core (GATC) de la Universidad de Arizona en un secuenciador automático ABI PRISM[®]377 DNA Analyzer. Los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de los clones recombinantes fueron: T7 sentido, M13R antisentido, *cytb500-F* sentido y *cytb600-R* antisentido. Los dos primeros son universales y sus secuencias son adyacentes al sitio múltiple de clonación en el vector PCR[®]2.1. Los dos últimos, se diseñaron con base en las secuencias nucleotídicas obtenidas de los extremos del gen *cob* de *vid* con los oligonucleótidos T7 y M13R. En la Tabla IV se muestran las características de los oligonucleótidos que se utilizaron para la secuenciación de los clones recombinantes de *vid*.

Tabla IV. Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de clones recombinantes

Nombre	Secuencias 5'→3'	Temp. fusión	Posición en el gen
cytb500-F	GTT TCT CCG TGG ACA ATG	63.1°C	521-538
cytb600-R	GCA TTG TTC ACG GAG AAA C	63.1°C	539-521
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	48°C	"
M13R	AGG AAA CAG CTA TGA CCA TG	50°C	"

Secuenciación de productos de PCR del gen *cob*

Debido a que no se pudo clonar el gen *cob* de dos variedades de *vid*, se secuenciaron directamente sus productos de PCR. Para ello, se utilizaron los oligonucleótidos *cytb-f*, *CYB2-R*, *cytb500-F* y *cytb600-R* (descritos anteriormente) y adicionalmente se diseñaron los oligonucleótidos, *COB460R* antisentido y *COB790F* sentido. Estos fueron diseñados a medida que se obtenían las secuencias nucleotídicas del gen *cob* de las variedades de *vid* clonadas. En la Tabla V se muestran las características de estos oligonucleótidos.

Tabla V. Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de productos de PCR del gen *cob* de *vid*

Nombre	Secuencias 5'→3'	Temp. fusión	Posición en el gen
COB460R	CTA CAG GTA TGG CGC TAG C	53°C	469-487
COB790F	TAC CTG CTA ATC CGA TGC	58.3°C	791-808

Análisis de secuencias nucleotídicas de *cob*

Las secuencias nucleotídicas obtenidas del gen *cob* de las diferentes variedades de vid se compararon contra las secuencias depositadas en el banco de genes (GenBank) mediante el algoritmo Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Los alineamientos de las secuencias nucleotídicas de *cob* se realizaron mediante el algoritmo Clustal W 1.8 (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html>). La presentación final de las secuencias alineadas se realizó con el programa boxshade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_faq.html). También se utilizó el algoritmo Clustal W1.8 para comparar las secuencias de aminoácidos del COB de vid con la secuencia de aminoácidos del COB de otros organismos.

Extracción de ARN total de vid

Para la extracción de ARN total de vid se utilizó el método de López-Gómez y Gómez-Lim (1992). Las hojas congeladas de vid se pulverizaron en un mortero en presencia de nitrógeno líquido y se homogeneizaron con el buffer de lisis (Trizma-base 150 mM pH 7.5, EDTA 50 mM, SDS al 2% y β -mercaptoetanol al 1%). El β -mercaptoetanol se agregó al buffer de lisis justo antes de iniciar la extracción del ARN y se utilizaron 0.5 g de tejido vegetal por cada mL de buffer de lisis.

Al homogeneizado se le adicionaron 0.25 (125 μ L) volúmenes de etanol absoluto y 0.11 (55 μ L) volúmenes de acetato de potasio 5 M y se agitó en un vortex durante un minuto. A la mezcla se le realizó una extracción con 1 volumen (680 μ L) de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1) y se centrifugó a 20000 x *g* durante 10 minutos. Al sobrenadante se le realizó una segunda extracción con 1 volumen de fenol:cloroformo (1:1) y se centrifugó a 20000 x *g*

durante 5 minutos. Nuevamente a la fase acuosa se le realizó una tercera extracción con 1 volumen cloroformo:isoamílico (49:1) y se centrifugó a 20000 x *g* durante 5 minutos. La fase acuosa se transfirió cuidadosamente a un microtubo estéril y se le adicionó una solución de LiCl 8 M hasta obtener una concentración final de LiCl 3 M. Esta mezcla se incubó toda la noche a -20°C, para precipitar al ARN.

A la mañana siguiente las muestras se centrifugaron a 20000 x *g* durante 15 min. El precipitado se lavó 2 veces con 200 μ L de LiCl 3 M y luego se resuspendió en 100 μ L de agua estéril DEPC (dietilpirocarbonato) al 0.05%. Posteriormente se le adicionó acetato de potasio 5 M hasta obtener una concentración final de 0.3 M. Esta mezcla se incubó nuevamente toda la noche a -20°C con dos volúmenes de etanol absoluto.

A la mañana siguiente la mezcla se centrifugó a 20000 x *g* por 10 min y se lavó dos veces con 200 μ L de etanol al 75%. El precipitado (ARN) se resuspendió en 50 μ L agua estéril DEPC al 0.05%. La concentración de ARN extraído se cuantificó espectrofotométricamente (A_{260}) y su calidad de acuerdo a la relación $A_{260}/280$ (Sambrook *et al.*, 1989). Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso. Finalmente el ARN total se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, utilizando 3 μ L del extracto con 1 μ L de buffer carga 6X (40% azul de bromofenol y 0.25% de sacarosa) y el estándar de masa molecular λ ADN/*Hind* III- Φ X174/*Hae* III.

Amplificación del ARNm de *cob* por transcripción reversa-PCR (RT-PCR)

En un microtubo estéril se mezclaron 5 μ g (5 μ L) de ARN total con 2 μ L (100 pmol/ μ l) del oligonucleótido CYB2-R y se incubaron a 70°C por 5 minutos. Después se incubaron en hielo por 5 minutos y se le agregaron 2.5 μ L de dNTPs (10 mM), 2.5 μ L de transcriptasa reversa-AMV (10 U/ μ L) (Promega) y 3

μ L de buffer AMV-RT (Tris-HCl 250 mM pH 8.3, KCl 250 mM, MgCl₂ 50 mM, espermidina 25 mM y DTT 50 mM) y se incubaron a 42°C por una hora.

Para las reacciones de amplificación (PCR) se tomó 1 μ L del ADNc y se mezcló con 10 μ L del buffer de PCR 10X (Tris-HCl 100 mM pH 8.3, KCl 500 mM), 3 μ L de MgCl₂ (50 mM), 1 μ L de cada oligonucleótido cytb-f y CYB2-R (100 pmol/ μ l), 2 μ L de mezcla de dNTPs (10 mM) y 2.5 U de ADN polimerasa *Taq* Platinum de alta fidelidad (Invitrogen) en un volumen final de 100 μ L. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Perkin Elmer Cetus 480, programado para iniciar a 94°C por 3 min y 25 ciclos con 94°C, 45 s; 50°C, 30 s; 72°C, 2 min y una extensión final de 72°C por 7 min. El análisis de los amplicones obtenidos por transcripción reversa-PCR se hizo mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando el estándar de masa molecular λ ADN/*Hind* III- Φ X174/*Hae* III.

Secuenciación y análisis de los ADNc de *cob*

Para la secuenciación de productos amplificados por transcripción reversa-PCR se utilizó el método de terminación de cadena de dideoxidos modificado en el Laboratorio de Secuenciación: Genomic Analysis and Technology Core (GATC) de la Universidad de Arizona en un secuenciador automático ABI PRISM[®]377 DNA Analyzer. Para esto se utilizaron los oligonucleótidos cytb-f, CYB2-R, cytb500-F, cytb600-R y COB790F (Tablas IV y V).

Para localizar los posibles sitios de edición en el gen *cob* de *vid* se compararon las secuencias nucleotídicas del clon genómico de *cob* de *vid*, con respecto a las secuencias nucleotídicas de los productos de la transcripción reversa-PCR. Estas se obtuvieron con el programa algoritmo Blast 2 secuencias (bl2seq) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>). Una vez obtenida la

secuencia del ADNc, se realizó la traducción de la secuencia nucleotídica en el programa Six Frame Translation del sitio de análisis de secuencias del Baylor College of Medicine HGSC (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/Help/sixframe.html>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de ADNg y amplificación del gen *cob* de vid por PCR

La integridad del ADN genómico (ADNg) obtenido de las hojas de vid se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 2), donde se observó el ADNg característico de alto masa molecular para las 5 variedades utilizadas. La concentración de ADNg se estimó mediante la absorbancia a 260 nm. Estos valores tuvieron un promedio de 0.14 mg de ADNg/ mg de tejido vegetal (hojas de vid pulverizadas). Por ello, se consideró que la cantidad de ADNg obtenido fue adecuada si se considera que para cada reacción de PCR se requieren de 10 a 100 ng de ADN molde. También se estimó la pureza del ADNg con la razón de absorbancias A_{260}/A_{280} . Los valores de A_{260}/A_{280} para el ADNg de las variedades de vid utilizadas en este estudio variaron de 1.2 a 1.8. Sin embargo, cuando el ADNg está libre de contaminantes los valores van de 1.8 a 2.0, (Sambrook *et al.*, 1989). El ADNg contaminado con proteínas, produce valores menores a 1.8 (Saunders *et al.*, 1999). El ADNg obtenido contiene el ADN del genoma nuclear, el ADN mitocondrial y el ADN del cloroplasto de la vid, y se utilizó como molde para la amplificación del gen mitocondrial citocromo *b*. Por último los valores de ADNg menores a 1.8 no interfirieron en las amplificaciones del gen *cob* por PCR.

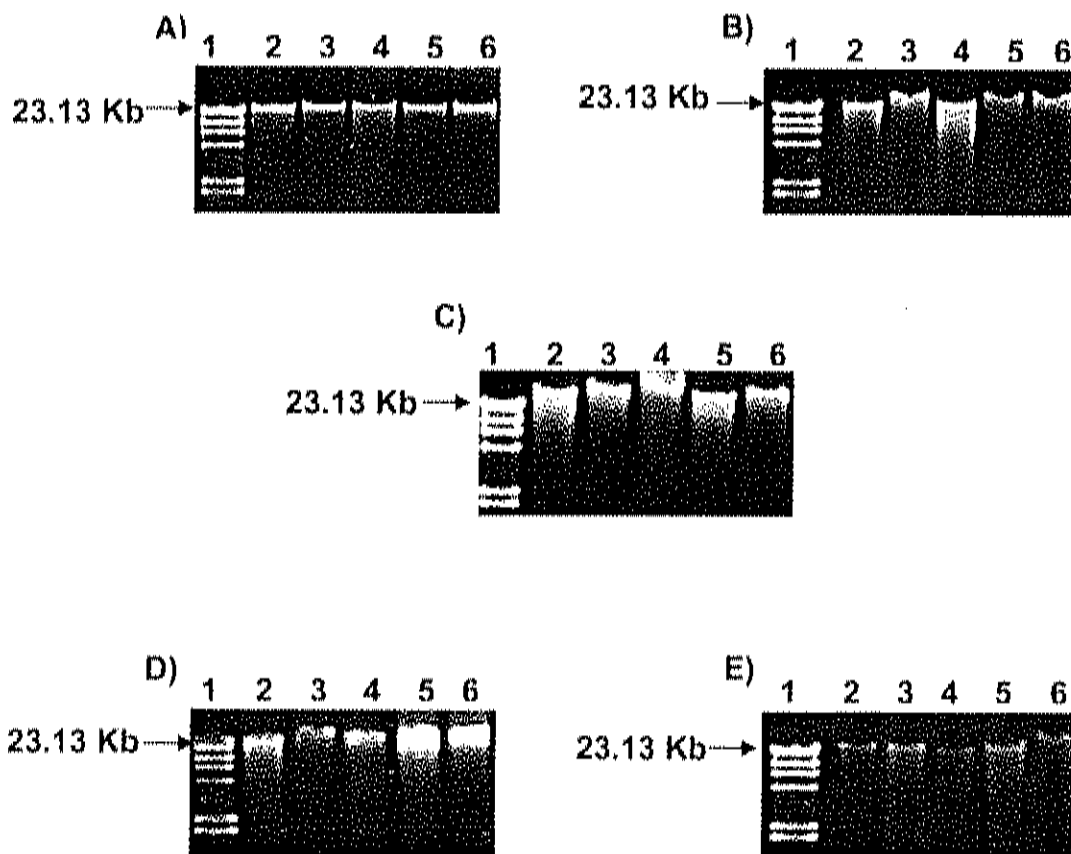


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de ADNg de vid. Panel A: Variedad Perlette. Panel B: Variedad Sugaone. Panel C: Variedad Black Seedless. Panel D: Variedad Princess. Panel E: Variedad Flame Seedless. Carril 1: Estándar de masa molecular λ ADN/*Hind* III. Carriles 2 al 6, muestras individuales de ADNg.

En las reacciones de PCR para amplificar el gen *cob* de vid se obtuvieron amplicones de un tamaño aproximado de 1.1 Kb (tamaño correspondiente al gen *cob* de otras especies de plantas) con los oligonucleótidos *cytb-f* y *CYB2-R* (Figura 3). Estos oligonucleótidos fueron muy específicos pues no se observó otra banda en el gel. Por los mismo, se esperaba que la secuencia nucleotídica del gen *cob* de *Vitis vinifera* L. fuera muy similar al gen *cob* de las especies de plantas utilizadas para el diseño de los oligonucleótidos. Por último, antes de proceder a la clonación del gen *cob* en el vector de clonación pCR[®]2.1, se obtuvieron secuencias parciales del amplicón para confirmar que se había amplificado el gen *cob*. Los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación fueron los mismos que se utilizaron para la amplificación por PCR.

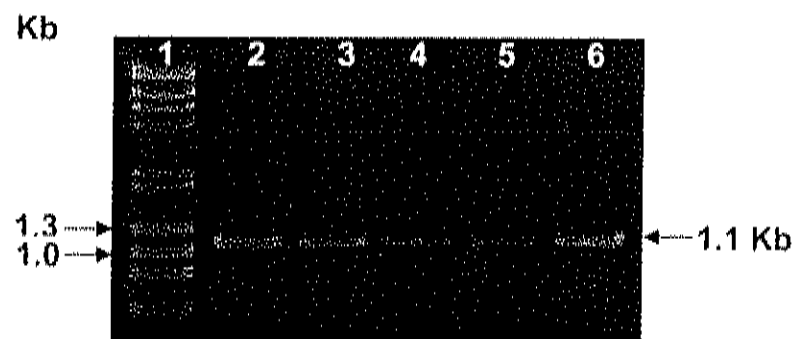


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de los productos de amplificación por PCR del *cob* de vid.

Estándar de masa molecular λ ADN/*Hind* III- Φ X174/*Hae* III (carril 1). Gen *cob* de la variedad Flame Seedless (carril 2), Perlette (carril 3), Princess (carril 4), Sugaone (carril 5) y Black Seedless (carril 6).

Clonación

Una vez confirmada la identidad de los amplicones mediante la secuenciación parcial, el gen *cob* de vid se amplificó otra vez para clonarlo en el plásmido pCR[®]2.1. Cuando a un plásmido (ADNp) se le inserta un fragmento de ADN (amplicón del gen *cob*) en su sitio múltiple de clonación, se dice que es un plásmido o clon recombinante. En el presente trabajo se extrajo el ADNp de las colonias transformadas *E.coli* TOP 10 para buscar el clon recombinante para las 5 variedades de vid.

En la clonación de genes, los clones recombinantes se distinguen de los no recombinantes por su migración retardada en geles de agarosa. Los clones recombinantes son de mayor tamaño y masa molecular y por ende, migran más lento que los no recombinantes. Al extraer el ADNp de 10 colonias de *E. coli* transformadas de cada variedad de vid se identificó un clon recombinante del gen *cob* para la variedad Black Seedless, dos para Flame Seedless y uno para Princess (Figura 4). También se observaron plásmidos con migración retardada de los ADNp que no poseían el inserto. Esto pudo ser ocasionado por la presencia de impurezas y alta concentración de sales presentes en el ADNp. No se obtuvieron clones recombinantes para las variedades Sugraone y Perlette, aunque la eficiencia de transformación fue de $\sim 1 \times 10^5$ transformadas/ μg de ADN. Para estas últimas variedades se realizaron tres reacciones de ligación y se analizaron 120 colonias blancas (bacterias *E.coli* TOP 10).

Los plásmidos habitualmente se encuentra en varias formas topológicas diferentes, conocidas como súper enrollada, circular relajada, lineal y en concatámeros (Watson *et al.*, 1992). Debido a esto, las moléculas súper enrolladas por ser más compactas, se mueven con más facilidad a través del gel y se encuentran más lejos del pocillo. Por otra parte, las moléculas circulares relajadas y lineales avanzan muy próximas entre sí. Es por esto que

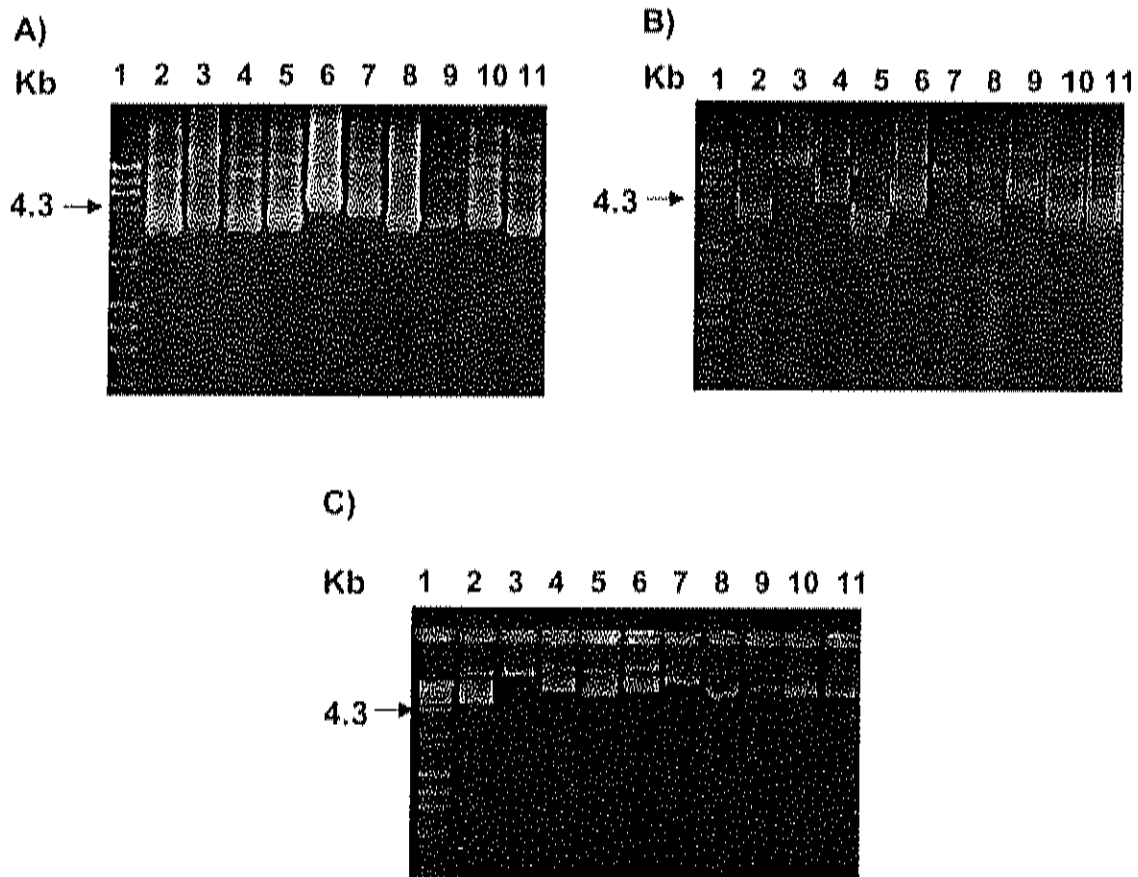


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los ADNp para la identificación de plásmidos recombinantes (clones de *cob*).

Panel A. ADNp de la variedad Black Seedless, Carril 6: clon recombinante del gen *cob*. Panel B. ADNp de la variedad Flame Seedless, Carriles 4 y 6: clones recombinantes del gen *cob*. Panel C. ADNp de la Variedad Princess, Carril 6: Plásmido recombinante del gen *cob*. Paneles A, B y C, Carril 1: Estándar de masa molecular λ ADN/*Hind* III- Φ X174/*Hae* III.

Obtención de las secuencias nucleotídicas del gen *cob* de vid

Para obtener las secuencias nucleotídicas del gen *cob*, se secuenciaron los clones recombinantes de las variedades Black Seedless, Flame Seedless y Princess. Estos clones se secuenciaron con los oligonucleótidos T7 sentido, M13 antisentido, *cytb500-F* sentido y *cytb600-R* antisentido (Tabla IV). A su vez, los dos últimos se utilizaron para obtener secuencias nucleotídicas claras y sin ambigüedades de la parte central del gen *cob* y obtener el 100% de las secuencias de ambas cadenas.

Debido a que después de varios intentos no se pudo clonar el gen *cob* de las variedades Perlette y Sagraone en el vector pCR[®]2.1, se procedió a secuenciar directamente sus productos de PCR. Para lo cual, se utilizaron los oligonucleótidos *cytb-f* sentido y CYB2-R antisentido (Tabla III), los oligonucleótidos internos *cytb500-F* sentido, *cytb600-R* antisentido (Tabla IV), COB241R antisentido, COB460R antisentido y COB790F sentido (Tabla V). En la Figura 6 se muestra la localización de los oligonucleótidos utilizados para la secuenciación del gen *cob* de las variedades de vid Perlette y Sagraone.

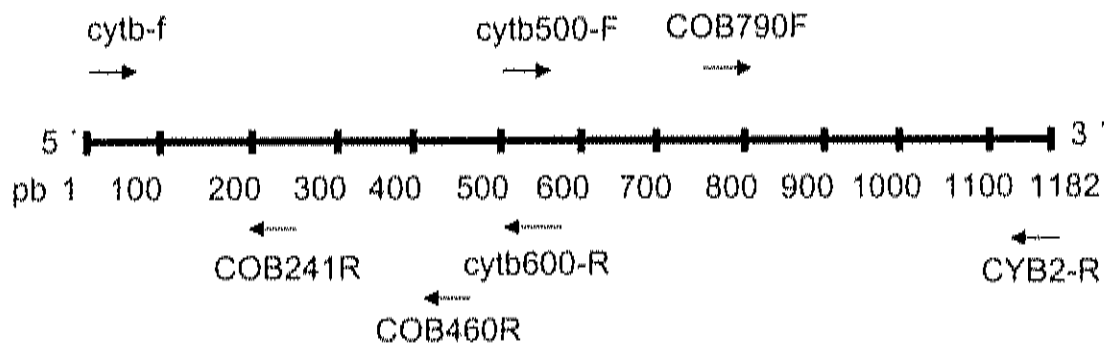


Figura 6. Estrategia de secuenciación del gen *cob* para las variedades de vid Perlette y Sagraone. Los oligonucleótidos se representan con flechas (→)

Las secuencias nucleotídicas del gen *cob* de las variedades clonadas, Princess, Flame Seedless y Black Seedless, tienen un marco de lectura continuo de 1182 pb con un 99.7% de identidad entre sí. Esto indicó la ausencia de intrones en el gen mitocondrial *cob* de *Vitis vinifera* L. de igual manera que otras especies de plantas (Schuster y Brennicke, 1985; Zanlungo *et al.*, 1991; Bohner y Chase, 1997). Las diferencias en la secuencia nucleotídica se localizan hacia el extremo 5' del gen *cob*, en las posiciones 296, 305, 309, 397 (Figura 7). Para validar si dichas diferencias eran polimorfismos a nivel de nucleótidos, se realizó un muestreo de hojas individuales de vid para posteriormente secuenciar nuevamente el gen *cob*.

Flame S.	241	GGCTGGTTGCTCCGTTATATGCATGCTAATGGGGCAAGTATGTTTCTCATTGTGGTTCAC
Princess	241	GGCTGGTTGCTCCGTTATATGCATGCTAATGGGGCAAGTATGTTTCTCATTGTGGCTCAC
Black S.	241	GGCTGGTTGCTCCGTTATATGCATGCTAATGGGGCAAGTATGTTTCTCATTGTGGTTCAC
Flame S.	301	CTTCAATATTTTCGTGGTCTATATCATGCCGAGTTATAGCAGTCTTAGGGAAATTTGTTCCG
Princess	301	CTTCGTAATTTTCGTGGTCTATATCATGCCGAGTTATAGCAGTCTTAGGGAAATTTGTTCCG
Black S.	301	CTTCAATATTTTCGTGGTCTATATCATGCCGAGTTATAGCAGTCTTAGGGAAATTTGTTCCG
Flame S.	361	TGTCFCGGAGTTGTAATCTTCCTATTAATGATTTGTGACAGCTTTTACAGGATACGTACCA
Princess	361	TGTCFCGGAGTTGTAATCTTCCTATTAATGATTTGTGACAGCTTTTACAGGATACGTACCA
Black S.	361	TGTCFCGGAGTTGTAATCTTCCTATTAATGATTTGTGACAGCTTTTACAGGATACGTACCA

Figura 7. Diferencias entre las secuencias nucleotídicas del gen *cob* de tres variedades de vid. Las secuencias idénticas están sombreadas.

Validación de la secuencia nucleotídica de *cob* de vid a partir de muestras individuales

Se recolectaron 20 hojas individuales de cada variedad de vid, de las cuales se obtuvo ADNg y se amplificó el gen *cob* por PCR utilizando la enzima ADN polimerasa *Taq* de alta fidelidad (Invitrogen). Los productos de PCR amplificados a partir del ADNg obtenidos de cada hoja de las variedades, se secuenciaron con los oligonucleótidos COB460R (Tabla IV) y *cytb-f* (Tabla III). Estos se hibridizan hacia el extremo 5' del gen *cob* (región donde se encontraron las diferencias en las variedades clonadas). Para el gen *cob* de vid de Black Seedless se secuenciaron 12 productos de PCR, 10 para Perlette, 10 para Sugraone, 9 para Flame Seedless y 9 para Princess. Las secuencias nucleotídicas que se obtuvieron revelaron un 100% de identidad de los nucleótidos entre las 5 variedades de vid.

En la Figura 8, se muestra la alineación de los resultado obtenidos después de la secuenciación con los oligonucleótidos y las bases sin sombra señalan la posición, donde se encontraban las diferencias de las bases de las variedades clonadas. Estos resultados indicaron que las diferencias nucleotídicas en el gen *cob* de las variedades de vid no eran reales. De la misma manera las diferencias en secuencias nucleotídicas pudieron ser ocasionadas, por un error de incorporación de base de la enzima ADN *Taq* polimerasa ó errores de secuenciación. Finalmente con esta evidencia se descartó la presencia de polimorfismos en el gen *cob* de las 5 variedades de vid (Figura 9). La secuencia nucleotídica completa de *cob* de vid fué depositada en GenBank con clave de acceso AY727902.

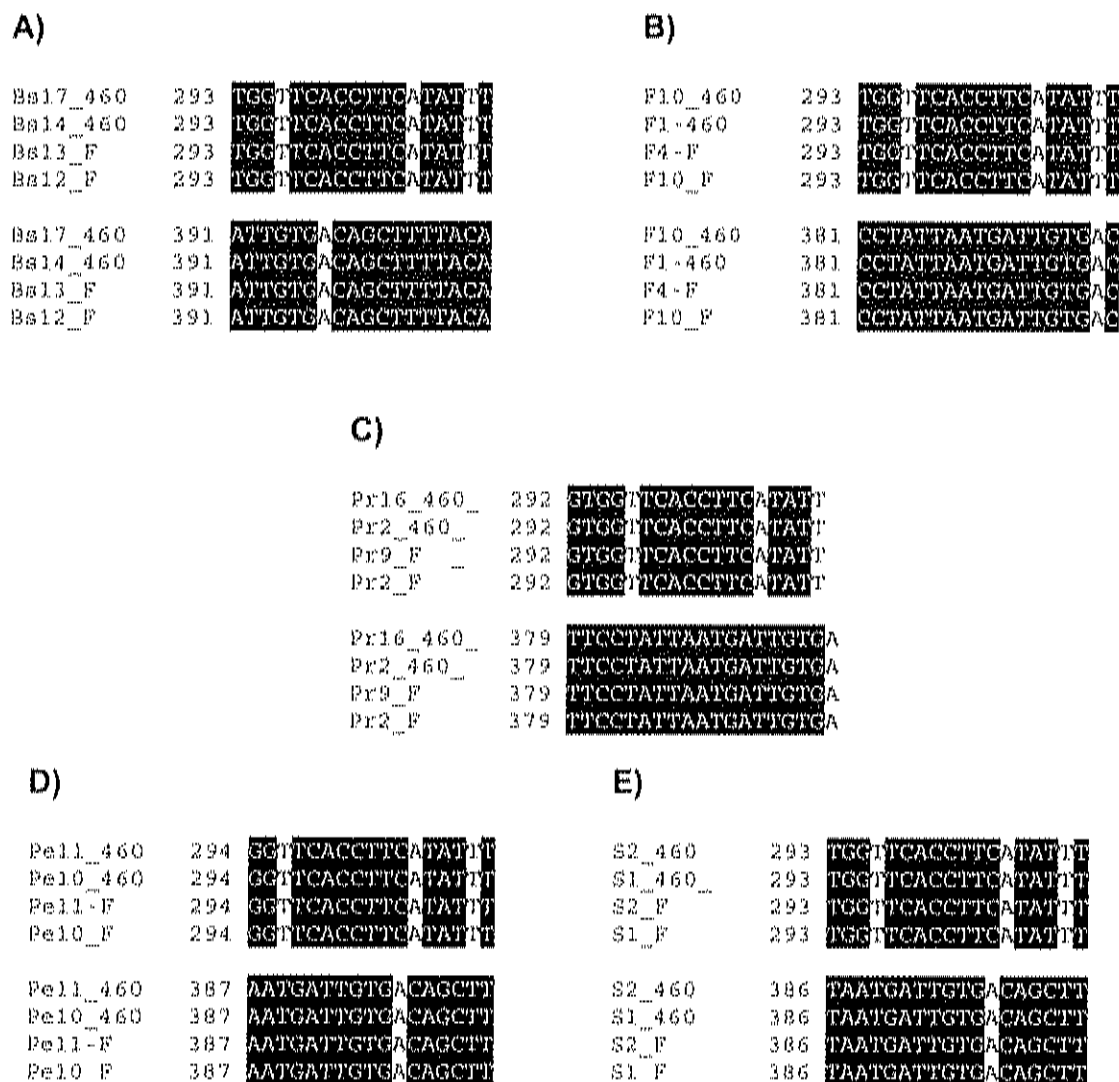


Figura 8. Alineamiento de las secuencias consenso de *cob* de muestras individuales de vid secuenciadas con los oligonucleótidos *cytb-f* y **COB460R. Panel A) Black Seedless (Bs) n=12; Panel B) Flame Seedless (F) n=9; Panel C) Princess (Pr) n=9; Panel D) Perlette (Pe) n=10; Panel E) Sagraone (S) n=10. Los números a la izquierda de las secuencias corresponden a la posición de los nucleótidos en el gen *cob* de vid. Los nucleótidos sin sombra hablan dado polimorfismos en la secuenciación inicial.**

Perlette	1	ATGACTATAAGGAACCAACGATTCTCTCTTCTTAAACAACCTATATCCTCACACTGAAT
Princess	1	ATGACTATAAGGAACCAACGATTCTCTCTTCTTAAACAACCTATATCCTCACACTGAAT
Black S.	1	ATGACTATAAGGAACCAACGATTCTCTCTTCTTAAACAACCTATATCCTCACACTGAAT
Flame S.	1	ATGACTATAAGGAACCAACGATTCTCTCTTCTTAAACAACCTATATCCTCACACTGAAT
Sugraone	1	ATGACTATAAGGAACCAACGATTCTCTCTTCTTAAACAACCTATATCCTCACACTGAAT
Perlette	61	CAGCATTTGATAGATTATCCAACCCCGAGCAATCTTAGTTAATGGTGGGGGTTCGGTTCCG
Princess	61	CAGCATTTGATAGATTATCCAACCCCGAGCAATCTTAGTTAATGGTGGGGGTTCGGTTCCG
Black S.	61	CAGCATTTGATAGATTATCCAACCCCGAGCAATCTTAGTTAATGGTGGGGGTTCGGTTCCG
Flame S.	61	CAGCATTTGATAGATTATCCAACCCCGAGCAATCTTAGTTAATGGTGGGGGTTCGGTTCCG
Sugraone	61	CAGCATTTGATAGATTATCCAACCCCGAGCAATCTTAGTTAATGGTGGGGGTTCGGTTCCG
Perlette	121	TTAGCTGGTATTTGTTTGTTCATTCAGATAGTCACCTGGCGTTTTTTTGTAGCTATGCATCAC
Princess	121	TTAGCTGGTATTTGTTTGTTCATTCAGATAGTCACCTGGCGTTTTTTTGTAGCTATGCATCAC
Black S.	121	TTAGCTGGTATTTGTTTGTTCATTCAGATAGTCACCTGGCGTTTTTTTGTAGCTATGCATCAC
Flame S.	121	TTAGCTGGTATTTGTTTGTTCATTCAGATAGTCACCTGGCGTTTTTTTGTAGCTATGCATCAC
Sugraone	121	TTAGCTGGTATTTGTTTGTTCATTCAGATAGTCACCTGGCGTTTTTTTGTAGCTATGCATCAC
Perlette	181	ACACCTCATGTGGATTTAGCTTTCAACAGCGTAGAACACCTTATGAGAGATGTTGAAGGG
Princess	181	ACACCTCATGTGGATTTAGCTTTCAACAGCGTAGAACACCTTATGAGAGATGTTGAAGGG
Black S.	181	ACACCTCATGTGGATTTAGCTTTCAACAGCGTAGAACACCTTATGAGAGATGTTGAAGGG
Flame S.	181	ACACCTCATGTGGATTTAGCTTTCAACAGCGTAGAACACCTTATGAGAGATGTTGAAGGG
Sugraone	181	ACACCTCATGTGGATTTAGCTTTCAACAGCGTAGAACACCTTATGAGAGATGTTGAAGGG
Perlette	241	GGCTGGTTGCTCCGTTATATGCATGCTAATGGGGCAAGTATGTTCTCATTTGTGGTTTCC
Princess	241	GGCTGGTTGCTCCGTTATATGCATGCTAATGGGGCAAGTATGTTCTCATTTGTGGTTTCC
Black S.	241	GGCTGGTTGCTCCGTTATATGCATGCTAATGGGGCAAGTATGTTCTCATTTGTGGTTTCC
Flame S.	241	GGCTGGTTGCTCCGTTATATGCATGCTAATGGGGCAAGTATGTTCTCATTTGTGGTTTCC
Sugraone	241	GGCTGGTTGCTCCGTTATATGCATGCTAATGGGGCAAGTATGTTCTCATTTGTGGTTTCC
Perlette	301	CTTCATATTTTTCGTGGTCTATATCATGCGAGTTATAGCAGTCCCTAGGGAAATTTGTTCCGG
Princess	301	CTTCATATTTTTCGTGGTCTATATCATGCGAGTTATAGCAGTCCCTAGGGAAATTTGTTCCGG
Black S.	301	CTTCATATTTTTCGTGGTCTATATCATGCGAGTTATAGCAGTCCCTAGGGAAATTTGTTCCGG
Flame S.	301	CTTCATATTTTTCGTGGTCTATATCATGCGAGTTATAGCAGTCCCTAGGGAAATTTGTTCCGG
Sugraone	301	CTTCATATTTTTCGTGGTCTATATCATGCGAGTTATAGCAGTCCCTAGGGAAATTTGTTCCGG
Perlette	361	TGTCTCGGAGTTGTAATCTTCCATTAATGATTTGTGACAGCTTTTACAGGATACGTACCA
Princess	361	TGTCTCGGAGTTGTAATCTTCCATTAATGATTTGTGACAGCTTTTACAGGATACGTACCA
Black S.	361	TGTCTCGGAGTTGTAATCTTCCATTAATGATTTGTGACAGCTTTTACAGGATACGTACCA
Flame S.	361	TGTCTCGGAGTTGTAATCTTCCATTAATGATTTGTGACAGCTTTTACAGGATACGTACCA
Sugraone	361	TGTCTCGGAGTTGTAATCTTCCATTAATGATTTGTGACAGCTTTTACAGGATACGTACCA
Perlette	421	CCTTGGGGTCAGATGAGCTTTTGGGGAGCTACAGTAATTACAAGCTTAGCTAGCGCCATA
Princess	421	CCTTGGGGTCAGATGAGCTTTTGGGGAGCTACAGTAATTACAAGCTTAGCTAGCGCCATA
Black S.	421	CCTTGGGGTCAGATGAGCTTTTGGGGAGCTACAGTAATTACAAGCTTAGCTAGCGCCATA
Flame S.	421	CCTTGGGGTCAGATGAGCTTTTGGGGAGCTACAGTAATTACAAGCTTAGCTAGCGCCATA
Sugraone	421	CCTTGGGGTCAGATGAGCTTTTGGGGAGCTACAGTAATTACAAGCTTAGCTAGCGCCATA

Perlette	481	CCTGTAGTAGGAGATACCATAGTGACTTGGCTTTGGGGTGGTTTCCTCCGTGGACAAATGCC
Princess	481	CCTGTAGTAGGAGATACCATAGTGACTTGGCTTTGGGGTGGTTTCCTCCGTGGACAAATGCC
Black S.	481	CCTGTAGTAGGAGATACCATAGTGACTTGGCTTTGGGGTGGTTTCCTCCGTGGACAAATGCC
Flame S.	481	CCTGTAGTAGGAGATACCATAGTGACTTGGCTTTGGGGTGGTTTCCTCCGTGGACAAATGCC
Sugraone	481	CCTGTAGTAGGAGATACCATAGTGACTTGGCTTTGGGGTGGTTTCCTCCGTGGACAAATGCC
Perlette	541	ACCTTAAATCGTTTTTTTGTCTTCATCAATTTACTCCCCCTTATTTTGTAGTAGGGCCAGT
Princess	541	ACCTTAAATCGTTTTTTTGTCTTCATCAATTTACTCCCCCTTATTTTGTAGTAGGGCCAGT
Black S.	541	ACCTTAAATCGTTTTTTTGTCTTCATCAATTTACTCCCCCTTATTTTGTAGTAGGGCCAGT
Flame S.	541	ACCTTAAATCGTTTTTTTGTCTTCATCAATTTACTCCCCCTTATTTTGTAGTAGGGCCAGT
Sugraone	541	ACCTTAAATCGTTTTTTTGTCTTCATCAATTTACTCCCCCTTATTTTGTAGTAGGGCCAGT
Perlette	601	CTTCTTCATCTGGCCGCATTCGATCAATATGGATCAAATAATCCATTTGGGTGTCCATTCA
Princess	601	CTTCTTCATCTGGCCGCATTCGATCAATATGGATCAAATAATCCATTTGGGTGTCCATTCA
Black S.	601	CTTCTTCATCTGGCCGCATTCGATCAATATGGATCAAATAATCCATTTGGGTGTCCATTCA
Flame S.	601	CTTCTTCATCTGGCCGCATTCGATCAATATGGATCAAATAATCCATTTGGGTGTCCATTCA
Sugraone	601	CTTCTTCATCTGGCCGCATTCGATCAATATGGATCAAATAATCCATTTGGGTGTCCATTCA
Perlette	661	GAGATGGATAAAAATTTCTTTTACCCTTATTTTTATGTAAGGATCTAGTAGGTCCGGTA
Princess	661	GAGATGGATAAAAATTTCTTTTACCCTTATTTTTATGTAAGGATCTAGTAGGTCCGGTA
Black S.	661	GAGATGGATAAAAATTTCTTTTACCCTTATTTTTATGTAAGGATCTAGTAGGTCCGGTA
Flame S.	661	GAGATGGATAAAAATTTCTTTTACCCTTATTTTTATGTAAGGATCTAGTAGGTCCGGTA
Sugraone	661	GAGATGGATAAAAATTTCTTTTACCCTTATTTTTATGTAAGGATCTAGTAGGTCCGGTA
Perlette	721	GCTTCTGCTATCTTTCTTCCATTTGGATTTTTTATGCTCCFAATGTTTTGGGGCATCCC
Princess	721	GCTTCTGCTATCTTTCTTCCATTTGGATTTTTTATGCTCCFAATGTTTTGGGGCATCCC
Black S.	721	GCTTCTGCTATCTTTCTTCCATTTGGATTTTTTATGCTCCFAATGTTTTGGGGCATCCC
Flame S.	721	GCTTCTGCTATCTTTCTTCCATTTGGATTTTTTATGCTCCFAATGTTTTGGGGCATCCC
Sugraone	721	GCTTCTGCTATCTTTCTTCCATTTGGATTTTTTATGCTCCFAATGTTTTGGGGCATCCC
Perlette	781	GACAATTATATACCTGCTAATCCGATGCCACCCCGCCTCATATTTGTGCCGGAATGGTAT
Princess	781	GACAATTATATACCTGCTAATCCGATGCCACCCCGCCTCATATTTGTGCCGGAATGGTAT
Black S.	781	GACAATTATATACCTGCTAATCCGATGCCACCCCGCCTCATATTTGTGCCGGAATGGTAT
Flame S.	781	GACAATTATATACCTGCTAATCCGATGCCACCCCGCCTCATATTTGTGCCGGAATGGTAT
Sugraone	781	GACAATTATATACCTGCTAATCCGATGCCACCCCGCCTCATATTTGTGCCGGAATGGTAT
Perlette	841	TTCCCTACCGATCCATGCCATTCCTCGTAGTATACCTGACAAAFCGGGAGGTGTAGCCGCA
Princess	841	TTCCCTACCGATCCATGCCATTCCTCGTAGTATACCTGACAAAFCGGGAGGTGTAGCCGCA
Black S.	841	TTCCCTACCGATCCATGCCATTCCTCGTAGTATACCTGACAAAFCGGGAGGTGTAGCCGCA
Flame S.	841	TTCCCTACCGATCCATGCCATTCCTCGTAGTATACCTGACAAAFCGGGAGGTGTAGCCGCA
Sugraone	841	TTCCCTACCGATCCATGCCATTCCTCGTAGTATACCTGACAAAFCGGGAGGTGTAGCCGCA
Perlette	901	ATAGCACCAGTTTTTATATGTCGTGTGGCTTTACCTTTTTTAAAAGTATGTATGTGGGT
Princess	901	ATAGCACCAGTTTTTATATGTCGTGTGGCTTTACCTTTTTTAAAAGTATGTATGTGGGT
Black S.	901	ATAGCACCAGTTTTTATATGTCGTGTGGCTTTACCTTTTTTAAAAGTATGTATGTGGGT
Flame S.	901	ATAGCACCAGTTTTTATATGTCGTGTGGCTTTACCTTTTTTAAAAGTATGTATGTGGGT
Sugraone	901	ATAGCACCAGTTTTTATATGTCGTGTGGCTTTACCTTTTTTAAAAGTATGTATGTGGGT

Perlette	961	AGTTCAAGTTTTGACCGATTACCAAGGAATAATTTGGTTGCTTTTGGCGGATCGCTTA
Princess	961	AGTTCAAGTTTTGACCGATTACCAAGGAATAATTTGGTTGCTTTTGGCGGATCGCTTA
Black S.	961	AGTTCAAGTTTTGACCGATTACCAAGGAATAATTTGGTTGCTTTTGGCGGATCGCTTA
Flame S.	961	AGTTCAAGTTTTGACCGATTACCAAGGAATAATTTGGTTGCTTTTGGCGGATCGCTTA
Sugraone	961	AGTTCAAGTTTTGACCGATTACCAAGGAATAATTTGGTTGCTTTTGGCGGATCGCTTA
Perlette	1021	CTACTAGGTTGGATCGGATGTCAACCTGTGGAGGCACCATTGTGTACTATTGGACAAATT
Princess	1021	CTACTAGGTTGGATCGGATGTCAACCTGTGGAGGCACCATTGTGTACTATTGGACAAATT
Black S.	1021	CTACTAGGTTGGATCGGATGTCAACCTGTGGAGGCACCATTGTGTACTATTGGACAAATT
Flame S.	1021	CTACTAGGTTGGATCGGATGTCAACCTGTGGAGGCACCATTGTGTACTATTGGACAAATT
Sugraone	1021	CTACTAGGTTGGATCGGATGTCAACCTGTGGAGGCACCATTGTGTACTATTGGACAAATT
Perlette	1081	CCTCCTTTTGTFTTCTTCTTGTTCCTTGCCATAACGCCCATTCGGGACGAGTTGGAAGA
Princess	1081	CCTCCTTTTGTFTTCTTCTTGTTCCTTGCCATAACGCCCATTCGGGACGAGTTGGAAGA
Black S.	1081	CCTCCTTTTGTFTTCTTCTTGTTCCTTGCCATAACGCCCATTCGGGACGAGTTGGAAGA
Flame S.	1081	CCTCCTTTTGTFTTCTTCTTGTTCCTTGCCATAACGCCCATTCGGGACGAGTTGGAAGA
Sugraone	1081	CCTCCTTTTGTFTTCTTCTTGTTCCTTGCCATAACGCCCATTCGGGACGAGTTGGAAGA
Perlette	1141	GGAATTCCTAATTCCTTACACGGATGAGACTGATCACACCTGA
Princess	1141	GGAATTCCTAATTCCTTACACGGATGAGACTGATCACACCTGA
Black S.	1141	GGAATTCCTAATTCCTTACACGGATGAGACTGATCACACCTGA
Flame S.	1141	GGAATTCCTAATTCCTTACACGGATGAGACTGATCACACCTGA
Sugraone	1141	GGAATTCCTAATTCCTTACACGGATGAGACTGATCACACCTGA

Figura 9. Alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas del gen *cob* de 5 variedades de vid. Pares de bases totales = 1182, clave de acceso en GenBank AY727902.

ARN total de *Vitis vinifera* L. y análisis de la amplificación de los ADNc de *cob* de vid

Para analizar la expresión del gen *cob* de vid, se realizaron extracciones de ARNt. Debido a que las secuencias nucleotídicas del gen *cob* de las 5 variedades son idénticas, se escogió al azar una variedad (Black Seedless). Se realizaron 4 extracciones de ARNt de esta variedad y se obtuvieron concentraciones finales promedio de cada extracción de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. En la Figura 10 se muestra el gel con las bandas mayoritarias del ARNt que corresponden al ARN ribosomal (ARNr) y se observa la integridad de las mismas. Para el caso de plantas los ARNr característicos son la subunidades 25S, 23S, 18S y 16S. Por último, el ARN mensajero (ARNm) representa el 1% del ARNt, es por eso que no se puede visualizar en gel de agarosa.

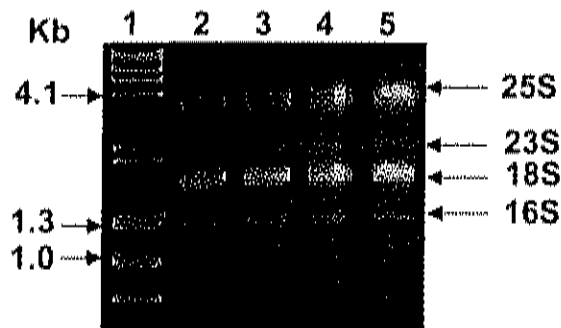


Fig. 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del ARN total de vid.

Carril 1: Estándar de masa molecular λ ADN/*Hind* III- Φ X174/*Hae* III.

Carriles 2, 3, 4 y 5: ARN total de las 4 muestras de vid variedad Black Seedless.

El ARN total se utilizó como molde para sintetizar el ADN complementario (ADNc), para ello se utilizó el oligonucleótido CYB2-R. Posteriormente, el ADNc se utilizó como molde para amplificar el gen *cob* de *vid* utilizando los oligonucleótidos CYB2-R y *cytb-f*. Al analizarse los ADNc amplificados, se observaron bandas correspondiente al tamaño del clon genómico del gen *cob* (Figura 11). Con este resultado se confirmó que el gen *cob* de *vid* no contiene intrones en su estructura.

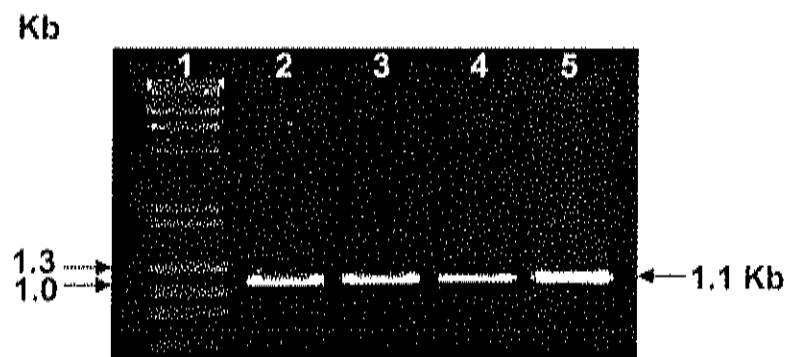


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de los ADNc de *cob* obtenidos por transcripción reversa-PCR. Carril 1: Estándar de masa molecular λ ADN/*Hind* III- Φ X174/*Hae* III. Carriles 2, 3, 4 y 5: ADNc de *cob* de 4 muestras independientes de ARN total de *vid*.

Identificación y cuantificación de los sitios de edición del ARNm de *cob*

Una vez obtenidas las secuencias nucleotídicas de los productos de la transcripción reversa-PCR del gen *cob* de *vid*, se compararon con las del clon genómico y se identificaron los sitios de edición. Se encontraron 21 sitios de edición para el gen *cob* de *vid* en las posiciones 48, 178, 286, 298, 325, 358, 407, 419, 568, 580, 715, 725, 737, 808, 853, 908, 982, 1015, 1081, 1084 y 1124 (Figura 12). De estos 21 sitios de edición, 5 fueron idénticos a los sitios de edición de *cob* de *Arabidopsis*, arroz, *enotera* y papa (325, 568, 853, 908, 982), y 1 sitio fué idéntico al de *Arabidopsis*, *enotera* y papa (dicotiledonias) (1084) (Giegé y Brennicke, 1999; Schuster *et al.*, 1990; Zanlungo *et al.*, 1993). Los sitios de edición 48, 737 y 1015 fueron únicos para *vid*. La mayoría de los sitios de edición en el ARNm de *cob* de *vid* fueron en la primera y segunda posición del triplete y solo un sitio fué en la tercera posición del codón (48) (Giegé y Brennicke, 1999; Hanson *et al.*, 1996).

```

aa 1 M T I R N Q R F S L L K Q P I S S
ADNg 1 ATG ACT ATA AGG AAC CAA CGA TTC TCT CTT CTT AAA CAA CCT ATA TCC TCC
ADNc  ATG ACT ATA AGG AAC CAA CGA TTC TCT CTT CTT AAA CAA CCT ATA TCT TCC
                                     F

18 T L N Q H L I D Y P T P S N L S Y
52 ACA CTG AAT CAG CAT TTG ATA GAT TAT CCA ACC CCG AGC AAT CTT AGT TAT
   ACA CTG AAT CAG CAT TTG ATA GAT TAT CCA ACC CCG AGC AAT CTT AGT TAT

35 W W G F G S L A G I C L V I Q I V
103 TGG TGG GGG TTC GGT TCG TTA GCT GGT ATT TGT TTA GTC ATT CAG ATA GTC
   TGG TGG GGG TTC GGT TCG TTA GCT GGT ATT TGT TTA GTC ATT CAG ATA GTC

52 T G V F L A M H H T P H V D L A F
154 ACT GGC GTT TTT TTA GCT ATG CAT CAC ACA CCT CAT GTG GAT TTA GCT TTC
   ACT GGC GTT TTT TTA GCT ATG CAT TAC ACA CCT CAT GTG GAT TTA GCT TTC
                                     Y

69 N S V E H V M R D V E G G W L L R
205 AAC AGC GTA GAA CAC GTT ATG AGA GAT GTT GAA GGG GGC TGG TTG CTC CGT
   AAC AGC GTA GAA CAC GTT ATG AGA GAT GTT GAA GGG GGC TGG TTG CTC CGT

86 Y M H A N G A S M F L I V V H L H
256 TAT ATG CAT GCT AAT GGG GCA AGT ATG TTT CTC ATT GTG GTT CAC CTT CAT
   TAT ATG CAT GCT AAT GGG GCA AGT ATG TTT TFC ATT GTG GTT TAC CTT CAT
                                     F
                                     Y

103 I F R G L Y H A S Y S S P R E F V
307 ATT TTT CGT GGT CTA TAT CAT GCG AGT TAT AGC AGT CCT AGG GAA TTT GTT
   ATT TTT CGT GGT CTA TAT TAT GCG AGT TAT AGC AGT CCT AGG GAA TTT GTT
                                     Y

120 R C L G V V I F L L M I V T A F T
358 CGG TGT CTC GGA GTT GTA ATC TTC CTA TTA ATG ATT GTG ACA GCT TTT ACA
   TGG TGT CTC GGA GTT GTA ATC TTC CTA TTA ATG ATT GTG ACA GCT TTT ATA
   W                                     I

137 G Y V P P W G Q M S F W G A T V I
409 GGA TAC GTA CCA CCT TGG GGT CAG ATG AGC TTT TGG GGA GCT ACA GTA ATT
   GGA TAC GTA CTA TCT TGG GGT CAG ATG AGC TTT TGG GGA GCT ACA GTA ATT
   L

154 T S L A S A I P V V G D T I V T W
460 ACA AGC TTA GCT AGC GCC ATA CCT GTA GTA GGA GAT ACC ATA GTG ACT TGG
   ACA AGC TTA GCT AGC GCC ATA CCT GTA GTA GGA GAT ACC ATA GTG ACT TGG

171 L W G G F S V D N A T L N R F F S
511 CTT TGG GGT GGT TTC TCC GTG GAC AAT GCC ACC TTA AAT CGT TTT TTT AGT
   CTT TGG GGT GGT TTC TCC GTG GAC AAT GCC ACC TTA AAT CGT TTT TTT AGT

```

188 L R H L L P L I L V G A S L L H L
 562 CTT CAT CAT TTA CTC CCC CTT ATT TTA GTA GGC GCC AGT CTT CTT CAT CTG
 CTT CAT CAT TTA CTC CCC TTT ATT TTA GTA GGC GCC AGT CTT CTT CAT CTG
 Y F

205 A A L H Q Y G S N N P L G V H S E
 613 GCC GCA TTG CAT CAA TAT GGA TCA AAT AAT CCA TTG GGT GTC CAT TCA GAG
 GCC GCA TTG CAT CAA TAT GGA TCA AAT AAT CCA TTG GGT GTC CAT TCA GAG

222 M D K I S F Y P Y F Y V K D L V G
 664 ATG GAT AAA ATT TCT TTT TAC CCT TAT TTT TAT GTA AAG GAT CTA GTA GGT
 ATG GAT AAA ATT TCT TTT TAC CCT TAT TTT TAT GTA AAG GAT CTA GTA GGT

239 R V A S A I F S S I W I F Y A P N
 715 CCG GTA GCT TCT GCT ATC TTT TCT TCC ATT TGG ATT TTT TAT GCT CCT AAT
 TGG GTA GCT TTT GCT ATC TTT TTT TCC ATT TGG ATT TTT TAT GCT CCT AAT
 W F P

256 V L G H P D N Y I P A N P M P T P
 766 GTT TTG GGG CAT CCC GAC AAT TAT ATA CCT GCT AAT CCG ATG CCC ACC CCG
 GTT TTG GGG CAT CCC GAC AAT TAT ATA CCT GCT AAT CCG ATG TCC ACC CCG
 S

273 P H I V P E W Y F L P I H A I L R
 817 CCT CAT ATT GTG CCG GAA TGG TAT TTC CTA CCG ATC CAT GCC ATT CTT CGT
 CCT CAT ATT GTG CCG GAA TGG TAT TTC CTA CCG ATC TAT GCC ATT CTT CGT
 Y

290 S I P D K S G G V A A I A P V F I
 868 AGT ATA CCT GAC AAA TCG GGA GGT GTA GCC GCA ATA GCA CCA GTT TTT ATA
 AGT ATA CCT GAC AAA TCG GGA GGT GTA GCC GCA ATA GCA CTA GTT TTT ATA
 L

307 C L L A L P F F K S M Y V R S S S
 919 TGT CTG TTG GCT TTA CCT TTT TTT AAA AGT ATG TAT GTG CGT AGT TCA AGT
 TGT CTG TTG GCT TTA CCT TTT TTT AAA AGT ATG TAT GTG CGT AGT TCA AGT

324 F R P I H Q G I F W L L L A D R L
 970 TTT CGA CCG ATT CAC CAA GGA ATA TTT TGG TTG CTT TTG GCG GAT CGC TTA
 970 TTT CGA CCG ATT TAC CAA GGA ATA TTT TGG TTG CTT TTG GCG GAT TGC TTA
 Y C

341 L L G W I G C Q P V E A P F V T I
 1021 CTA CTA GGT TGG ATC GGA TGT CAA CCT GTG GAG GCA CCA TTT GTT ACT ATT
 CTA CTA GGT TGG ATC GGA TGT CAA CCT GTG GAG GCA CCA TTT GTT ACT ATT

358	G	Q	I	P	P	F	V	F	F	L	F	F	A	I	T	P	I
1072	GGA	CAA	ATT	CCT	CCT	TTT	GTT	TTC	TTC	TTG	TTC	TTT	GCC	ATA	ACG	CCC	ATT
	GGA	CAA	ATT	TCT	TCT	TTT	GTT	TTC	TTC	TTG	TTC	TTT	GCC	ATA	ACG	CCC	ATT
				S	S												
375	P	G	R	V	G	R	G	I	P	N	S	Y	T	D	E	T	D
1123	CCG	GGA	CGA	GTT	GGA	AGA	GGA	ATT	CCT	AAT	TCT	TAC	ACG	GAT	GAG	ACT	GAT
	CTG	GGA	CGA	GTT	GGA	AGA	GGA	ATT	CCT	AAT	TCT	TAC	ACG	GAT	GAG	ACT	GAT
	L																
392	H	T	*														
1174	CAC	ACC	TGA														
	CAC	ACC	TGA														

Figura 12. Comparación de la secuencia nucleotídica de los clones genómicos y ADNc de *cob* de vid. Los nucleótidos editados y el cambio de aminoácidos se señalan en los rectángulos. El asterisco (*), representa la señal de terminación del gen *cob*; aa, representa los aminoácidos deducidos de las secuencias nucleotídicas; ADNg, representa la secuencia del clon genómico de vid; ADNc, representa la secuencia del ADN complementario del gen *cob* de vid.

La forma más adecuada de cuantificar la edición en el ARNm es mediante la frecuencia de edición. Para ello se divide el número de sitios de edición en el ARNm entre el tamaño del gen. Se encontró que el ARNm de *cob* de vid, posee mayor frecuencia de edición al compararlo con los ARNm de *cob* de otras especies de plantas (Tabla VI). Este resultado podría indicar que *cob* de vid ha evolucionado menos que el *cob* de otras especies de plantas

Tabla VI. Sitios y frecuencia de edición de *cob* en especies de plantas

Planta	Sitios de edición	Tamaño Kb	Frecuencia de
	C → U (N)	(S)	edición N/S
Vid	21	1.182	17.7
Arroz	19	1.194	15.9
Enolera	12	1.185	10.1
Papa	9	1.182	7.61
Arabidopsis	7	1.182	5.9

A partir de las secuencias nucleotídicas de los ADNc (editados), se dedujeron las secuencias de aminoácidos y se encontró que el gen *cob* codifica para 393 aminoácidos. Al comparar la deducción de aminoácidos de COB a partir de la secuencia nucleotídica del clon genómico con la del ADNc se encontraron 20 cambios de aminoácidos en las posiciones 60, 96, 100, 109, 120, 136, 140, 190, 194, 239, 242, 246, 270, 285, 303, 328, 339, 361, 362 y 375 de la proteína (Figura 12). Un sitio de edición en el ARNm de *cob* de vid (48) no produjo cambio de aminoácido, al compararlo con la secuencia deducida de aminoácidos a partir del clon genómico.

Los cambios de aminoácidos derivados del proceso de edición del ARNm de *cob*, fueron de aa hidrofílicos a hidrofóbicos (Tabla VII). La secuencia deducida de aminoácidos del COB de *vid* mostró 2 cambios de aminoácidos de serina a fenilalanina (residuos 16 y 242); 6 de histidina a tirosina (residuos 60, 100, 109, 190, 285 y 328); 2 de leucina a fenilalanina (residuos 96 y 194); 2 de arginina a triptofano (residuos 120 y 239); 1 de treonina a isoleucina (residuo 136); 3 de prolina a leucina (residuos 140, 303 y 375); 3 de prolina a serina (residuos 270, 361 y 362) y por último 1 de arginina a cisteína (residuo 339). Lo anterior resulta en un COB más hidrofóbico después de la edición (67.9% de hidrofobicidad), que antes de la edición (63.8% de hidrofobicidad). Esto concuerda con algunos estudios que indican que el proceso de edición incrementa la hidrofobicidad final de la proteína (Schuster *et al.*, 1993).

Tabla VII. Cambios de aminoácidos de COB debidos al proceso de edición

Deducción de aa de ADNg	Deducción de aa de ADNc	Nº de cambios
<i>Hidrofílicos</i>	<i>Hidrofóbicos</i>	
Cargados +	Aromático	8
Polares	Aromático	2
Polares	No polar	1
<i>Hidrofóbicos</i>	<i>Hidrofílicos</i>	
No polar	Polar	3
<i>Hidrofóbicos</i>	<i>Hidrofóbicos</i>	
No polar	Aromático	2
No polar	No polar	3
<i>Hidrofílicos</i>	<i>Hidrofílicos</i>	
Cargado +	Polar	1

Comparación de la secuencia de aminoácidos del COB de vid con el COB de otros organismos

Las secuencias de aa de COB de vid se compararon con las especies de plantas de *Enotera*, *Arabidopsis*, papa y arroz (números de acceso en GenBank: CAA30135.1, P42792, CAA41343.1 y BAA11679.1, respectivamente) donde se encontró un porcentaje de identidad del 96% (datos no mostrados). Así mismo, la secuencia de aminoácidos de COB de vid se comparó con COB de otros organismos como: rana (*Xenopus laevis*), bovino (*Borus taurus*) y levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) (números de acceso en GenBank: P00160, P00157 y 1KYO, respectivamente) (Figura 13). Las alteraciones en la secuencia del ARNm de *cob* de vid aumentó el grado de conservación entre la secuencia deducida de amino ácidos de COB de vid y la de los otros organismos. El alineamiento de las proteínas COB de esos organismos con COB de vid (Figura 13) reveló que cada uno de los sitios editados en el gen *cob* de vid incrementó la identidad de COB de vid con COB de otros organismos. Los cambios de aminoácidos H60Y, L96F, H109Y, R120W, L194F y H285Y en COB de vid hicieron idénticos esos residuos entre los organismos anteriormente mencionados incluyendo a *Arabidopsis*. Los cambios de aminoácidos H100Y, P140L y P362S, incrementaron el porcentaje de similaridad de COB de vid con respecto a COB de rana y bovino. Por lo tanto, después del proceso de edición, la secuencia deducida de aminoácidos de COB de vid resultó ser más conservada al compararse con COB de otros organismos distantes.

```

Vv MTIRNQRFSLLKQPISSSTLNQHLIDYPTPSNLSYWGGFGLAGICLVIQIVTGVFLAMHY 60
At MTIRNQRFSLLKQPISSSTLNQHLIDYPTPSNLSYWGGFGLAGICLVIQIVTGVFLAMHY
Xl MAPNIRKS---HPLIKIINNSFIDLPTPSNISSLWNFGSLLGVCLIAQIITGLFLAMHY
Bt MTNIRKS---HPLMKIVNNAFIDLPAFSPNISSSWNNFGSLLGICLILQILTGLFLAMHY
Sc MAPRKS---NVYLSLVNSYIIDSPQSSINYWNNMGSLGCLIVIQIVTGVIFMAMHY
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Vv TPHVDLAFNSVEHVMRDVEGGWLLRYMHANGASMFFIVVYLHI FRGLYYASYSSPREPFW 120
At TPHVDLAFNSVEHIMRDVEGGWLLRYMHANGASMFFIVVYLHI FRGLYYASYSSPREPFW
Xl TADTSMASFSSVAHICRDVNNGWLI RN LHANGASFFFCIYLHIGRGLYYGSFLYKE--TW
Bt TSDPTTAFSSVTHICRDVNNGWI RYMHANGASMFFICLYMHVGRGLYYGSYTFLE--TW
Sc SSNIEIAFSSVEHIMRDVHNGYILRYLHANGASFFFMVMFMHMARGLYYGSYRSRPTLW
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Vv CLGVVIFLLMIVTAFIGYVLPWQGMSFWGATVITSLASAIFFVVGDTIVTWLWGGFSDNA 180
At CLGVVIFLLMIVTAFIGYVLPWQGMSFWGATVITSLASAIFFVVGDTIVTWLWGGFSDNA
Xl NIGVILLFLVMATAFVGYVLPWQGMSFWGATVITNLLSAIPYIGNVLVQWINGGFSVDNA
Bt NIGVILLTVMATAFMGYVLPWQGMSFWGATVITNLLSAIPYIGTNLVQWINGGFSVDKA
Sc NVGVIFILTIATAFLGYCCVYQGM SHWGATVITNLSAIPFVGNDIVSWLWGGFSDNSP
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Vv TLNRFSSLHYLLPFI LVGASLLHLAALHQQYGSNNPLGVHSEMDKISFYPPYFYVKDLVGWV 240
At TLNRFSSLHYLLPFI LVGASLLHLAALHQQYGSNNPLGVHSEMDKIAFYPPYFYVKDLVGWV
Xl TLTRFFAFHFLPFI IAGASILHLLFLHETGSTNPTGLNSDEDKVFFHYPYFSYKDLGFL
Bt TLTRFFAFHFLPFI IMAIAMVHLLFLHETGSSNPTGISSDVDKI PFHYPYTIKDILGAL
Sc TIQRFFALHYLVPFI IAAMVIMHLMALHIHGSSNPLGITGNLDRIPMHSYFIFKDLVTF
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Vv AFAIFFSIWIFYAPNVLGHPDNYIPANPMSTPPHIVPEWYFLPIYAILRSIPDKAGGVAA 300
At AFAIFFSIWIFYAPNVLGHPDNYIPANPMSTPPHIVPEWYFLPIYAILRSIPDKAGGVAA
Xl IMLTALTLLAMFSPNLLGDEPNFTPANPLITPPHIKPEWYFLFAYAILRSIPNKLGQVLA
Bt LLTLALMLLVLPAPDLLGDPDNYTPANFLNTPPHIKPEWYFLFAYAILRSIPNKLGQVLA
Sc LFMLLIALLVFVYSPNTLGHDPNYIPGNPLVTPASIVPEWYLLPFYAILRSIPDKLLGVIT
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Vv IALVFICLLALPFFKSMYVRSSSRPIYQGI FWLLLDACLLLGWIGCQPVEAPFVTIGQI 360
At IALVFICLLALPFFKSMYVRSSSRPIYQGMFWLLLDACLLLGWIGCQPVEAPFVTIGQI
Xl LVLSILILALMPLHSTKQRSIMFRPFTQIMFWALVADTLILT WIGGQPVDPYTIMIGQL
Bt LAFSILILALMPLHSTKQRSMMFRPLSQCLFWALVADLLT WIGGQPVDPYTIMIGQL
Sc MPAAILLVLLVLPFTDRSVVRGNTFKVLSKFFPFIFVFNFVLLGQIGACHVEVPYVLMGQI
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Vv SSVFFF-LFFAITPILGRVGRGIPNSYTDDETHT 393
At SSVFFF-LFFAITPILGRVGRGIPNSYTDDETHT
Xl ASVIYFSIFIMFFLMGWVENKLLRW
Bt ASVLYFLLLLVLMPTAGTIENKLLRW
Sc ATFLYFAYPLIIVPVISTTIENVLFYIGRVNK
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Figura 13. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos del COB de vid con otros organismos. *Vitis vinifera* (Vv), *At* (*Arabidopsis thaliana*), *Xenopus laevis* (Xl), *Borus taurus* (Bt) y *Saccharomyces cerevisiae* (Sc). Los asteriscos (*), indican los aminoácidos idénticos entre los 5 organismos. La numeración a la derecha indica el número de aminoácido.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Al caracterizar el gen *cob* de las cinco variedades de vid, se observó que las secuencias nucleotídicas son idénticas entre sí y no poseen intrones en su estructura. Por ello, se recomienda caracterizar regiones intergénicas del genoma mitocondrial de vid que posean la variabilidad requerida para ser utilizadas como marcadores moleculares. El tamaño del gen *cob* de vid fue idéntico al *cob* de las plantas *Arabidopsis*, papa y tabaco y su secuencia nucleotídica muy similar a la de las mismas. El ARNm de *cob* de vid, compartió algunos sitios de edición con respecto a *cob* de otras especies de plantas y presentó tres sitios únicos de edición en su ARNm. Los cambios en la secuencia de aminoácidos de COB de vid debido a la edición de su ARNm dieron como resultado una proteína más similar a COB de otros organismos lejanos del reino vegetal.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, K.L. and Palmer, J.D. 2003. Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 29:398-395.
- Adams, K.L., Song, K., Roessler, P.G., Nugent, J.M., Doyle, J.L., Doyle, J.J. and Palmer, J.D. 1999. Intracellular gene transfer in action: dual transcription and multiple silencing of nuclear and mitochondrial *cox2* genes in legumes. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 96:13863-13868.
- Asociación Agrícola Local de Uva de Mesa. 2003. [en línea]. Disponible en <http://www.aalpum.com.mx> (Revisado el 4 de Diciembre del 2003).
- Backert, S., Nielsen, B.L. and Böner, T. 1997. The mystery of the rings structure and replication of mitochondrial genomes from higher plants. *Trends in Plant Science*. 2:477-483.
- Binder, S. and Brennicke, A. 2003. Gene expression in plant mitochondria: transcriptional and post-transcriptional control. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*. 358:181-189.
- Bloom, M.V., Freyer G.A. and Micklos, D.A. 1996. Purification and Identification of Plasmid DNA in: *Laboratory DNA Science*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. pp 89-108.
- Broda, P. 1979. Structure and evolution of plasmids in: *Plasmids*. W.H Freedman and Company Oxford and San Francisco. pp 23-50.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W. and Jones, R.L. 2000. Respiration and Photorespiration en: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Siedow, J.N. y Day, D.A (ed). American. Soc. Plant Physiologist. pp. 676-727.

- Chen, W., Islas-Osuna, M.A. and Dieckmann, C.L. 1999. Suppressor analysis of mutations in the 5'-Untranslated region of *COB* mRNA identifies components of general pathways for mitochondrial mRNA processing and decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 151:1315-1325.
- Dawson, A.J., Jones, V.P. and Leaver, C.J. 1984. The apocytochrome *b* gene in maize mitochondria does not contain introns and is preceded by a potential ribosome binding site. *EMBO J.* 3:2107-2113.
- Di Rago, J.P., Copeé, J.Y. and Colson, A.M. 1989. Molecular basis for resistance to Myxothiazol, Mucidin (Strobilurin A), and Stigmatelli. *J. Biol. Chem.* 264:14543-14548.
- Geuna, F., Hartings, H. and Scienza, A. 2000. Plant DNA extraction based on grinding by reciprocal shaking of dried tissue. *Anal. Biochem.* 278: 228-230.
- Giegé, P. and Brennicke, A. 1999. RNA editing in *Arabidopsis* mitochondria effects 441 C to U changes in ORFs. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 96: 15324-15329.
- González-Halphen, D., Pérez-Martínez, X., Funes, S., Reyes-Prieto, A. and Santillán-Torres, JL .2003. La migración de genes de la mitocondria al núcleo y la evolución de los genomas mitocondriales. *Mensaje Bioquímico.* 27:201-219.
- Grohmann, L., Brennicke, A. and Schuster, W. 1992. The mitochondrial gene encoding ribosomal protein S12 has been translocated to the nuclear genome in *Oenothera*. *Nucleic Acids Research.* 20:5641-5646.
- Handa, H., Kubo, N. and Kadowaki, K. 1998. Genes for the ribosomal S4 protein encoded in higher plant mitochondria are transcribed, edited and translated. *Mol. Gen. Genet.* 258:199-207.
- Hanson, M.R., Sutton, C.A. and Lu, B. 1996. Plant organelle gene expression altered by RNA editing. *Trends in Plant Science.* 1:57-64.

- Hiesel, R., Haeseler, A.V. and Brennicke, A. 1994. Plant mitochondrial nucleic acid sequence as a tool for phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 91:634-638.
- Islas-Osuna, M.A., Ellis, T.P., Mittelmeier, T.M. and Dieckmann, C.L. 2003. Suppressor mutations define two regions in the Cbp1 protein important for mitochondrial cytochrome *b* mRNA stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet*. 43:327-336.
- Ito, Y., Nakazono, M., Kadowaki, K. and Tsutsumi, N. 1996. RNA editing of transcripts of the gene for apocytochrome *b* rice mitochondria. *Genes Genet. Syst.* 71:85-89
- Jones, C.D., Edwards, K.J., Castaglione, S., Winfield, M.O., Sala, F., Van de Wiel, C., Bredemeijer, G., Vosman, B., Matthes, M., Daly, A., Brettschneider, R., Bettini, P., Buiatti, M., Maestri, E., Malcevski, A., Marmoloni, N., Aert, R., Volckaert, G., Rueda, J., Linacero, R., Vázquez, A. and Karp, A. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP y SSR markers in plants by network or European laboratories. *Molecular Breeding*. 3:381-390.
- Kaleikua, E.K., André, C.P. and Walbot, V. 1992. Structure and expression of the rice mitochondrial apocytochrome *b*. *Curr. Genet*. 22:463-470.
- Kroymann, J. and Zetsche, K. 1997. The apocytochrome-*b* gene in *Chlorogonium elongatum* (*Chlamydomonadaceae*): an intronic GIY-YIG ORF in green algal mitochondria. *Curr. Genet*. 31:414-418.
- Kubo, T., Nishizawa, S., Sugawara, A., Itchonda, N., Estiati, A. and Mikami, T. 2000. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet . *Beta vulgaris* L. reveal a novel gene for tuna cys. *GCA. Nucleic Acids Research*. 28:2571-2576.
- Levings III, C.S. and Pring, D.R. 1976. Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA from normal and Texas cytoplasmic Male-Sterile maize. *Science*. 193:158-160.

- López-Gómez, R. and Gómez-Lim, M.A. 1992. A method for extracting intact RNA from fruit rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. *HortScience*. 27:440-442.
- Lodhi, M.A., Ye, G.N., Weeden, N.F. and Reisch, B.I. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Pl. Mol. Biol. Rep.* 12:6-13.
- Mackenzie, S. and McIntosh, L. 1999. Higher plant mitochondria. *The Plant Cell*. 11:571-585.
- Youssef, T. 2001. Ubiquinol: Cytochrome c Oxidoreductase (Complex III). *J. Biol. Chem.* 276:19006-19001.
- Meredith, C.P. 2001. Grape genetics: probing the past and facing the future. *Agriculturae Conspectus Scientificus*. 66:21-25
- Moreno, S., Gogorcena, Y. and Ortiz, J.M. 1995. The use of RAPD markers for identification of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Scientia Horticulturae*. 62:237-243.
- Muse, S.V. 2000. Examining rates and patterns of nucleotide substitution in plants. *Plant. Mol. Biol.* 42:25-43.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. and Cox, M.M. 1999. *Oxidative Phosphorylation and Photophosphorilation. Principles of biochemistry*. Third edition. Worth publishers, New York, NY. pp 661-671.
- Notsu, Y., Masood, S., Nishikawa, T., Kubo, N., Akiduki, G., Kakazono, M., Hirai A. and Kadowaki, K. 2002. The complete sequence of the rice *Oriza sativa* L. mitochondrial genome: frequent DNA sequence acquisition and loss during the evolution of flowering plants. *Mol. Genet. Genomics*. 268:434-445.

- Oda, K., Yamato, K., Ohta, E., Nakamura, Y., Takemura, M., Nozato, N., Akashi, K., Kanegae, T., Oruga, Y., Kohchi, and Ohama K .1992. Gene organization deduced from the complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.* 223:1-7.
- Quiñones, V., Zanlungo, S., Moenne, A., Gómez, I., Holuigue, L., Litvak, S. and Jordana, X. 1996. The *rpl5-rpl4-cob* gene arrangement in *Solanum tuberosum*: *rps 14* is a transcribed and unedited pseudogene. *Plant. Mol. Biol.* 31:937-943.
- Reynier, A. 2002. Ampelografía y mejora varietal En: Manual de Viticultura. Reynier, A. ed. Ediciones Mundi-Prensa. pp 39-87. Madrid, España.
- Robinson, M.M. and Wolyn, D.J. 2002. Complex organization of the mitochondrial genome of petaloid CMS carrot. *Mol. Genet. Genomics.* 268:232-239.
- Saint-Geroges, Y., Bonnefoy, N., di Rago, J.P., Chiron S. and Dugardin, G. 2002. A pathogenic cytochrome *b* mutation reveals new interactions between subunits of the mitochondrial *bc₁* complex. *J. Biol. Chem.* 277:49397-49402.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2 ed., Laboratory Press: Cold Spring Harbor, N.Y.,U.S.A.
- Sandoval, P., León, G., Gómez, I., Carmona, R., Figueroa, P., Holuigue, L., Araya, A. and Jordana, X .2003. Transfer of RPS14 and RPL5 from the mitochondrion to the nucleus in grasses. *Gene.* 324:136-147.
- Saraste, M.1999. Oxidative phosphorylation at the end of science. *Science.* 283: 1488-1493.
- Saunders, G.C and Parkers, H.C. 1999. DNA extraction in: Analytical Molecular Biology Quality and Validation. Saunders, G.C. ed. Redwood Books Ltd. pp 29-44.

- Saunders, G.C. and Parkers, H.C. 1999. PCR affecting Reability and Validity in: Analytical Molecular Biology Quality and Validation. McDowell, D. ed. Redwood Books Ltd. pp 58-80.
- Schuster, W., Hiesel, R., Wissinger, B. and Brennicke, A. 1990. RNA editing in the Cytochrome *b* Locus of the Higher Plant *Oenothera berteriana* includes a U to C Transition. *Molecular and Cell Biology*. 10:2428-2431.
- Schuster, W., Hiesel, R. and Brennicke, A. 1993. RNA editing in plant mitochondria. *Cell Biology*. 4:279-284.
- Sefc, K.M., Steinkellner, H., Glössl, J., Kampfer, S. and Regner, F. 1998. Reconstruction of a grapevine pedigree by microsatellite analysis. *Theoretical and Applied Genetics*. 97:227-231.
- Siles, B.A., O'Neil, K.A., Fox, M.A., Anderson, D.E., Kuntz, A.F., Ranghanath, S.C. and Morris, A.C. 2000. Genetic Fingerprinting of Grape Plant (*Vitis vinifera*) Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis and Dynamic Size-sieving Capillary Electrophoresis *J. Agric. Food. Chem.* 48:5903-5912.
- Städler, T. and Delph, L.F. 2002. Ancient mitochondrial haplotype and evidence for intragenic recombination in a gynodioecious plant. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 99:11730-11735.
- Tessier, C., David, J., This, P., Boursiquot, J.M. and Charrier, A. 1999. Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theor. Appl. Genet.* 98:171-177.
- Trumpower, B.L. 1990. The Protonmotive Q Cycle. *J. Biol. Chem.* 265:11409-11412.
- Unseld, M., Marienfeld, J.R., Brandt, P. and Brennicke, A. 1997. The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nature Genetics*. 15:57-61.

- Vařtilingo, M., Stupar, M., Grienberger, J.M. and Gualberto, J.M. 1998. A gene coding for an RPS2 protein is present in the mitochondrial genome of several cereals, but not in dicotyledons. *Mol. Gen. Genet.* 258:530-537.
- Vedel, F., Lalanne, E., Sabar, M., Chétrit, P. and De Paepe, R. 1999. The mitochondrial respiratory chain and ATP synthase complex: Composition, structure and mutational studies. *Plant Physiology Biochem.* 37:629-643.
- Von Jagow, G., Ljungdahl, P.O., Graf, P., Ohnishi, T. and Trumpower, B.L. 1984. An inhibitor of mitochondrial respiratory which binds to Cytochrome *b* and displaces Quinone from the Iron-Sulfur protein of the Cytochrome *bc₁* Complex. *J. Biol. Chem.* 259:6318-6326.
- Watson, J.D., Gilman, D., Witkowski, J. and Zoller, M. 1992. ADN is the Primary Genetic Material in: Recombinant ADN. 2nd. ed. Scientific American Books. pp:13-32.
- Wolstenholme, D.R. and Fauron, C.M.R. 1995. The molecular biology of plant mitochondria. Bioenergetics in: The mitochondrial electron transfer chain. Levings III, C.S and Vasil I.K . eds. Kluswer Academic Publisher. pp 281-312.
- Zanlungo, S., Bégu, D., Quiñones, V., Arayan, A. and Jordana X. 1993. RNA editing of apocytochrome *b cob* transcripts in mitochondria from two genera of plants. *Curr. Genet.* 24:344-348.
- Zheng, D. and Köller, W. 1997. Characterization of the cytochrome *b* gene from *Venturia inaequalis*. *Curr. Genet.* 32:361-366.
- Zhuo, D. and Bonen, L. 1993. Characterization of the S7 ribosomal protein gene in wheat mitochondria. *Mol. Gen. Genet.* 236:395-401