



**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

**Transcriptómica en diferentes condiciones de madurez del  
fruto de genotipos de tomate (*Solanum lycopersicum*) que  
discrepan para la vida poscosecha de los frutos**

**Eduardo Daniel Souza Canada**

**TRABAJO FINAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE *ESPECIALISTA EN BIOINFORMÁTICA***

---

**DIRECTOR: Dr. Javier H. Pereira da Costa**

2021

**Transcriptómica en diferentes condiciones de madurez  
del fruto de genotipos de tomate (*Solanum  
lycopersicum*) que discrepan para la vida poscosecha de  
los frutos**

**Eduardo Daniel Souza Canada**

**Doctor en Ciencias Naturales (Dr. rer. nat.)**

**Univesidad de Bayreuth, Instituto de Fisiología Vegetal. Alemania**

Este Trabajo Final es presentado como parte de los requisitos para optar al grado académico de Especialista en ***Bioinformática***, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. El mismo contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la **Facultad de Cs. Agrarias, Univ. Nac. De Rosario**, durante el período comprendido entre **2019 y 2021**, bajo la dirección de **Dr. Javier H. Pereira da Costa**.

Nombre y firma del autor

Nombre y firma del Director

Defendida.....de 20\_\_\_\_\_

## AGRADECIMIENTOS

---

### **Agradecimientos**

- Al doctor Javier H. Pereira da Costa por acompañarme en el desarrollo del trabajo final, por su dedicación y sus consejos.
- A todo el cuerpo docente y no docente de la Especialización en Bioinformática, por el trabajo compartido durante estos años.

## ABREVIATURAS

---

### Abreviaturas

ADNc (del inglés cDNA)	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADNc-AFLP (del inglés cDNA-AFPL)	Polimorfismo de longitud de fragmento amplificado basado en ADN complementario
AFLP	Polimorfismo de longitud de fragmento
<i>alc</i>	<i>alcobaca</i>
ARN (del inglés RNA)	Ácido ribonucleico
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CDS (en inglés Coding Sequence)	Región codificante
<i>cnr</i>	<i>colorless non-ripening</i>
FDT (del inglés TDF)	fragmentos derivados de un transcritpo
ID	Identificador
mARN (del inglés mRNA)	Ácido ribonucleico mensajero
NCBI	National Center for Biotechnology Information
<i>nor</i>	<i>non ripening</i>
<i>Nr</i>	<i>never ripe</i>
pb (del inglés bp)	Pares de bases
PlantCARE	Plant <i>cis</i> -acting regulatory elements database
<i>rin</i>	<i>ripening inhibitor</i>
RNAseq	Secuenciación de ARN
RT-qPCR	PCR cuantitativa con transcripción inversa
SGN	Sol Genomics Network
SIT (del inglés TSS)	sitio de inicio de la transcripción
Solyc	<i>Solanum lycopersicum</i>
SUFT (del inglés TFBS)	Sitios de unión del factor de transcripción

### Resumen

El tomate *Solanum lycopersicum* L., por su genoma pequeño, un ciclo de vida corto, mutantes de maduración bien caracterizados, ricos recursos genómicos e importancia comercial ha sido utilizado como modelo en estudios de maduración de frutos climatéricos, así como para dilucidar las bases genéticas y epigenética de numerosos caracteres de interés agronómico. Varios mutantes de maduración importantes, incluidos CNR, RIN y NOR han proporcionado nuevos conocimientos sobre el control de los procesos de maduración. Estos genes, que bloquean o alargan el proceso de la madurez, confieren larga vida poscosecha a los frutos, pero producen efectos indeseados sobre la calidad debido a su acción pleiotrópica sobre las vías metabólicas que brindan un adecuado sabor, aroma, textura, etc. Se ha demostrado que los frutos de las formas silvestres *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* y *S. pimpinellifolium* tienen mayor vida poscosecha que los cultivares comerciales de tomate pero menor que los genotipos homocigotas para los mutantes de madurez del fruto *nor* y *rin* de *S. lycopersicum* y que esta prolongación de la vida poscosecha se logra sin detrimentos de otros caracteres de calidad organoléptica. A pesar de que *S. lycopersicum* y *S. pimpinellifolium* tienen diferencias fenotípicas extremas, existen relativamente pocas diferencias entre las especies de tomates silvestres y cultivadas a nivel de secuencia del genoma (cercanas al 0,6%). De acuerdo con esto, se ha postulado que las diferencias fenotípicas se deben a las funciones de las proteínas y, en consecuencia a la regulación del transcriptoma. Muchos de los procesos bioquímicos y metabólicos asociados con la maduración de los frutos requieren cambios en la expresión de cientos a miles de genes. Los estudios de expresión diferencial ayudan a comprender el control del crecimiento y desarrollo de las plantas y a identificar puntos de control específicos del metabolismo. La técnica denominada ADNc-AFLP (Polimorfismo de longitud de fragmento amplificado basado en ADNc), ha sido ya utilizada como una primera aproximación transcriptómica a los procesos moleculares asociados a la madurez del fruto. La regulación de la expresión génica es un proceso complejo que puede ocurrir en varios niveles, principalmente a nivel transcripcional con la acción coordinada los elementos *cis*-regulatorios presentes en los promotores y que son reconocidas por los factores que actúan en *trans*. En el presente trabajo se pretende: 1- Identificar

## RESUMEN

---

genes con expresión diferencial en frutos que maduran en planta y en estantería en genotipos discrepantes para la vida poscosecha de tomate y 2- Describir y analizar *in silico* el rol de los promotores y los elementos reguladores que actúan en *cis* en la regulación de la expresión. Para ello se utilizaron los siguientes genotipos de *S. lycopersicum*: el cv Caimanta, (madurez normal) y el cv Nor (entrada 804627, mutante para el gen *nor*). Los genotipos silvestres: *S. lycopersicum* var *cerasiforme* (entrada LA1385) y *S. pimpinellifolium* (entrada LA722) con genes que prolongan la vida poscosecha. Al comparar, los perfiles de expresión obtenidos por ADNc-AFLP se observó menor cantidad de fragmentos derivados de transcritos (FDTs) totales en todos los genotipos cuando los frutos maduran en estantería (2481), en comparación con aquellos que lo hacen en planta (2660). Además, se evidenció que la cantidad total de genes, como así también los genes específicos que se activan o reprimen, dependen del genotipo, en particular cuando el fruto madura en estantería. Por el contrario, durante la maduración del fruto en la planta, la cantidad total y específica de genes que se expresan es independiente del genotipo, indicando que dicho proceso parece ser similar entre ellos. El genotipo NOR, contrariamente a lo esperado, mostró la mayor cantidad de FDTs (fragmentos derivados de un transcritos) totales y específicos del sitio de maduración, lo que evidenciaría que otros genes que se encuentran activos escapan a la modulación del factor de transcripción codificado por el gen *nor*. Se logró identificar y validar por RT-qPCR genes que evidenciaron expresión diferencial detectados por ADNc-AFLP. El análisis funcional de estos genes mostró que la respuesta a estrés fue la función con más representación en los frutos que maduraron en planta. El análisis *in silico* de los elementos *cis*-regulatorios de la región promotora de los genes con expresión diferencial en planta y estantería, evidenció diferencias estructurales. La localización de los motivos *cis* en genes expresados en frutos que maduran en estantería sugiere que estos genes podrían estar regulados en la región proximal. Por el contrario, en planta un 48,8% de los elementos *cis*-regulatorios se localizaron más alejados del codon ATG, lo que dejaría suponer una regulación en la región distal. Estos resultados permitieron un acercamiento a los posibles mecanismos de control, vinculando la maduración de los frutos con la respuesta a estrés. Además, estos resultados reforzarían por un lado, las diferencias fenotípicas existente entre los

## RESUMEN

---

genotipos y por otro la influencia del sitio de maduración (planta o estantería), sobre la expresión génica en frutos de tomate.

**Palabras clave:** *Solanum lycopersicum*; maduración del fruto; ADNc-AFLP; análisis *in silico*; elementos *cis*-regulatorios

**Transcriptomics at different fruit maturity conditions of tomato (*Solanum lycopersicum*) genotypes that differ for the postharvest life of the fruits**

**Abstract**

The aims of this work are: 1- To identify genes with differential expression in fruit ripening on the plant and on the shelf in discrepant genotypes for tomato postharvest life and 2- To describe and to analyze *in silico* the role of promoters and *cis*-regulatory elements. For this purpose, the following *Solanum lycopersicum* genotypes were used: cv Caimanta, (normal maturity) and cv Nor (entry 804627, mutant for the *nor* gene). The wild genotypes: *S. lycopersicum* var *cerasiforme* (entry LA1385) and *S. pimpinellifolium* (entry LA722) with genes that prolong postharvest life. By comparing the expression profiles obtained by cDNA-AFLP showed a lower amount of total transcript-derived fragments (TDFs) in all genotypes when the fruits mature in shelf (2481), compared to those in plant (2660). It was evident that the amounts of expressed total and specific genes that are activated or repressed depend on the genotype, particularly in fruits ripening on shelf. On the contrary, in plant their expressions were independent of the genotype, indicating that this process seems to be similar among them. The NOR genotype, contrary to expectations, showed the highest amount of total and specific TDFs of the maturation site, which would indicate that other active genes are not modulated by the transcription factor encoded by the *nor* gene. It was possible to identify and validate by RT-qPCR genes that evidenced differential expression detected by cDNA-AFLP. Functional analysis of these genes showed that stress response was the most represented function in the fruits that ripened on plant. *In silico* analysis of the *cis*-regulatory elements of the promoter region of the differentially expressed genes in plant and shelf showed structural differences. The localization of *cis* motifs in genes expressed in shelf-ripening fruits suggests that these genes might be regulated in the proximal region. On the contrary, in plant, 48.8% of the *cis*-regulatory elements were located further away from ATG, which would suggest a regulation in the distal region. These results allowed an approach to possible control mechanisms, linking fruit ripening with the stress response. In addition, these results would reinforce, on the one hand, the



## ABSTRACT

---

phenotypic differences between genotypes and, on the other, the influence of the ripening site (plant or shelf) on gene expression in tomato fruits.

**Keywords:** *Solanum lycopersicum*; fruit ripening; cDNA-AFLP; *in silico* analysis; *cis*-regulatory elements.

# INDICE

---

## Indice

1.- Introducción .....	1
2.- Objetivos generales .....	7
2.1- Objetivos específicos .....	7
3.- Materiales y métodos.....	8
3.1- Material vegetal .....	8
3.2- Recolección de tejido de frutos y extracción de ARN total .....	8
3.3- Obtención de ADNc por transcriptasa inversa y obtención de ADNc-AFLP. ....	9
3.4- Análisis de geles y secuenciación de los transcritos de interés.....	10
3.5- Identificación en bases de datos bioinformáticas de las secuencias polimórficas.....	10
3.6- Validación de la expresión diferencial a través de la RT-qPCR cuantitativa .....	11
3.7- Análisis estadístico de la expresión génica diferencial.....	11
3.8- Identificación de los genes polimórficos y su análisis estructural .....	12
3.9- Identificación de las regiones promotoras y análisis de los elementos <i>cis</i> -regulatorios .....	12
4.- Resultados .....	14
4.1- Caracterización y comparación de los perfiles de ADNc-AFLP de expresión diferencial .....	14
4.2- Identificación de fragmentos derivados de genes con expresión diferencial.....	17
4.3- Validación por RT-qPCR de los genes con expresión diferencial.....	20
4.4- Análisis estructural de los genes polimórficos .....	22
4.5- Identificación de las regiones promotoras y análisis de los elementos <i>cis</i> -regulatorios .....	22
5.- Discusión .....	31
5.1- Caracterización y comparación de los perfiles de ADNc-AFLP de expresión diferencial .....	31
5.2- Búsqueda en bases de datos bioinformáticas de las secuencias polimórficas encontradas.....	34
5.3- Validación por RT-qPCR, identificación de regiones promotoras y análisis de elementos <i>cis</i> -regulatorios de los genes con expresión diferencial .....	35
6.- Conclusión .....	44
7.- Anexo.....	46
8.- Bibliografía .....	50

## 1.- Introducción

El tomate cultivado (*Solanum lycopersicum*) es una especie autógama, en la cual la calidad de sus frutos juega un rol importante tanto en la producción como para su consumo. El tomate presenta la ventaja de poseer un genoma pequeño, un ciclo de vida corto, mutantes de maduración bien caracterizados, ricos recursos genómicos e importancia comercial (Giovannoni, 2007; Moore *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2014). Todas estas características, hacen que el tomate sea utilizado como modelo para estudios sobre maduración de frutos climatéricos, y para dilucidar la base genética y epigenética de caracteres de importancia agronómica (Klee and Giovannoni, 2011; Zhong *et al.*, 2013).

Desde el punto de vista de la evolución, la maduración de los frutos es un proceso de desarrollo complejo y altamente coordinado que coincide con la maduración de la semilla. Muchos de los procesos bioquímicos y metabólicos asociados con esta fase requieren cambios en la expresión de cientos a miles de genes (Alba *et al.*, 2005), llamados "genes de maduración" (Li *et al.*, 2021). Estos genes tienen que activarse y desactivarse de manera altamente coordinada, para controlar cambios dramáticos como el ablandamiento del fruto, la acumulación de pigmentos, azúcares, ácidos y compuestos volátiles. Al inicio del desarrollo del fruto se distingue una primera fase de división celular, seguida por una de expansión celular y luego en la fase final de madurez, cuando las semillas ya están maduras, no hay incrementos significativos en el número ni el tamaño de las células. La maduración de los frutos implica una transición desde el estado verde (cuyas características lo hacen no deseable para el consumo, protegiendo así a las semillas en desarrollo) hacia el estado maduro, atractivo para determinados herbívoros que al consumirlo transportan las semillas asegurando su dispersión (Grierson y Fray, 1994). Desde el punto de vista del consumo, el estado de madurez del fruto en el momento de la cosecha, condiciona la calidad del producto final y el mantenimiento de esta condición durante un cierto período (Hewitt y Garvey, 1987). La acumulación de pigmentos carotenoides y el ablandamiento del fruto permiten distinguir diversos estados en la madurez del fruto: verde maduro (*mature green*), rompiente (*breaker*), pintón (*turning*), rosa (*orange*), rojo firme (*red firm*) y rojo maduro (*red ripe*) (Giovannoni, 2004; Nuez, 1991; Rick,

1978). Además, los cambios fisiológicos que se suceden después de la cosecha han sido ampliamente estudiados. Se ha encontrado que los frutos cosechados en estado verde maduro y que luego alcanzan la madurez en estantería a 20 °C, presentan concentraciones inferiores de ácido ascórbico, mayor contenido de material en los lóculos y una menor calidad sensorial que aquellos frutos que han completado su madurez en planta (Betancourt *et al.*, 1977).

Varios mutantes de maduración importantes, incluidos CNR, RIN y NOR han proporcionado nuevos conocimientos sobre el control de los procesos de maduración (Klee y Giovannoni, 2011). Los avances en la clonación basada en mapas genéticos ayudaron a centrar la atención en cuatro mutaciones de maduración espontáneas en *S. lycopersicum*: tales como *rin* (*ripening inhibitor*), *nor* (*non ripening*), *Nr* (*never ripe*), *cnr* (*colorless non-ripening*). Estos genes, que bloquean o alargan el proceso de la madurez (Li *et al.*, 2021), confieren larga vida poscosecha a los frutos, pero producen efectos indeseados sobre la calidad debido a su acción pleiotrópica sobre las vías metabólicas que brindan un adecuado sabor, aroma, textura, etc. El análisis genético sugirió que las versiones “*wild type*” de estos genes que codifican para factores de transcripción (FT) eran absolutamente necesarios para que la maduración ocurra, y se los puede considerar como “reguladores maestros” (Li *et al.*, 2021). La mayoría de los híbridos actuales “de larga vida” comercial llevan en heterocigosis el gen *rin*, el *alc* (*alcobaca*) o el *nor*.

La obtención de genotipos de tomate con “larga vida” en estantería ha sido uno de los objetivos principales en los programas de mejoramiento genético. (Pereira da Costa *et al.*, 2009). Es bien sabido que la domesticación y la posterior fijación de alelos debido a la autogamia han llevado a una reducción de la variabilidad entre los genotipos cultivados (Rick, 1988). Varios estudios moleculares han demostrado que gran parte de la variabilidad genética todavía está presente en genotipos silvestres (Labate *et al.*, 2011; Miller y Tanksley, 1990). Se ha demostrado que los frutos de las formas silvestres *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* y *S. pimpinellifolium* tienen mayor vida en estantería que los cultivares comerciales de tomate pero menor que los genotipos homocigotas para los mutantes de madurez del fruto *nor* y *rin* de *S. lycopersicum* (Pratta *et al.*, 1996; Zorzoli *et al.*, 1998) y que esta prolongación de la vida poscosecha se logra sin detrimentos de otros caracteres de calidad

organoléptica. A pesar de que *S. lycopersicum* y *S. pimpinellifolium* tienen diferencias fenotípicas extremas, existen relativamente pocas diferencias entre las especies de tomates silvestres y cultivadas a nivel de secuencia del genoma son muy bajas (0,6%) (Michael and Alba, 2012). De acuerdo con esto, Michael y Alba (2012) postularon que es muy probable que estas diferencias afecten la función de la proteína y en consecuencia a la regulación del transcriptoma.

Con el desarrollo de nuevas herramientas genómicas como la transcriptómica, proteómica y metabolómica, las estrategias para estudiar el desarrollo del fruto están cambiando y abren nuevas perspectivas y oportunidades (Rolin *et al.*, 2015). Los estudios de expresión diferencial de genes constituyen una base para comprender el control del crecimiento y desarrollo de las plantas, como así también permiten la identificación de puntos de control específicos del metabolismo. Las técnicas de aislamiento de genes expresados diferencialmente incluyen tanto las técnicas clásicas de hibridación diferencial y substractiva (Gray *et al.*, 1992; Sargent, 1987; Woodhead *et al.*, 1998) como las técnicas basadas en PCR para la amplificación selectiva del ADN complementario (ADNc). La principal ventaja de estas últimas es su capacidad de identificar rápida y simultáneamente ARNm expresados en diferentes células o tejidos, en diferentes estadios del desarrollo o bajo condiciones alteradas. Un método muy utilizado para el análisis de la expresión de familias de multigenes es el desarrollado por Fischer *et al.* (1995), que combina el *Differential Display* con la técnica de AFLP (Vos *et al.*, 1995). Esta técnica de cribado diferencial denominada ADNc-AFLP, es un instrumento que sirve para estudiar e identificar la expresión de genes regulados diferencialmente en plantas y otros organismos (Frank *et al.*, 2009; Molesini *et al.*, 2009; Stölting *et al.*, 2009; Vriezen *et al.*, 2008) y así revelar la base molecular de un sistema biológico (Xiao *et al.*, 2016). Por otra parte, esta técnica se ha mejorado aún más para evitar la posibilidad de que varios fragmentos derivados de un transcrito (FDT) surjan de un solo gen/ADNc (Breyne *et al.*, 2003). En esencia, el método original ADNc-AFLP (Bachem *et al.*, 1996) implica la transcripción inversa del ARNm en ADNc bicatenario, seguida de la generación de una mezcla compleja de FDTs, mediante la digestión con enzimas de restricción y la ligación de adaptadores específicos, así como la amplificación selectiva por PCR y finalmente la visualización de los FDTs en geles de alta

resolución (Vuylsteke *et al.*, 2007). Las diferencias observadas en la presencia y ausencia de bandas entre las muestras proporcionan una buena medida de las diferencias relativas en los niveles de expresión génica. La identificación de genes de interés expresados diferencialmente requiere purificar los FDTs resultantes a partir de los geles, seguido de su amplificación y su posterior secuenciación. En tomate, Vriezen *et al.* (2008) emplearon ADNc-AFLP para estudiar los cambios en el transcriptoma del ovario de tomate y demostraron que una compleja regulación hormonal determina la fructificación. Molesini *et al.* (2009) examinaron el perfil de expresión por ADNc-AFLP durante el desarrollo temprano de frutos de tomate, partenocárpicos y normales, y detectaron 212 transcriptos expresados diferencialmente. Zhao *et al.* (2015) utilizó ADNc-AFLP para identificar genes resistentes a *Cladosporium fulvium* en tomate. El ADNc-AFLP se usó generalmente para estudiar la expresión diferencial en un solo genotipo bajo condiciones cambiantes o contrastantes de estrés biótico o abiótico. Sin embargo, cuando es necesario evaluar más de dos genotipos y varias etapas de maduración, el ADNc-AFLP se convierte en un método alternativo más económico que RNAseq. Por lo tanto, en esas situaciones definitivamente puede ser un primer acercamiento al estudio del transcriptoma. De hecho, Pereira da Costa *et al.* (2018) utilizaron ADNc-AFLP para explorar la expresión de genes asociados a tres estados de maduración en frutos de distintos genotipos de tomate, demostrando que dicha expresión está condicionada por el *background* genético en el que se observan.

El proceso en el que la célula controla la activación de un subconjunto de genes se denomina regulación génica (Gilly, 2012). La regulación de la expresión génica es un proceso muy complejo y puede ocurrir en varios niveles, principalmente a nivel transcripcional con la acción coordinada los elementos *cis*-regulatorios presentes en los promotores y que son reconocidas por los factores que actúan en *trans*. Existen diferentes tipos de promotores que tienen diferentes funciones en la regulación génica, como los promotores constitutivos, los promotores específicos de tejido, los promotores inducidos por el medio ambiente y los promotores químicamente inducidos (Pawełkiewicz *et al.*, 2015). En términos simples, los promotores son secuencias de ADN situadas “corriente arriba” (*upstream*) de las regiones codificantes de estos (Figura 1). Una región reguladora se compone de tres

regiones: el promotor central (~ 80-100 pb que rodea el sitio de inicio de la transcripción (SIT)), el promotor proximal (~ 250-1000 pb corriente arriba del promotor central) y el promotor distal que se encuentra más lejos corriente arriba (Berumen-Varela *et al.*, 2017). Cada promotor contienen una combinación única de múltiples elementos *cis*. Los elementos *cis*-regulatorios son secuencias específicas de consenso cortas, de aproximadamente 5-25 pb (Rani, 2007) como por ejemplo la caja CAAT y la caja TAAT (sitio de unión de factores de transcripción o histonas, involucrado en el proceso de transcripción por la ARN polimerasa). Asimismo, son sitios de unión específicos para proteínas, a los cuales se los denomina sitios de unión del factor de transcripción (SUFT) y su identificación y análisis funcional es fundamental para comprender mejor la función del promotor (Ibraheem *et al.*, 2010; Lau *et al.*, 2009). Cada elemento *cis* o motivo se une a un factor de transcripción (FT) característico (Brown, 2002), el cual puede regular múltiples genes (Pawelkowicz *et al.*, 2015). Los SUFT actúan en la iniciación y en la regulación de la transcripción, a través de una compleja interacción entre el ADN y las proteínas que conducen a la activación, mejora o supresión de la transcripción. Por lo tanto, la regulación de la transcripción depende de: (a) la disponibilidad y actividad de los factores de transcripción, y (b) el tipo, número, posición y combinación de elementos reguladores presentes en el promotor y sus alrededores (Zuo y Li, 2011).

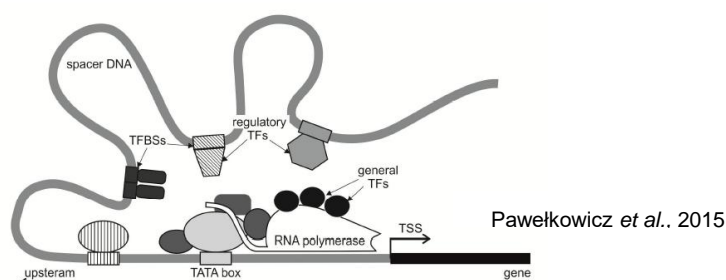


Fig. 1. Esquema de un promotor y la interacción de FTs (TFs) con los SUFT (TFBS) en la regulación de genes.

El análisis del genoma *in silico* de los elementos *cis*-regulatorios es importante para comprender mejor la regulación global de los genes a nivel del organismo. Hoy en día, tanto la genómica como la transcriptómica se han convertido en instrumentos muy útiles para la realización de estudios, identificación, descubrimiento de

promotores y predicción a gran escala de sus secuencias y sus elementos *cis*-regulatorios (Hernandez-Garcia and Finer, 2014). Las herramientas bioinformáticas de predicción como las bases de datos disponibles como PlantCARE, PLACE proporcionan medios de acceso para el análisis *in silico* de secuencias reguladoras en promotores de una forma cómoda y sencilla. Koul *et al.* (2019) han secuenciado los elementos *cis*-regulatorios del promotor y las regiones no traducidas 5' y 3' de los genes perteneciente a la ruta de los carotenoides, seguidas de su validación *in silico*, en 40 accesiones diferentes de tomate, para comprender los mecanismos reguladores subyacentes en la biosíntesis y acumulación de carotenoides. De este modo encontraron que las principales diferencias observadas en CAAT Box, Opaque-2 Box y L-box en los promotores de los genes de carotenoide isomerasa y  $\beta$ -licopeno ciclasa, respectivamente, junto a variaciones en el elemento de unión a musashi del gen de carotenoide isomerasa, sugieren un papel diferencial en la regulación del proceso de carotenogénesis en tomate.

Hasta la fecha, no se ha publicado ningún trabajo sobre los factores de transcripción / elementos *cis*-regulatorios que regulan la expresión de los genes con expresión diferencial en frutos que maduran en planta y en estantería en genotipos discrepantes para la vida poscosecha de tomate. Por lo tanto, el enfoque de este estudio fue utilizar la predicción de una herramienta bioinformática disponible para realizar una descripción de los elementos *cis*-regulatorios que están presentes dentro de la región 5' reguladora de las secuencias de ADN de estos genes; como fuente de información potencialmente útil para la predicción de la expresión y regulación de estos genes. Este análisis es el primer paso para descubrir las interacciones reguladoras de la transcripción de estos genes durante el desarrollo o en condiciones de estrés ambiental.

Por lo tanto, en este trabajo, se postula la hipótesis de que existen transcritos diferenciales que permiten caracterizar genotipos que discrepan para el carácter vida poscosecha y también que la expresión de los genes varía en función del sitio de maduración (planta o estantería). Al mismo tiempo un análisis *in silico* de las secuencias promotoras y elementos *cis*-regulatorios de estos genes permiten un acercamiento a los putativos mecanismos de control.



### **2.- Objetivos generales**

Identificar genes con expresión diferencial en frutos que maduran en planta y en estantería en genotipos discrepantes para la vida poscosecha de tomate.

Describir y analizar *in silico* el rol de los promotores y los elementos reguladores que actúan en *cis* en la regulación de la expresión.

#### **2.1- Objetivos específicos**

Comparar perfiles de expresión diferencial en frutos que alcanzan la madurez en la planta con los perfiles de frutos que maduraron fuera de la planta.

Identificar y validar por RT-qPCR los genes con expresión diferencial.

Analizar *in silico* las secuencias promotoras y elementos que actúan en *cis* y dilucidar su rol en el proceso maduración diferencial de los frutos.

### **3.- Materiales y métodos**

Durante el desarrollo del presente trabajo final de Especialización en Bioinformática no se llevaron a cabo tareas de mesada de laboratorio, sino el análisis, interpretación y discusión de los resultados obtenidos a partir de la aplicación de diferentes técnicas de biología molecular. A continuación se detallan los materiales y métodos empleados tanto para la obtención de los resultados como para su análisis.

#### **3.1- Material vegetal**

Se utilizaron los siguientes genotipos de *S. lycopersicum*: el cv Caimanta, (madurez normal) y el cv Nor (entrada 804627, mutante para el gen *nor*). Los genotipos silvestres: *S. lycopersicum* var *cerasiforme* (entrada LA1385) y *S. pimpinellifolium* (entrada LA722) con genes que prolongan la vida poscosecha (Pereira da Costa *et al.*, 2018; Rodríguez *et al.*, 2010). La siembra de los genotipos se realizó en almácigos y el trasplante a invernáculo se hizo a los 45 días de la siembra en surcos separados por 1,40 metros y con una distancia de 40 centímetros entre plantas. Las plantas (10 plantas por genotipo) fueron tutoradas en espaldera y se efectuaron todas las labores culturales propias del cultivo del tomate. Por otro lado en cada genotipo, se cosecharon 3 frutos en el estado rompiente (determinado visualmente cuando los frutos alcanzaron el 10 % del color de madurez final), que se almacenaron en la estantería a 25 +/- 3 grados y otros 3 frutos se marcaron en la planta. Posteriormente, a los 5 días, tanto a los frutos almacenados en la estantería como a los marcados en planta, se los acondicionó para la obtención de ARN.

#### **3.2- Recolección de tejido de frutos y extracción de ARN total**

A los frutos de tomate cosechados en los diferentes estados de madurez se les separó el pericarpio (previa remoción de semillas y epicarpio) e inmediatamente se sumergieron en N<sub>2</sub> líquido para detener todos los procesos metabólicos del fruto. Luego se almacenaron a -80 °C hasta el procesamiento de las muestras para extracción del ARN total. El ARN total se extrajo con Triazol siguiendo la técnica descrita por (Anjanasree *et al.*, 2005; Saladié *et al.*, 2007). Se extrajo ARN de tres frutos provenientes de tres plantas distintas (réplicas biológicas) de cada uno de los

cuatro genotipos en los dos sitios de maduración planta y estantería. Es decir, seis muestras por genotipo y n total de 24.

### 3.3- Obtención de ADNc por transcriptasa inversa y obtención de ADNc-AFLP.

A partir del ARN total, se extrajo una fracción rica en ARN poli(A) mediante captura magnética utilizando el sistema comercial “PolyATtract® mRNA Isolation Systems (Promega). La síntesis de la primera y segunda hebra de ADNc se llevó a cabo mediante protocolo estándar (Sambrook *et al.*, 1989). La calidad del producto se verificó en geles de agarosa y se sometió a la digestión con las enzimas de restricción *ApoI* y *MseI*, según el protocolo de AFLP (Vos *et al.*, 1995). Los adaptadores, condiciones de ligación, de amplificación y cebadores específicos fueron los mismos descritos por Pereira da Costa *et al.* (2018). Para la amplificación selectiva se utilizaron seis combinaciones de cebadores, las cuales se indican en la Tabla 1. Los fragmentos amplificados fueron separados por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 5 % p/v y visualizados por tinción con nitrato de plata.

Tabla 1. Enzimas de restricción, adaptadores, cebadores para pre-amplificación y combinaciones de cebadores específicos para la amplificación selectiva utilizados para la obtención de perfiles de ADNc-AFLP a partir de ARN de frutos madurados en planta y en estantería.

Enzimas de restricción		<i>ApoI</i>	<i>MseI</i>
Adaptadores	<i>Top Strand</i>	CTCGTAGACTGCGTACC	GACGATGAGTCCTGAG
	<i>Bottom Strand</i>	AATTGGTACGCAGTCTAC	TACTCAGGACTCAT
Cebadores Pre-amplificación (0)		CTCGTAGACTGCGTACCAATT	GACGATGAGTCCTGAGTAA
Cebadores Amplificación selectiva (+1)		GACTGCGTACCAATTG (Apo11) GACTGCGTACCAATTA (Apo12) GACTGCGTACCAATTC (Apo13)	GATGAGTCCTGAGTAAG (Mse37) GATGAGTCCTGAGTAAT (Mse38)
		Combinación A      Apo11-Mse37	Combinación D      Apo11-Mse38
		Combinación B      Apo12-Mse37	Combinación E      Apo12-Mse38
		Combinación C      Apo13-Mse37	Combinación F      Apo13-Mse38

### **3.4- Análisis de geles y secuenciación de los transcritos de interés.**

Los geles se digitalizaron con escáner de mesa y se analizaron utilizando el *software* GelPro Analyzer para Windows (version 3.0.00.00; Media Cybernetics, Maryland, US). Para todos los genotipos y sitios de maduración (planta o estantería) se determinó la presencia y la ausencia de bandas o Fragmentos derivados de transcritos (FDTs). Se contabilizaron el número total de bandas y el número de bandas polimórficas entre sitios de maduración por genotipo. Se utilizó la prueba de chi-cuadrado de independencia para probar si los FDTs exclusivos y totales dependen del genotipo y sitio de maduración del fruto en planta y estantería.

Aquellas bandas que mostraron un patrón presencia/ausencia claramente visible fueron cortadas, eluidas, reamplificadas y secuenciadas contratando el servicio de secuenciación de Macrogen Inc., Corea.

### **3.5- Identificación en bases de datos bioinformáticas de las secuencias de fragmentos polimórficos**

La secuencia de los fragmentos polimórficos reamplificados fueron comparadas con otros genes depositados en las bases de datos públicas. Para las búsquedas de homología se utilizó la herramienta bioinformática de alineación local básica BLAST, perteneciente a la base de datos *Tomato Genome cDNA (ITAG release 4.0)* de Sol Genomics Network (SGN, <https://solgenomics.net>), en donde fue seleccionado el programa “blastn (nucleotide to nucleotide db)”. Para aquellas secuencias no encontradas en Sol Genomics se exploró con el programa BLASTn (nucleótido a nucleótido) disponible en National Center for Biotechnology Information (NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)). Se emplearon los siguientes parámetros: “Database: Standard databases (nr etc), Reference RNA sequences (refseq\_rna)”, “Organism: Solanaceae (taxid: 4070)” y “Highly similar sequences (megablast)”. Sobre la secuencia génica identificada se diseñaron cebadores específicos, utilizando el *software* *Primer3* versión 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), utilizándolos parámetros por “default”, fijando los “Rangos del tamaño del producto”, entre 100-300 pares de bases. Se llevó a cabo una PCR *in silico* (<https://solgenomics.net>) para verificar la especificidad de los cebadores y descartar la amplificación de otro amplicón no deseado.

Los identificadores para cada gen de tomate están compuesto de la siguiente manera, "Solyc" es la abreviatura de 5 letras de *Solanum lycopersicum*, el número de 2 dígitos a continuación indica el número de cromosoma, la "g" indica que la secuencia es un gen, a continuación el número de 6 dígitos que sigue a la "g" identifica el gen en el cromosoma, comenzando en la parte superior y contando en 10 incrementos. El número siguiente al punto denota el número de versión de anotación del *locus* (<https://solgenomics.net>).

### **3.6- Validación de la expresión diferencial a través de la RT-qPCR cuantitativa**

Para la validación de la expresión diferencial de los genes identificados por ADNc-AFLP se realizó una RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR). Para ello se emplearon los cebadores específicos desarrollados en el punto anterior. Se hicieron dos réplicas técnicas por muestra y tres réplicas biológicas. Como gen de control interno de referencia se emplearon aquellos recomendados por Expósito-Rodríguez *et al.*, (2008). La química de detección utilizada fue la de *Syber Green*. Las reacciones fueron preparadas en un volumen total de 20  $\mu$ l, conteniendo 4  $\mu$ l (10  $\eta$ g/ $\mu$ l) del molde, 2  $\mu$ l (10  $\mu$ M) de cada cebador y 10  $\mu$ l del buffer 2 $\times$  *FastStart SYBR Green Master (Roche Applied Science)*. Los controles blancos se hicieron por triplicado para cada mezcla maestra. Las condiciones de ciclado se establecieron de la siguiente manera: paso de desnaturalización inicial de 95°C durante 10 minutos para activar la ADN polimerasa *FastStart Taq*, seguido de 45 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15s, anillado a 60°C durante 30s y extensión a 72°C durante 30s. El proceso de amplificación fue seguido por un análisis de curva de fusión, que oscila entre 60°C y 90°C, con pasos de aumento de temperatura de 0,2°C cada 10s. Los ciclos de referencia y umbral ( $C_t$ ) se determinaron automáticamente utilizando el *software Rotor-Gene Q Series v1.7*.

### **3.7- Análisis estadístico de la expresión génica diferencial**

Para comparar la expresión génica entre dos muestras diferentes (muestra A y muestra B) se usó la ecuación propuesta por (Schmittgen y Livak, 2008):

$$2^{-\Delta C_T} = (C_{T \text{ gen de interés}} - C_{T \text{ gen control}})_{Est}$$

$$2^{-\Delta C_T} = (C_{T \text{ gen de interés}} - C_{T \text{ gen control}})_{PI}$$

Donde cada muestra está relacionada con el gen de control interno. La muestra A corresponde a la muestra proveniente de frutos que maduran en estantería, mientras que la muestra B corresponde a frutos que maduran en planta. Un Análisis de la variancia (ANOVA), con un  $p < 0,05$  fue utilizado para determinar la significancia de las diferencias en los niveles de expresión entre sitios de maduración tomando como repeticiones las réplicas biológicas.

### 3.8- Identificación de los genes polimórficos y su análisis estructural

Los genes polimórficos fueron validados por análisis de RT-qPCR, a los cuales a través de la bases de datos SGN (Sol Genomics Network, 2014) (Sol Genomics Network, <https://solgenomics.net>) y Phytozome (<http://www.phytozome.net/>) se les identificaron las siguientes características estructurales: número de cromosomas, la cadena, localización del gen y longitud, identificador (ID) del transcripto, región codificante del gen (CDS por sus siglas en inglés) y longitud de la proteína codificada por el gen.

### 3.9- Identificación de las regiones promotoras y análisis de los elementos *cis*-regulatorios

Con el empleo de la base de datos SGN, se recuperó para cada uno de los genes una secuencia de 3000 pb 5' corriente arriba. De la cual se obtuvo la secuencia genómica de 1500 pb correspondiente a la zona promotora, desde el sitio de inicio de la traducción (ATG). Se utilizaron las bases de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information internet database site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)), Phytozome (<http://www.phytozome.net/>), Gramene (<http://www.gramene.org>) y PLAZA 4.5 dicot platform (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/>) para identificar la zona 5'UTR de cada gen. Previamente se realizaron alineamientos múltiples con CLUSTAL W en BioEdit (Hall, 1999) de las secuencias promotoras de 1500 bp obtenidas en SGN, contra las obtenidas en estas bases de datos.

Para el análisis computacional, se predijeron los elementos *cis*-regulatorios putativos escaneando las secuencias promotoras de 1500 pb 5' corriente arriba a partir de los sitios de inicio de la traducción de los genes polimórficos obtenidos en

ambos ensayos en el paso anterior, utilizando un *software* bioinformático en línea gratuito y disponible para el análisis de promotores como PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>). Este software permite detectar la presencia de elementos reguladores que actúan en *cis* putativos idénticos o similares a los motivos registrados en ella y utiliza su propia base de datos (Lescot *et al.*, 2002). Se obtuvo una lista de todos los motivos en las secuencias promotoras, para los cuales se determinó: la secuencia, el organismo de origen (especie de las que provienen los motivos), la descripción de la función, la posición y la cadena.

#### 4.- Resultados

##### 4.1- Caracterización y comparación de los perfiles de ADNc-AFLP de expresión diferencial

A continuación se detallan los resultados obtenidos a partir del análisis de los perfiles de FDTs obtenidos por ADNc-AFLP. Los FDTs, observados como bandas, corresponden a tres replicas biológicas de frutos que tuvieron maduración en planta y en estantería (Perfiles obtenidos por Dr. Javier Pereira da Costa). La Figura 2 pertenece a uno de los geles de acrilamida al 5 % p/v, que han sido digitalizados, para el genotipo LA1385 y la combinación de cebadores A. La presencia o ausencia de bandas se analizó con el *software* GelPro Analyzer 1.0, que permitió la contabilización del número total de bandas y la determinación del número de bandas polimórficas, entre los dos sitios de maduración, para cada genotipo y combinación de cebadores.

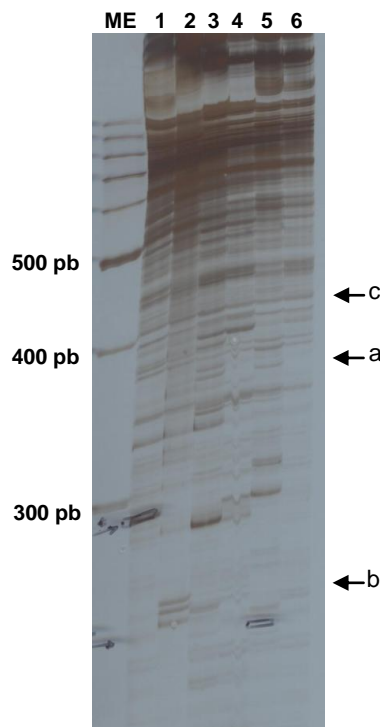


Fig. 2. Perfil de transcripción obtenido con la combinación de cebador A para LA1385 en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 5% p/v. **ME**: marcador estándar, pb: pares de bases. **1, 3 y 5**: tres repeticiones biológicas de frutos con maduración en planta; **2, 4 y 6**: tres repeticiones biológicas de frutos con maduración en estantería. **a**: Fragmentos derivados de transcritos (FDTs) presente en planta y ausente en estantería, **b**: FDTs ausente en planta y presente en estantería y **c**: FDTs monomórfico. Se consideró la presencia o ausencia cuando dos o más réplicas biológicas presentan o no FDTs, respectivamente.



## RESULTADOS

Considerando los cuatro genotipos (CAI, LA722, LA1385 y NOR) y las seis combinaciones de cebadores, se detectaron un total de 3179 FDTs, con un rango de tamaños entre 38 a 2978 pb. Los fragmentos de tamaños extremos de FDTs fueron observados en el genotipo LA1385, con las combinación de cebadores E y D, respectivamente. La mayor cantidad de FDTs fue detectada en el genotipo NOR con un total de 882 FDTs, mientras que en CAI se detectó la menor cantidad de FDTs con 694. En promedio, se observaron 132,4 FDTs por combinación de cebadores y genotipo, con un mínimo de 47 FDTs con la combinación D, en los genotipos CAI y LA722, un máximo de 252 con la combinación E, en el genotipo LA722 (Tabla 2).

En la Figura 3, se muestra el diagrama de Venn para cada genotipo indicando los FDTs obtenidos con las seis combinaciones de cebadores. El círculo rojo, representa a los FDTs exclusivos (polimórficos) para frutos que maduraron en planta, mientras que el círculo verde en estantería. Los números en la intersección del círculo indican los FDTs monomórficos entre ambas condiciones de maduración. En todos los casos las cantidad de FDTs monomórficos fue mayor a lo polimórficos. El número total de FDTs (2660) detectado en maduración en planta fue mayor que

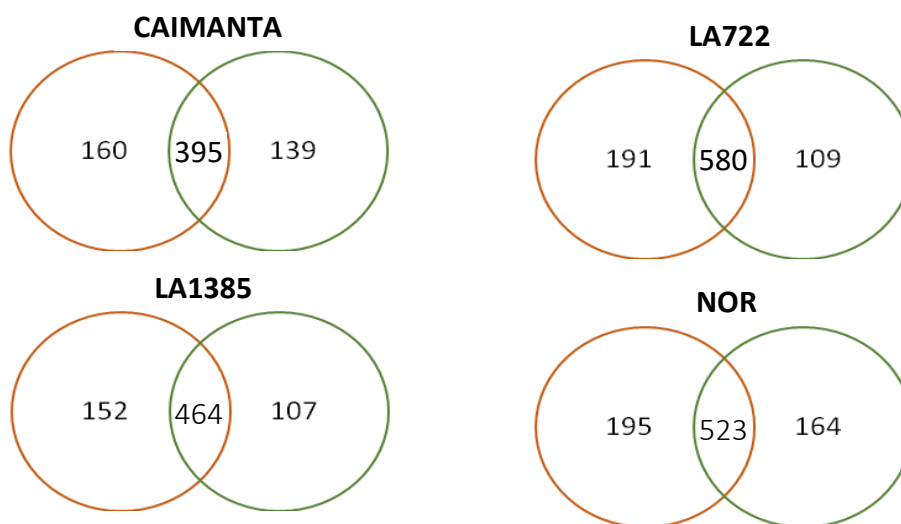


Fig. 3. Diagrama de Venn: Número de fragmentos derivados de transcritos (FDTs) obtenidos mediante el perfil de la transcripción basada en AFLP (ADNc-AFLP) con seis combinaciones de cebadores específicos para cada genotipo en estudio. Los círculos rojos indican el sitio de maduración en planta y el verde en estantería. Los números en las intersecciones de los círculos muestran los FDTs monomórficos entre los dos sitios de maduración, mientras que los FDTs exclusivos de cada sitio de maduración se indican fuera de las intersecciones de los mismos.

## RESULTADOS

en estantería (2481). Además, tanto en planta como en estantería, se observó que el genotipo Caimanta fue el que contuvo la menor cantidad de FDTs seguido por LA1385, NOR y por último LA722 con el mayor número de FDTs totales (Figura 3).

Tabla 2. Porcentaje de polimorfismo (% pol), número total (TT) de fragmentos derivados de transcritos (FDTs) y exclusivos de frutos con maduración en planta (PP) y en estantería (PE) para cada genotipo con las seis combinaciones de cebadores específicos.

G.	Combinación de cebador A				G.	Combinación de cebador B				G.	Combinación de cebador C			
	% pol	TT	PP	PE		% pol	TT	PP	PE		% pol	TT	PP	PE
<b>CAI</b>	43,9	157	25	44	<b>CAI</b>	60,0	115	40	29	<b>CAI</b>	44,2	120	24	29
<b>LA722</b>	34,7	118	27	14	<b>LA722</b>	37,5	88	17	6	<b>LA722</b>	40,3	139	42	14
<b>LA1385</b>	44,6	130	37	21	<b>LA1385</b>	41,0	83	25	9	<b>LA1385</b>	40,2	117	27	20
<b>NOR</b>	47,9	120	37	20	<b>NOR</b>	50,4	115	32	26	<b>NOR</b>	49,0	145	41	30
<b>Total</b>	42,8	525	126	99	<b>Total</b>	47,2	401	114	70	<b>Total</b>	43,4	521	134	93

G.	Combinación de cebador D				G.	Combinación de cebador E				G.	Combinación de cebador F			
	% pol	TT	PP	PE		% pol	TT	PP	PE		% pol	TT	PP	PE
<b>CAI</b>	46,8	47	17	5	<b>CAI</b>	41,2	136	34	22	<b>CAI</b>	25,2	119	20	10
<b>LA722</b>	59,6	47	17	11	<b>LA722</b>	27,0	252	41	27	<b>LA722</b>	35,6	236	47	37
<b>LA1385</b>	38,2	55	6	15	<b>LA1385</b>	30,1	186	35	21	<b>LA1385</b>	28,3	152	22	21
<b>NOR</b>	58,3	115	16	44	<b>NOR</b>	30,8	211	35	30	<b>NOR</b>	27,8	176	34	14
<b>Total</b>	50,7	264	56	75	<b>Total</b>	32,3	785	145	100	<b>Total</b>	29,2	683	123	82

Combinación de cebador A: Apo11-Mse37, Combinación de cebador B: Apo11-Mse38, Combinación de cebador C: Apo12-Mse37, Combinación de cebador D: Apo12-Mse38, Combinación de cebador E: Apo13-Mse37, Combinación de cebador F: Apo13-Mse38. G.: Genotipos CAI: cv Caimanta de *Solanum lycopersicum*, LA722: accesión LA722 de *S. pimpinellifolium*, LA1385: accesión LA1385 de *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* y NOR: mutante nor (804627) de *S. lycopersicum*

Entre los cuatro genotipos se contabilizaron 1217 FDTs exclusivos, lo que equivale a un 38,28% del total. De los cuales el mayor número (698 FDTs), pertenecieron a la maduración en planta, lo que representa un 57,35 %, variando entre 152 para LA1385 y 195 para NOR (Figura 3 y 4). Un menor número de FDTs exclusivos (519, 42,65%) se encontraron en frutos madurados en estantería con un rango de variación de 107 para LA1385 hasta 164 para NOR (Figura 3 y 4).

Asimismo, considerando las seis combinaciones de cebadores, hubo un 40,9% de polimorfismo promedio con un rango de variación de 29,2% (combinación F) a 50,7% (combinación D). El genotipo Caimanta mostró el porcentaje de polimorfismo más alto (60%) con la combinación B y más bajo (25,2%) con la combinación F (Tabla 2). Todas las combinaciones de cebadores evaluadas en los cuatro

genotipos, exceptuando a la combinación D, permitieron detectar un mayor número de FDTs polimórficos en frutos con maduración en planta, respecto a los que maduraron en estantería (Tabla 2).

El análisis de chi-cuadrado de independencia mostró que tanto la cantidad total como de FDTs exclusivos detectados en frutos que maduran en planta es independiente del genotipo. Por el contrario, tanto la cantidad total como el número de FDTs exclusivos observados en frutos que maduran en estantería es dependiente del genotipo (ver el valor del chi-cuadrado en la Figura 4).

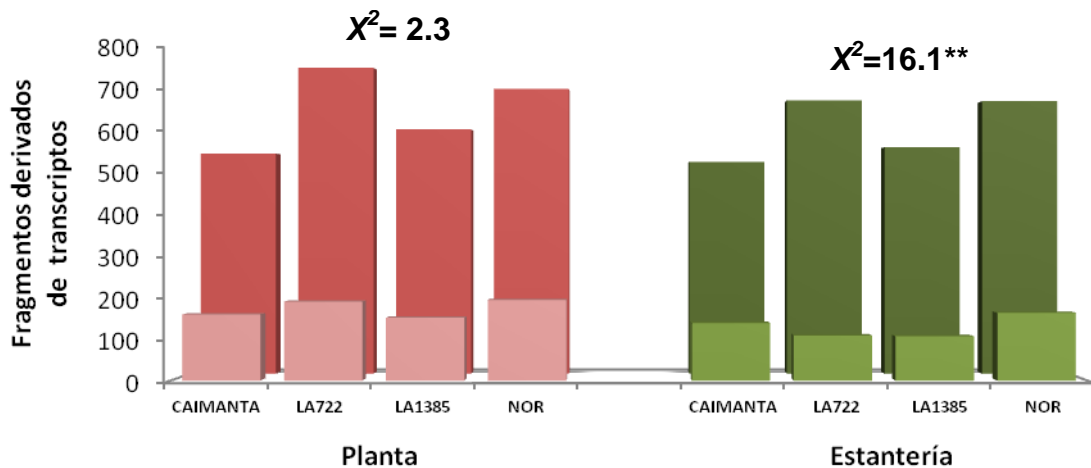


Fig. 4. Histograma que muestra el número de fragmentos derivados de transcritos (FDTs, fondo), y exclusivos (frente) para cada genotipo, correspondiente a los frutos que maduraron en planta (barras en tono rojo) o en estantería (barras en tonos verdes). \*\* $p < 0.01$ .

#### 4.2- Identificación de fragmentos derivados de genes con expresión diferencial

Se seleccionaron y eluyeron del gel de poliacrilamida 20 bandas bien definidas y distinguibles, con un claro patrón de polimorfismo entre frutos que maduraron en planta y estantería (labor realizado por Dr. Javier Pereira da Costa). Trece bandas, correspondieron al genotipo Caimanta, tres a LA1385 y NOR y una a LA722. Teniendo en cuenta la combinación de cebadores, la combinación A fue la más seleccionada con diez casos, seguido por las combinaciones C y E con tres, y por

último la combinaciones B y F con dos. No se obtuvo, ningún caso de la combinación D.

De las veinte secuencias seleccionadas, se identificaron diez genes (50%) con funciones putativas por homología entre las secuencias obtenidas en nuestro trabajo y las disponibles en las bases de datos.

La Tabla 3 describe las secuencias identificadas, para las cuales se indican el cromosoma al que pertenece, cadena en la que se encuentran, su posición y tamaño en pares de bases, como así también su función y la vía donde participa (UniProt (<https://www.uniprot.org>) en los casos en que fue posible identificarlas. Los FDTs con funciones conocidas fueron categorizados de acuerdo al rol que cumplen. Para maduración en planta se encontraron tres genes relacionados al estrés y dos a la estructura celular, mientras que en maduración en estantería, las funciones estuvieron asociadas una al metabolismo, una a transportadores, una a la estructura celular y dos a respuesta al estrés.

La longitud de los genes identificados en frutos con maduración en planta varió entre 2492 bp (Solyc06g064630.2) y 14730 bp (Solyc03g112910.2). En el caso de los genes identificados en frutos con maduración en estantería, la longitud varió entre 3034 bp (Solyc08g080940.2) y 5536 bp (Solyc12g044820.1). Los genes se ubicaron siete en la cadena positiva y tres en la negativa, repartidos en cinco de los doce cromosomas que posee *S. lycopersicum*. En los cromosoma 3 y 6 se ubicaron tres genes, dos genes se ubicaron en el cromosoma 11, mientras que se localizaron uno en los cromosomas 8 y 12.

CAI.EST.A.6 y CAI.PL.B.2, son dos genes polimórficos pertenecientes al genotipo Caimanta, el primero se encontró cuando el fruto maduró en estantería y el segundo cuando lo hizo en planta, y se identificaron como el mismo gen, Solyc11g020040.1 (Tabla 3).

Por otro lado, el fragmento secuenciado CAI.PL.E.1, permitió identificar dos genes (Solyc03g115230 y Solyc06g082560), los cuales son parálogos (Gramene, Plaza 4.5). Ambos genes poseen la misma función de Proteína Chaperona ClpB/ ATPsa.

## RESULTADOS

Tabla 3. Características de los genes identificados a partir de las bandas secuenciadas de tomate.

Código	Identificador / Gen	Cr.	C.	Localización Gen / Longitud (pb)	Función	
CAI.EST.A.1	<b>Sin homología</b>					
CAI.EST.A.2	<b>Solyc03g083910.2</b>	3	-	53851092..5855368 / 4277	Ácido $\beta$ -fructofuranosidasa. Participa en la vía del metabolismo de la sacarosa, que forma parte de la biosíntesis de glicanos.	M
CAI.EST.A.3	<b>Sin homología</b>					
CAI.EST.A.4	<b>Sin homología</b>					
CAI.EST.A.5	<b>Solyc12g044820.1</b>	12	+	37714905-37720440/ 5536	Transportador ABC miembro de la familia C 8. Actividad transportadora transmembrana acoplada a ATPasa	T
CAI.EST.A.6	<b>Solyc11g020040.1</b>	11	+	10015582..10019521 / 3940	Proteína de choque térmico 70 (HSP70). Unión a proteínas desplegadas.	S
CAI.EST.A.7	<b>Solyc08g080940.2</b>	8	+	64084698..64087731 / 3034	Glutación peroxidasa 1 (GPx). Protege las células y las enzimas del daño oxidativo, al catalizar la reducción de peróxido de hidrógeno, peróxidos de lípidos e hidroperóxido orgánico, por el glutatión.	S
CAI.EST.B.1	<b>Solyc06g076940.2</b>	6	+	47818952..47822936 / 3985	Proteínas con dominio NudC. Unión a proteínas desplegadas.	EC
CAI.PL.B.2	<b>Solyc11g020040.2</b>	11	+	10015582..10019521 / 3940	Proteína de choque térmico (HSP70). Unión a proteínas desplegadas.	S
CAI.PL.C.1	<b>Sin homología</b>					
CAI.PL.C.2	<b>Sin homología</b>					
CAI.PL.E.1	<b>Solyc03g115230.2</b>	3	-	65011966..65016121 / 4156	Proteína Chaperona ClpB/ ATPsa. Unión de ATP. ATPasa asociada con diversas actividades celulares.	S
CAI.PL.E.1	<b>Solyc06g082560.1</b>	6	+	48340001..48342565 / 2565	Proteína Chaperona ClpB/ ATPsa. Unión de ATP. ATPasa asociada con diversas actividades celulares.	S
CAI.PL.F.1	<b>Solyc03g112910.2</b>	3	+	63189344..63204073 / 14730	Pantotenato kinasa. Cataliza la fosforilación del pantotenato, el primer paso en la biosíntesis de CoA. Puede desempeñar un papel en la regulación fisiológica de la concentración de CoA intracelular.	EC
PIM.PL.E.1	<b>Sin homología</b>					
CE.EST.C.1	<b>Sin homología</b>					
CE.PL.A.1	<b>Sin homología</b>					
CE.PL.A.2	<b>Sin homología</b>					
NOR.EST.F.1	<b>Sin homología</b>					
NOR.PL.A.1	<b>Solyc06g064630.2</b>	6	-	40270353..40272844 / 2492	Proteína ribosomal L15	EC
NOR.PL.E.1	<b>Sin homología</b>					

CAI: cv Caimanta de *Solanum lycopersicum*, LA722: accesión LA722 de *S. pimpinellifolium*, LA1385: accesión LA1385 de *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* y NOR: mutante nor (804627) de *S. lycopersicum*, EST: maduración en estantería, PL: maduración en planta. Cr: Número de Cromosoma. C: Cadena; M: función relacionada al metabolismo; T: función relacionada al transporte; S: función relacionada al estrés; EC: función relacionada a la estructura celular.

### 4.3- Validación por RT-qPCR de los genes con expresión diferencial

Para validar la expresión diferencial de genes detectadas por ADNc-AFLP, se llevó a cabo un análisis de RT-qPCR, utilizando los cebadores desarrollados específicamente para cada gen. Se utilizaron 8 genes de los 10 identificados, entre los cuales se encuentran los dos genes parálogos (Tabla 3 y 4). Los dos genes restantes no fueron validados por RT-qPCR dado que al momento de la validación, no fueron identificados a través de BLAST. El listado de genes indicados en la Tabla 3 surge del re-análisis hecho al momento de la escritura de este manuscrito.

Tabla 4. Cebadores específicos diseñados con *Primer3* de sobre la secuencia de los genes identificados por comparación de secuencias con las bases de datos. Resultado de la PCR *in silico*, que verifica la especificidad de los cebadores.

Identificador / Gen	Cebador 1	Cebador 2	PCR in silico
Solyc03g083910.2	TACCTGTGTTGGACGGTGAA	TCGTGCTGCTCCATTTACTG	Solyc03g083910.2
Solyc12g044820.1	TTTCGCCTGGTAGAGCCTTA	GTTCTGAACACTCCCCTTGAA	Solyc12g044820.1
Solyc11g020040.1	TACAAGGGCCAAGTTTGAGG	GAACAGCCGGTATTCGTGTT	Solyc11g020040.1
Solyc08g080940.2	ACCAGTTTGGTGGACAGGAG	AAGAACCACCTTTGCTTGA	Solyc08g080940.2
Solyc06g076940.2	CCCAGTGAAGACCGATTGTT	GGAACCTTTGAAGCATGAGC	Solyc06g076940.2
Solyc03g115230.2 / Solyc06g082560.1	ATACGGTGCCATCCAAGAAG CTAGGCTTGGGCAGAATGAG	CATTCTGGCCAAGCCTAGAG AGTTGGTTGTTGTGGC≤CTTC	Solyc03g115230.2 Solyc06g082560.1
Solyc03g112910.2	TAGGAGCAAGGTAGGCAGGA	GAATTGAACTCCCAGGCAAA	Solyc03g112910.2
Solyc06g064630.2	GAGGAAGAAGCAGTCGGATG	TGCCTTGTGACAGGACGTGTAG	Solyc06g064630.2

Sobre un total de siete genes evaluados por RT-qPCR para su validación, tres mostraron expresión diferencial significativa (Tabla 5) y cuatro no significativa (experimento realizado por Dr. Javier Pereira da Costa). Entre los tres con expresión diferencial, Solyc03g112910.2 presentó mayor nivel de expresión en estantería que en planta, de forma contraria a lo observado por ADNc-AFLP. En consecuencia, para los subsiguientes análisis se realizaron sobre los genes cuya expresión diferencial fue significativa y coincidente con lo observado por ADNc-AFLP (Solyc08g080940.2, Solyc03g115230.2 y Solyc06g082560.1) o los que presentaron

## RESULTADOS

un *p-value* cercano al nivel de significación 0,05 (Solyc03g083910.2 y Solyc11g020040.1) (Figura 5).

Tabla 5. RT-qPCR para cada uno de los genes con expresión diferencial entre frutos con maduración en planta y estantería. Expresión relativa al gen de referencia SAND.

Identificador / Gen	ER en PL	E.E.	ER en EST	E.E.	<i>p-value</i>
<b>Solyc03g083910.2</b>	2,07	0,37	5,13	1,48	0,0644
Solyc12g044820.1	3,26	1,40	8,28	2,67	0,1272
<b>Solyc11g020040.1</b>	4,07	0,71	13,89	4,34	0,0830
<b>Solyc08g080940.2</b>	1,51	0,17	2,67	0,22	<b>0,0013</b>
Solyc06g076940.2	-	-	-	-	-
Solyc11g020040.2	-	-	-	-	-
<b>Solyc03g115230.2 / Solyc06g082560.1</b>	11,72	2,05	1,51	0,20	<b>0,0006</b>
Solyc03g112910.2	1,75	0,28	3,42	0,50	<b>0,0160</b>
Solyc06g064630.2	1,23	0,06	1,45	0,16	0,2381

ER:expresión relativa. E.E: error estándar, PL: maduración en planta. EST: maduración en estantería. En negrita, el *p-value* significativo como los genes seleccionados para los subsiguientes análisis.

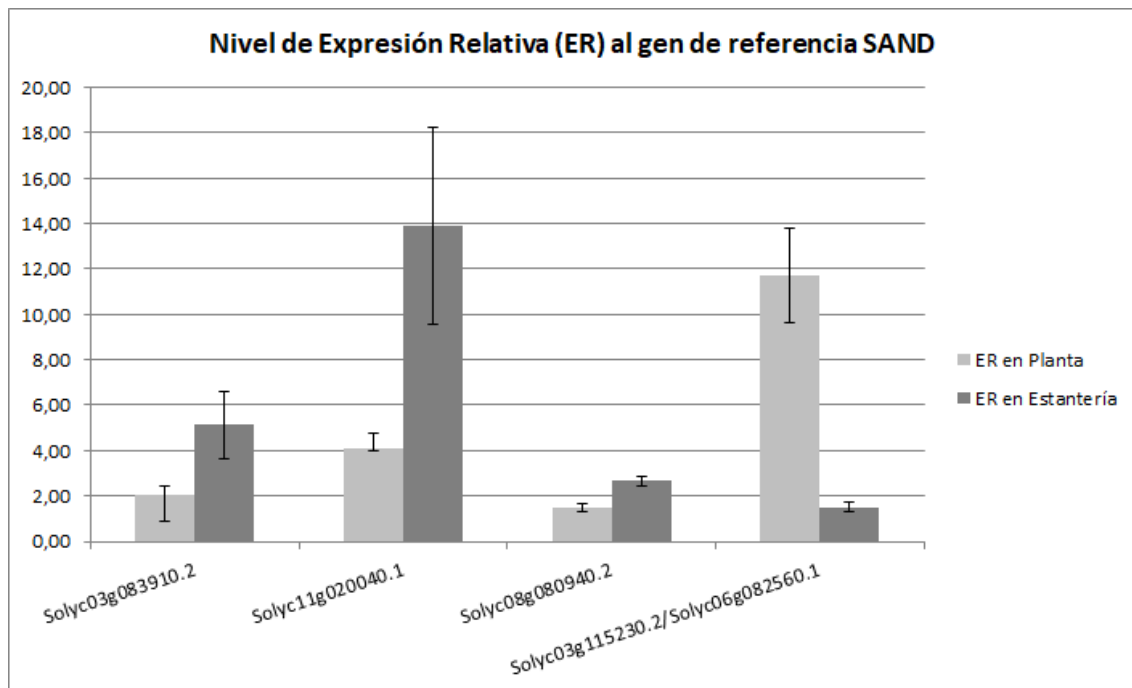


Fig. 5. Validación por RT-qPCR de los genes con expresión diferencial entre frutos con maduración en planta y estantería. Expresión relativa al gen de referencia SAND. ER: expresión relativa.

#### 4.4- Análisis estructural de los genes polimórficos

A los cinco genes con expresión diferencial según el fruto madura en estantería o planta, validados por el análisis de RT-qPCR (Tabla 5), se les sumaron nuevas características a las ya descritas en la Tabla 3, las cuales fueron recuperadas de las bases de datos Sol Genomics Network o de la base de datos Phytozome (<http://www.phytozome.net/>). Tales características son, el ID del Transcripto y longitud, localización del 5'UTR, el número de exones, longitud de la región codificante (CDS por su siglas en inglés) y tamaño de la proteína que codifican (Tabla 6). El número de exones de los genes identificados en estantería variaron entre 6 (Solyc08g080940) y 8 (Solyc11g020040). En el caso de los genes identificados en planta, el número de exones fue 1 (Solyc06g082560) y 7 (Solyc03g115230).

Tabla 6. Características de los genes con expresión diferencial validados por RT-qPCR, identificados en el cv Caimanta de *Solanaum lycopersicum*.

Tratamiento	ID Transcripto / longitud (pb)	5'UTR antes de ATG <sup>a</sup>	N° de Exones	Region CDS <sup>b</sup>	Long. de CDS (pb)	Long. Proteína (aa)
Estantería	Solyc03g083910.2.1 / 2299	1-82	7	83-4011	1947	649
	Solyc11g020040.1.1 / 2079	1-317	8	318-4258	2079	693
	Solyc08g080940.2.1 / 1022	1-36	6	37-1059	720	240
Planta	Solyc03g115230.2.1 / 3194	1-24 / 527-633*	7	701-3831	2736	912
	Solyc06g082560.1.1 / 2565	-	1	-	2565	855

<sup>a</sup>Esto indica la posición del sitio de inicio de la transcripción (SIT).

<sup>b</sup>Esto indica la posición del sitio de inicio de la traducción (ATG).

\*Intron en la zona 5'UTR.

ID: Identificador. CDS: región codificante de un gen. pb: pares de bases. aa: número de aminoácidos.

#### 4.5- Identificación de las regiones promotoras y análisis de los elementos *cis*-regulatorios

Para cada gen, se pudieron obtener de SGN, 3000 pb 5' corriente arriba, de las cuales se recuperaron todas las secuencias genómicas de 1500 pb correspondiente a la zona promotora, desde el sitio de inicio de la traducción (como se indica por el inicio de la región codificante, CDS en la Tabla 6). El empleo de otras bases de datos (NCBI, Phytozome, Gramene y PLAZA 4.5), permitió comprobar que las secuencias de 3000 bp corriente arriba encontradas no siempre incluyeron la zona



## RESULTADOS

5'UTR (Tabla 7), sino que estas se encontraban como parte de la secuencia genómica obtenida. Los alineamientos múltiples, realizados con CLUSTAL W en BioEdit (BioEdit *Sequence Alignment Editor software*) de las secuencias promotoras de 1500 bp obtenidas en SGN, para cada uno de los genes, contra las obtenidas de las otras bases de datos, dieron un 100% de alineamiento. Estas bases de datos permitieron además reconocer, la longitud y ubicación de los 5'UTR, el cual se consideró como el comienzo del SIT. En solo un caso, para el gen Solyc06g082560, no fue posible identificar su correspondiente 5'UTR. De los cuatro genes restantes, dos fueron reconocidos en la base de datos Phytozome (<http://www.phytozome.net/>) y el resto de las bases de datos Gramene (<http://www.gramene.org>) y/o PLAZA 4.5 dicot platform (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/>) (Tabla 7). Los 5'UTR fueron de longitud variable y en el caso de Solyc03g115230 (Tabla 6) contenía un intrón.

Tabla 7. Inclusión de la región 5'UTR en los 3000 bp corriente arriba, obtenidos de Sol Genomic Network y su identificación en otras bases de datos.

Tratamiento	Identificador Solyc	SGN 3000bp aguas arriba	Base de Datos para identificar el 5'UTR
Estertería	Solyc03g083910	Sin 5'UTR	Plaza 4.5
	Solyc11g020040	Con 5'UTR	Gramene
	Solyc08g080940	Sin 5'UTR	Phytozome
Planta	Solyc03g115230	Sin 5'UTR	Phytozome
	Solyc06g082560	Con 5'UTR	-

El programa PlantCare (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) permitió predecir la presencia de varios elementos *cis*-regulatorios conocidos en genes vegetales, que podrían estar involucrados en la regulación de la transcripción, controlando la expresión de los genes polimórficos identificados en la maduración en

estantería o planta en tomate (*S. lycopersicum*). Los nombres de los elementos *cis*-regulatorios identificados y sus funciones predichas se presentan en la Tabla 9 del

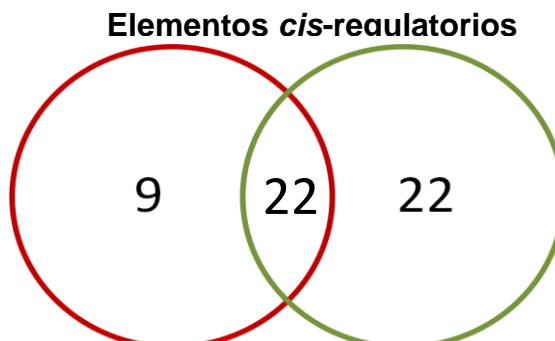


Fig. 6. Diagrama de Venn: Los círculos rojos indican los tipos de elementos *cis*-regulatorios encontrados en genes que se expresan durante la maduración en Planta y el verde en Estantería. El número en la intersección del círculo muestra los tipos elementos *cis*-regulatorios compartidos por ambos grupos. Los tipos de elementos *cis*-regulatorios exclusivos de cada sitio de maduración se indican fuera de la intersección del mismo.

Anexo. El análisis reveló en cuanto a los tipos, un total de 54 elementos *cis*-regulatorios diferentes, de los cuales 44 se encuentran presentes en estantería, mientras que 31 elementos *cis*-regulatorios se identificaron en planta. Veintidós (50%) de los 44 elementos encontrados en estantería, fueron exclusivos, es decir no se encontraron en planta, mientras que 9 (29%) de los 31 fueron exclusivos de la maduración en planta. Por lo tanto, 22 (40,7%) elementos *cis*-regulatorios fueron compartidos por ambos grupos (Figura 6).

Los elementos *cis*-regulatorios se encontraron representados una sola vez o repetidos en distintas posiciones, en la cadena directa o inversa, dependiendo del sitio de maduración. Teniendo en cuenta esto, se contabilizaron 109 elementos *cis*-regulatorios en total en los genes identificados en estantería, de los cuales 65 (59,6%) se ubicaron en la cadena directa y 44 (40,3%) en la inversa. Por ejemplo, en el gen Solyc03g083910 identificado en frutos con maduración en estantería se encontró la menor cantidad de motivos (25 en total), mientras que en Solyc08g080940 la identificación fue mayor (45 en total, Figura 7). En el caso de los genes identificados en frutos con planta, se contaron 80 elementos *cis*-regulatorios

## RESULTADOS

en total, 43 (53,7%) en la cadena directa y 37 (46,2%) en la inversa. Los motivos se repartieron cantidades similares entre ambos genes identificados (Figura 7). La frecuencia de cada uno de los elementos *cis*-regulatorios en cada uno de los genes y su función asociada se resumen en las Figura 10.

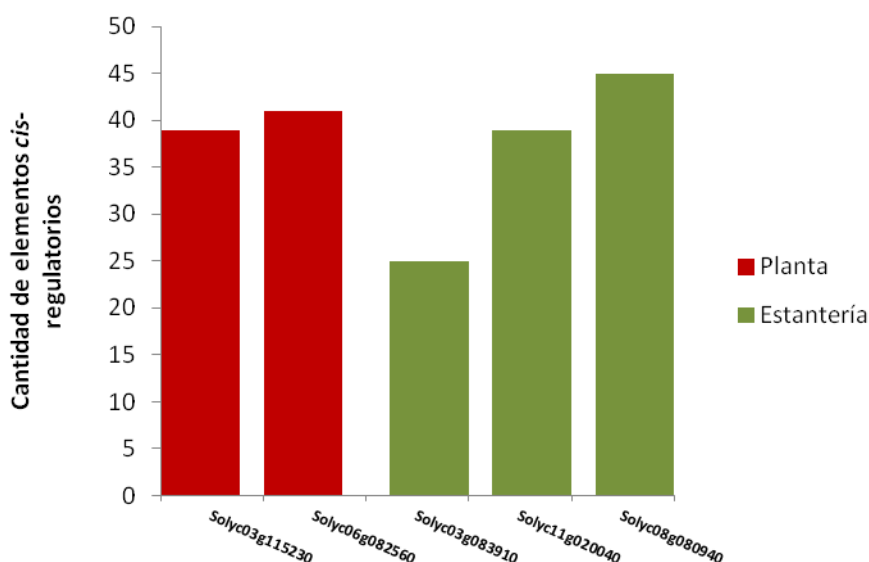


Fig. 7. Histograma que muestra las cantidades de elementos *cis*-regulatorios en cada uno de los genes polimórficos de Planta.y Estantería.

A partir de la división de los 1500 pb de la región promotora en tres subregiones de 500 pb corriente arriba desde el codón de inicio, se encontró que en estantería los elementos *cis*-regulatorios se ubicaron en mayor proporción (43,1%) entre -501 a +1 pb, seguido por un 28,4% entre -1500 a -1000 y 28,5% entre -1000 a -501 pb. En los genes identificados en frutos con maduración en planta el mayor porcentaje de elementos *cis*-regulatorios (48,8%) se ubicaron entre -1500 a -1000 pb y el 22,5% entre -501 a +1 pb (Figura 8).

La longitud de los elementos *cis*-regulatorios varió de 4-12 pb para frutos madurados en estantería y 5-12 pb en planta (Figura 9). Los elementos *cis*-regulatorios de 6 pares de bases de longitud fueron los más abundantes con un 40,4% en estantería y 43,8% en planta, seguidos por 5 pb (18,3%) en estantería y 8 pb (22,5%) en planta.

## RESULTADOS

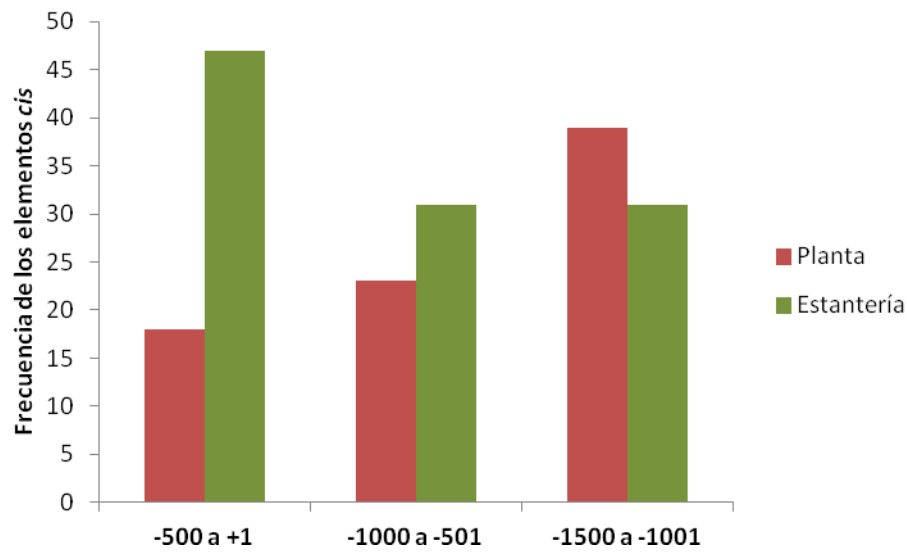


Fig. 8. Distribución de los elementos *cis*-regulatorios cada 500 bp en la región promotora a partir del codón ATG, de los genes polimórficos detectados en frutos con maduración en estantería y planta.

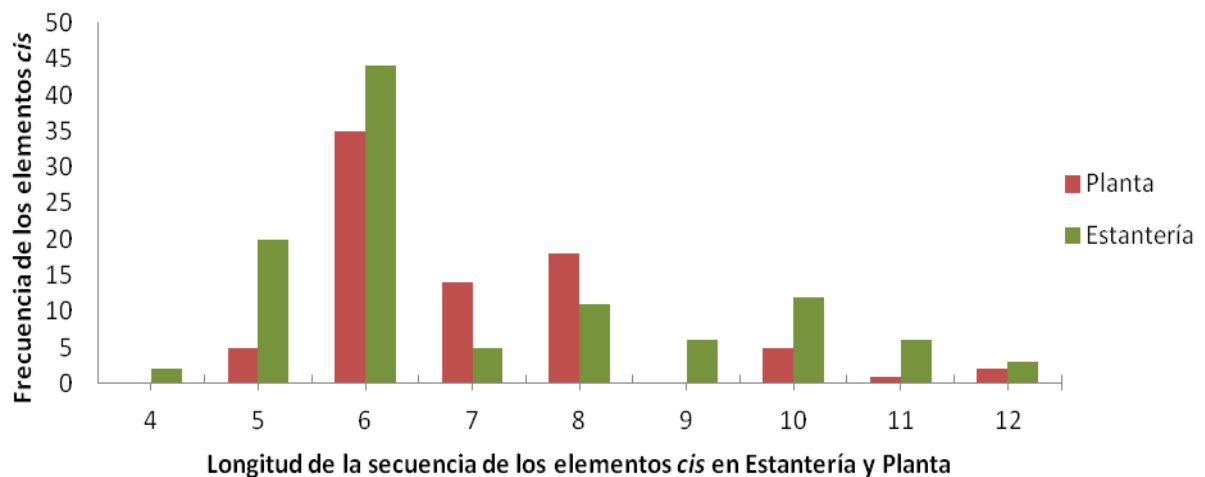


Fig. 9. Histograma que muestra las frecuencias de diferentes longitudes de secuencias de elementos *cis* en genes polimórficos entre frutos madurados en estantería y planta.

Del total de TATA-box y CAAT-box predichos, se eligieron los más cercanos al SIT, de tal forma que para los TATA-box de los genes expresados en frutos madurados en estantería, la distancia fue 25 pb (Solyc03g083910), 84 pb (Solyc11g020040) y 107 pb (Solyc08g080940). En el caso los genes expresados en frutos madurados en

planta, en Solyc03g115230, no se encontró un TATA-box cercano al SIT (TATA-less). Para Solyc06g082560, donde no se pudo predecir la zona 5'UTR, se identificó un TATA-box a una distancia de 251 bp con respecto a la inicio de la traducción. Los CAAT-box, estuvieron a 123 pb, 118 pb y 146 bp para Solyc03g083910, Solyc11g020040 y Solyc08g080940 del SIT, respectivamente. Mientras que en el caso de los genes detectados en frutos con maduración en planta, los CAAT-box se ubicaron a 177 bp del SIT para Solyc03g115230, y a 376 bp del ATG para Solyc06g082560.

Los elementos *cis*-regulatorios en los genes con expresión diferencial en en frutos de estantería y planta, se pueden agrupar en diferentes categorías funcionales como son, el desarrollo de la planta, la regulación hormonal y la respuesta al estrés, más los correspondientes al Promotor central y los de función desconocida (Tabla 8 y Figura 10).

Tanto en los genes con expresión diferencial detectados en frutos madurados en estantería como en planta se encontró que los elementos *cis* sensibles al estrés fueron los más abundantes con 47 y 48%, respectivamente (Figura 11 y 12). De ellos, lo más representados fueron los elementos que responden a la luz, que constituyeron un 22% y 18%, en donde los elementos *cis*-regulatorios con mayor presencia fueron Box 4 y G-Box. Seguidos por Respuesta a sequía con un 14 y 15% para genes detectados en frutos con maduración en estantería (MYB, MYC y Myb) y planta respectivamente. Dentro de esta categoría se encontró también, diferencia en Respuesta a la herida y defensa con un 5% y 1% en estantería y planta, respectivamente; y en Respuesta anaeróbica con un 5% y 10%, respectivamente. La Regulación hormonal resultó ser la segunda categoría funcional más representada con 21% en ambos sitios de maduración. En frutos madurados en estantería, se encontraron en mayor presencia los elementos *cis*-regulatorios relacionados a las funciones Respuesta al jasmonato de metilo (9%) y ABA sensible (8%). Cabe destacar que elementos *cis* relacionados con Respuesta al jasmonato de metilo, se encontró solo representado en dos (Solyc11g020040 y Solyc08g080940) de los tres genes analizados por los elementos *cis*-regulatorios CGTCA-motif y TGACG-motif y en ningún gen de los expresados en frutos que maduraron en planta. Mientras que ABA sensible solo se encontró en un gen expresado en frutos madurados en

## RESULTADOS

estantería (Solyc08g080940), representado por ABRE, ABRE3a y ABRE4 y en un gen expresado en frutos con maduración en planta (Solyc03g115230, elemento *cis* ABRE). El análisis de los elementos *cis*-regulatorios realizados en genes con expresión diferencial en frutos madurados mostró dos funciones relacionadas a la Regulación hormonal y Respuesta a etileno (12%), cuyos elementos *cis*-regulatorios fueron ERE y Respuesta a giberelina (6%) con P-box y TATC-box. Ambas funciones distribuidas en forma desigual en ambos genes identificados. Los elementos regulatorios menos representados fueron los motivos relacionados al Desarrollo de la planta con un 2 % y 3% en los genes identificados en frutos con maduración en estantería y planta, respectivamente.

Tabla 8. Categorías funcionales a las que corresponden los elementos *cis*-regulatorios en los genes con expresión diferencial detectados en frutos con maduración en planta y estantería.

Categorías funcionales	Función de motivo	Nombre del motivo
Promotor central / elemento potenciador		AT-TATA-box, CAAT-box, TATA, TATA-box
Desarrollo de la planta	Específico de meristema	CAT-box, CCGTCC-box,
	Expresión del endospermo	GCN4_motif
	Respuesta del ciclo celular y la proliferación celular	circadian
	Expresión en semilla	RY-element
Regulación hormonal	Responde a la giberelina	CARE, P-box, TATC-box
	Responde al jasmonato de metilo	CGTCA-motif, TGACG-motif
	Responde al ácido salicílico	TCA-element
	Responde al etileno	ERE
	ABA sensible	ABRE, ABRE3a; ABRE4
Respuesta al estrés	Respuesta a la luz	AAAC-motif, ACA-motif, ACE, AT-rich element, ATC-motif, ATCT-motif, Box 4, G-box, GA-motif, GATA-motif, GT1-motif, Gap-box, I-box, MRE, TCCC-motif, TCT-motif, chs-CMA1a, chs-CMA2a
	Respuesta a la sequía	ACTCATCCT sequence, MYB, MYC, Myb, Myb-binding site
	Baja Temperatura	LTR
	Alta Temperatura	STRE
	Respuesta a la herida y defensa	TC-rich repeats, W box, WUN-motif
	Respuesta anaeróbica	ARE
Desconocido		AAGAA-motif, AP-1, Myc, Unnamed__1, Unnamed__6

## RESULTADOS

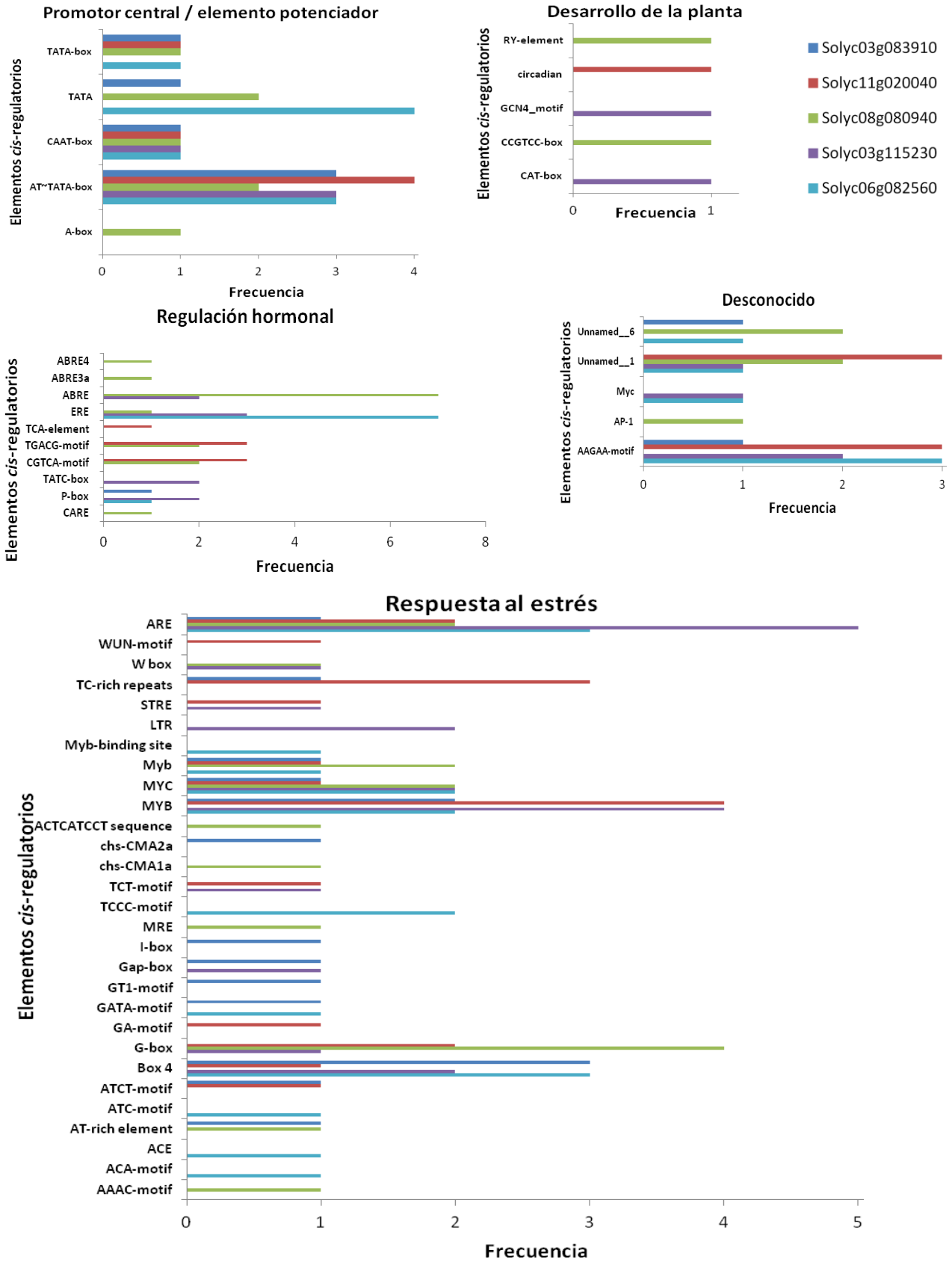


Fig. 10. Frecuencias de elementos *cis*-regulatorios identificados en cada uno de los genes con expresión diferencial analizados, ordenados según la Categoría funcional (Tabla 4) a la que pertenecen.

## RESULTADOS

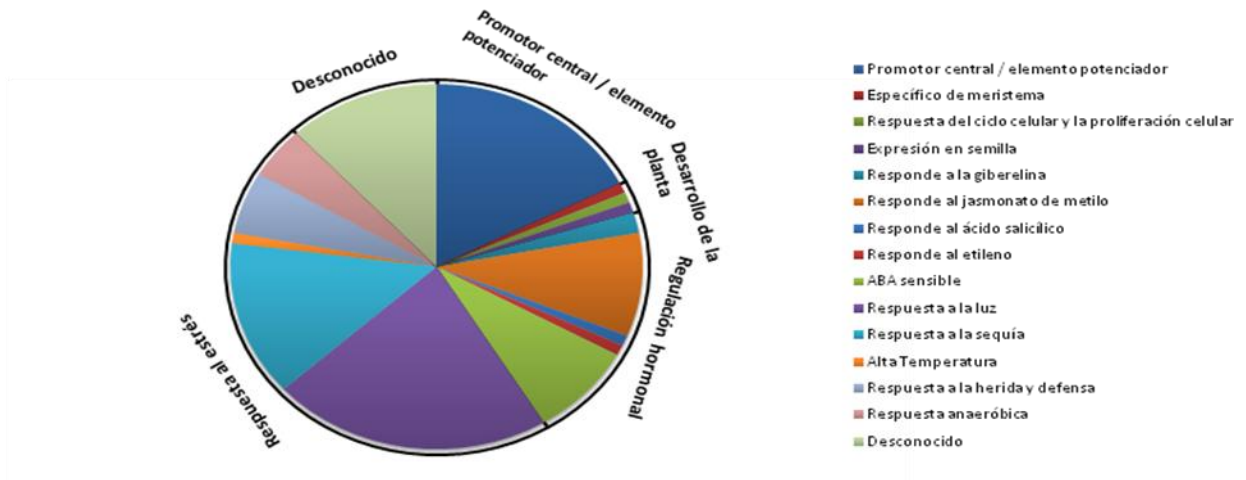


Fig. 11. Distribución de los motivos identificados en los genes con expresión en frutos con maduración en estantería según sus funciones biológicas.

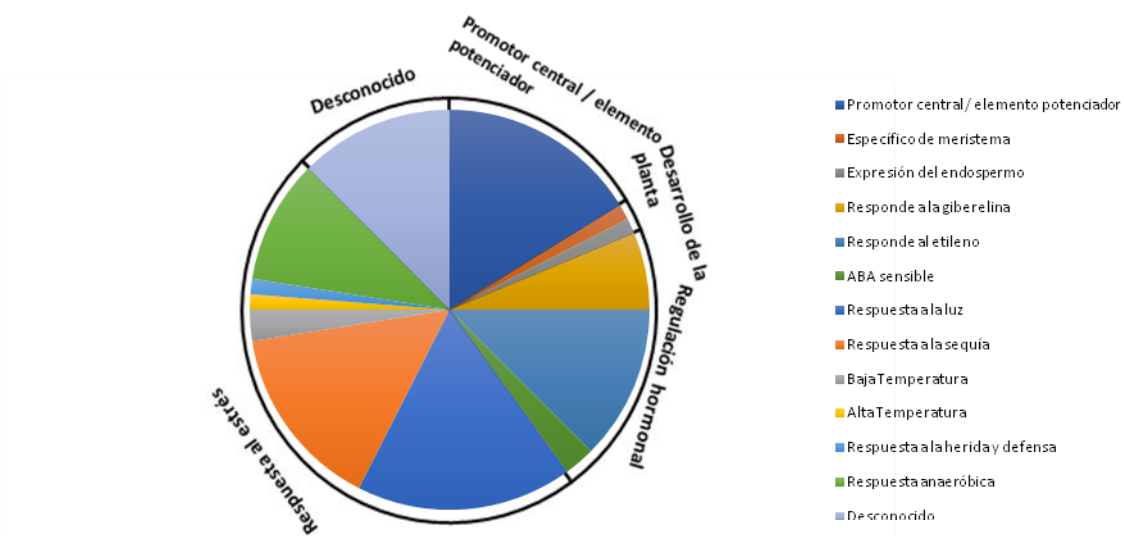


Fig. 12. Distribución de los motivos identificados en los genes con expresión en frutos con maduración en planta según sus funciones biológicas.



## 5.- Discusión

### 5.1- Caracterización y comparación de los perfiles de ADNc-AFLP de expresión diferencial

En este trabajo se emplearon para el método de ADNc-AFLP, seis combinaciones de cebadores (Tabla 1), que incluyeron las cuatro empleadas en un trabajo previo en tomate con los mismos genotipos por Pereira da Costa *et al.* (2018). Los resultados expuestos aquí concuerdan con los encontrados en aquel trabajo, y con la simulación *in silico* para la estimación de FDTs por combinación de cebadores realizada por (Stölting *et al.*, 2009). Además, estos resultados demuestran que el par de enzimas de restricción (*ApoI* y *MseI*) utilizadas fue útil para generar el perfil de expresión de cada genotipo en cada sitio de maduración del fruto. Por lo tanto, podemos asumir que cada FDT corresponde a solo un transcripto derivado de un gen. Se ha observado un incremento de 4,5 veces de los FDTs (3179 totales), como del valor de la media en comparación con Pereira da Costa *et al.*, 2018 quienes detectaron 707 FDTs. Esto podría ser explicado, porque en el presente trabajo se ha empleado un mayor número de combinaciones de cebadores.

Cabe destacar que en ambos sitios de maduración (planta y estantería), el genotipo perteneciente a *S. lycopersicum* con maduración normal, Caimanta, fue el que presentó el menor número de FDTs totales (Figura 3), mientras que el genotipo NOR (homocigota para el gen *nor*, *non ripening*), también de *S. lycopersicum*, con maduración alterada del fruto fue el que presentó la mayor cantidad. Esto podría explicarse teniendo en cuenta que Caimanta a los cinco días, cuando ha finalizado el análisis, se encontraría en la fase de ablandamiento del fruto, en el estado rojo maduro, el cual sería considerado el fin del ciclo de madurez, que ha sido estimado por Pereira da Costa *et al.* (2018) entre los 5,26 y 7,96 días. En este estado se considera que hay una merma de los procesos metabólicos y por lo tanto una disminución a nivel transcriptómico. Por el contrario, el genotipo NOR y los genotipos LA722 y LA1385, que portan genes que prolongan la vida útil de la fruta (Pratta *et al.*, 1996; Zorzoli *et al.*, 1998), la cual es de aproximadamente 21 días para NOR y de alrededor de 15 días para LA0722 y 17 días para LA1385 (Pereira da Costa *et al.*, 2018), estarían todavía metabólicamente más activos en el momento de la

extracción de RNA, lo cual explicaría que presenten la mayor cantidad de FDTs totales.

En maduración en planta, se contabilizaron más FDTs totales que en estantería en todos los genotipos (Figura 3). Luego de finalizar con las fases de división celular y expansión celular, los frutos en el estado rompiente comienzan con múltiples procesos fisiológicos y metabólicos típicos de los frutos climatéricos que acompañan a las alteraciones generalizadas en la expresión génica durante la maduración (Wang *et al.*, 2020). Se sabe que el etileno juega un papel clave en este proceso (Borghesi *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2015; Osorio *et al.*, 2013; Seymour *et al.*, 2013; Shinozaki *et al.*, 2018). La producción de etileno se inicia al inicio de la maduración y los frutos maduros tienen la capacidad de sintetizar su propio etileno y de responder al etileno externo iniciando la maduración (Karlova *et al.*, 2014). Se ha observado un aumento de etileno en tomates verdes maduros, lo que resulta en un eventual aumento de 100 a 300 veces en la concentración de este durante la maduración del fruto (Karlova *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2019). Por otra parte se ha visto que durante la maduración de los frutos de tomate la concentración promedio de etileno es inusualmente alta en los frutos adheridos a la planta (5.4 ppm; en promedio con un rango de 2 a 13 ppm dependiendo de los cultivares y las condiciones estacionales). Por el contrario, en comparación con los frutos de tomate separados de la misma, los valores de etileno cayeron a un nivel más bajo (1,4 ppm en promedio) (Sawamura *et al.*, 1978). Entonces, la disminución de FDTs totales en estantería (Figura 4), podría deberse a la disminución de esta hormona vegetal gaseosa.

En cuanto a los FDTs exclusivos del sitio de maduración (planta y estantería), se observaron diferentes patrones de expresión génica. Además, como lo demuestran los resultados presentados en la Figura 4, según el sitio donde el fruto madura, la cantidad total de genes, como así también los genes específicos que se activan o reprimen, dependen del genotipo, en particular cuando el fruto madura en estantería. Por el contrario, durante la maduración del fruto en la planta, la cantidad total y específica de genes es independiente del genotipo, indicando que dicho proceso parece ser similar entre ellos. Hubo mayor cantidad 698 FDTs polimórficos con un casi 60% (Figura 3) de los mismos en los frutos que maduraron en planta, contra un

42,6% (519 FDTs) en estantería. Este resultado estaría de acuerdo con lo observado por Pereira da Costa *et al.* (2018), en donde para todos los genotipos la transición de los estadios rompiente a rojo maduro, mostraron mayor polimorfismo que la transición entre las etapas previas, verde maduro y rompiente en frutos con maduración en planta. Como se ha discutido anteriormente, la separación del fruto de la planta, aparte de la disminución de etileno, que es el principal activador de la maduración, es probable que a consecuencia de la interrupción de la conexión entre ambos (planta y fruto), provoque una disminución en la expresión de algunos otros genes participantes de otras vías metabólicas. Los genotipos LA0722 y LA1385 cuando maduran en planta, no muestran cambios tan drásticos en la expresión génica entre los últimos estados de maduración (Pereira da Costa *et al.*, 2018). Sin embargo, aquí se ha observado entre los cuatro genotipos, que LA0722 y LA1385 presentaron la mayor diferencia entre los genes polimórficos observados en planta contra los encontrados en estantería (Figura 4). Por otro lado el genotipo NOR, con maduración alterada que porta el gen *nor*, resultó tener la mayor cantidad de FDTs de todos los genotipos analizados, y además mostró una diferencia de FDTs polimórficos entre ambos sitios de maduración similar al genotipo Caimanta. Este resultado, *a priori* no sería el esperado, ya que el hecho de que el mutante NOR bloquea el proceso de maduración normal. Dado que *nor* codifica un factor de transcripción, se espera que se detenga la expresión de genes en etapas tempranas durante la maduración del fruto (Liu *et al.*, 2015). Esta mayor cantidad de FDTs polimórficos estaría mostrando, que en el genotipo NOR, estarían involucrados otros genes activos que escapan a la modulación del factor de transcripción codificado por el gen *nor*. Después de todo, los procesos biológicos complejos e importantes, como la maduración, más allá de modelos lineales y bidimensionales, a menudo están regulados por una red transcripcional altamente redundante con entradas de múltiples niveles de epigenoma (Gao *et al.*, 2019). Muchos procesos biológicos son resistentes al cambio y este sistema redundante puede tolerar múltiples perturbaciones (Gao *et al.*, 2019). La señalización hormonal opera principalmente modulando la expresión o acción de los factores de transcripción; más los genes implicados en la biosíntesis, percepción y señalización de hormonas. Los factores de transcripción también pueden afectar directa e indirectamente la expresión de genes

necesarios para la síntesis de hormonas, y la expresión de algunos factores de transcripción en maduración está regulada por el desarrollo o por estímulos ambientales. En consecuencia, existe un equilibrio entre las señales de desarrollo, ambientales, hormonales y genéticas que gobiernan los procesos de desarrollo y maduración del fruto (Li *et al.*, 2021). Para una comprensión completa del proceso de maduración, es necesario saber cómo estos factores de transcripción y diferentes hormonas y factores ambientales operan e interactúan a nivel molecular para coordinar la miríada de reacciones de maduración (Li *et al.*, 2021). Por lo tanto, comprender cómo se regulan las diferentes facetas de la maduración puede ayudar a mejorar la calidad y cantidad de la fruta, prevenir el desperdicio y contribuir a mejorar la nutrición y la seguridad alimentaria.

### **5.2- Búsqueda en bases de datos bioinformáticas de las secuencias polimórficas encontradas**

Las 20 bandas seleccionadas, entre los cuatro genotipos (Tabla 3) con un claro polimorfismo según la técnica de ADNc-AFLP, se distribuyeron en partes iguales entre ambos sitios de maduración (planta y estantería). Las dos bases de datos empleadas, pertenecientes a SGN y NCBI, permitieron identificar a solo diez genes que también se distribuyeron en partes iguales entre cada sitio de maduración. Estos genes identificados, a partir de bandas eluidas de dos de los cuatro genotipos analizados, nueve a Caimanta y una a NOR. Ambos genotipos corresponden a *Solanum lycopersicum*. No se identificó ningún gen para LA722 (*S. pimpinellifolium*) y LA1385 (*S. lycopersicum* var *cerasiforme*). Esto podría deberse a que *Solanum lycopersicum*, históricamente ha sido utilizado como modelo para la maduración del fruto, y sumado a la disponibilidad de la secuencia completa de su genoma, ha conducido (Michael and Alba, 2012) a una mayor disponibilidad de información en diversas bases de datos. Más adelante se discutirá detalladamente sobre la función o vía en la que participan aquellos genes que fueron validados por RT-qPCR. Pero la función más representada fue la relacionada al estrés con tres de los cinco genes identificados, en particular aquellos detectados en los frutos que maduraron en planta.

### **5.3- Validación por RT-qPCR, identificación de regiones promotoras y análisis de elementos *cis*-regulatorios de los genes con expresión diferencial**

La validación por RT-qPCR, permitió seleccionar aquellos genes secuenciados con expresión diferencial significativa o cercana a un nivel de significancia bajo y coincidente con lo observado por ADNc-AFLP. La inconsistencia en la expresión, entre RT-qPCR y ADNc-AFLP para algunos genes podría deberse a la existencia de diferentes parálogos en el genoma (Xiao *et al.*, 2016).

A partir de las herramientas bioinformáticas empleadas para el análisis de elementos *cis* regulatorios, se encontraron características diferentes en los genes diferencialmente expresados y validados por RT-qPCR en frutos madurados en planta y estantería, en particular del genotipo Caimanta (Tabla 6). Se observaron grandes diferencias tanto en el número como en la naturaleza de los elementos *cis*-regulatorios presentes en la región reguladora de 1500 bp corriente arriba a partir del sitio de inicio de la traducción. En los genes identificados en frutos que maduraron en estantería se identificaron más variedad de tipos de elementos *cis*-regulatorios que en planta (Figura 6). Además, los genes expresados en frutos madurados en estantería se diferenciaron entre ellos en cuanto a la cantidad total (Figura 7), calculada por la repetición de motivos reguladores distribuidos en la zona promotora. En cambio, para la maduración en planta no se observó tal disparidad. Asimismo, la mitad de los motivos de los genes expresados en frutos con maduración en estantería fueron exclusivos contra 29% detectados en genes expresados en frutos madurados en planta, aunque hubo un 40,7% de los elementos *cis*-regulatorios compartidos por ambos grupos. La mayor proporción de los elementos *cis*-regulatorios se ubicaron en la cadena directa en ambos grupos. Otra diferencia fue que en estantería un mayor porcentaje (42%) de los motivos *cis* se localizaron cercanos al inicio de traducción, entre -501 a +1 bp, lo que indicaría que los elementos *cis*-regulatorios de estos genes podrían estar regulada en la región proximal (Figura 8). Por el contrario, en planta un 48,8% de los elementos *cis* se localizaron más alejados del codón ATG, lo que dejaría suponer una regulación en la región distal. Apreciaciones similares, en donde los motivos dentro de la región promotora se ubican mayormente en una u otra región, fue encontrada por Ibraheem

*et al.* (2010) en análisis *in silico* de elementos *cis*-regulatorios de genes transportadores de sacarosa en arroz (*Oryza sativa Japonica*) y *Arabidopsis thaliana*. En cuanto a la longitud de los motivos se encontró que 6 bp fue el más representado en los cinco genes (Figura 9), esto concuerda con los hallados en el análisis de otros genes perteneciente a *Arabidopsis thaliana* y arroz (Kaur *et al.*, 2017).

Los dominios totalmente conservados que incluyen las cajas TATA- y CAAT-boxes, así como otros elementos *cis*-regulatorios potencialmente importantes que se requieren para la actividad mínima del promotor de los genes en planta fueron hallados en casi todos los genes (Figura 10). CAAT-box estuvo presente en todos los genes analizados y es un elemento potenciador esencial presente en el promotor, es uno de los elementos impulsores para favorecer la expresión de un gen en particular (Koul *et al.*, 2019). Los TATA-box fueron identificables en los tres genes expresados en frutos madurados en estantería, en donde en un solo caso se encontró dentro de los 30 bp cercano al sitio de inicio de la transcripción, distancia mayormente descrita para este motivo (Porto *et al.*, 2014). El resto se encontró un poco más alejado. Para los genes expresados en frutos que maduraron en planta, en solo uno de los ellos no se encontró el TATA-box, la ausencia de TATA-box es posible ya que diversos estudios genómicos han descubierto que muchos grupos de genes (por ejemplo, genes de mantenimiento) carecen de la caja TATA (Basehoar *et al.*, 2004; Shahmuradov *et al.*, 2017; Shi and Zhou, 2006).

Como es sabido, cada gen contiene una combinación única de elementos en la secuencia reguladora que actúan en *cis* en la región 5', que determina su expresión temporal y espacial y participan en el control de muchos procesos biológicos y respuestas al estrés (Ibraheem *et al.*, 2010). La clasificación de estos elementos *cis*-regulatorios en categorías funcionales (Tabla 8) permitió analizar qué motivos reguladores están contenidos en los genes identificados en ambos sitios de maduración del fruto. En ambos sitios se encontró que el mayor porcentaje de elementos *cis* asociados se encuentran dentro de la categoría funcional, Respuesta al estrés (Figura 11 y 12), lo que permitiría inferir que la expresión de los genes polimórficos puede estar vinculada y regulada por las condiciones de estrés (Ibraheem *et al.*, 2010). De hecho, en cuatro de los cinco genes analizados como

resultado del BLAST, en este trabajo están vinculados a situaciones de estrés (Tabla 3). De los tres genes encontrados con expresión en estantería, dos de ellos Solyc11g020040 y Solyc08g080940 están relacionadas a situaciones de estrés. Solyc11g020040 es a una Chaperona DNA k que pertenece a la familia de proteínas de choque térmico 70, que son inducibles por estrés y cuya función principal es prevenir la agregación inespecífica de proteínas durante la respuesta a este (Richter *et al.*, 2010), las cuales además de su inducción por el estrés por calor, también se inducen durante el desarrollo (Faurobert *et al.*, 2007; Prasinós, 2005) y la maduración del fruto (Li *et al.*, 2017). Solyc08g080940 corresponde a una glutatión peroxidasa (GPX1e-1), que se encuentra en el citoplasma y responde al estrés oxidativo protegiendo a las células y las enzimas del daño oxidativo, al catalizar la reducción de peróxido de hidrógeno, peróxidos de lípidos e hidroperóxido orgánico, por el glutatión ([www.uniprot.com](http://www.uniprot.com)). Asimismo, los dos genes identificados en frutos madurados en planta, son parálogos (Gramene (<http://www.gramene.org>), PLAZA 4.5 dicot platform (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/>)), es decir se originaron de un gen en común por el evento de la duplicación, en donde Solyc03g115230 es una proteína de choque térmico y Solyc06g082560 es una proteína chaperona ClpB, y ambas están también relacionadas al estrés y jugarían un papel importante en la termotolerancia. Por otro lado, Solyc03g083910, detectado en frutos con maduración en estantería, es una  $\beta$ -fructofuranosidasa ácida, una invertasa, que se encuentra en el lumen vacuolar y es un componente integral de la membrana. Esta proteína está presente en el fruto de las especies de tomate de frutos rojos, que acumulan principalmente hexosas, y está ausente en las especies de frutos verdes, que por tanto acumulan sacarosa (SGN, <https://solgenomics.net>). Participa en el proceso metabólico de sacarosa, en la hidrólisis de residuos terminales de  $\beta$ -D-fructofuranósidos no reductores en  $\beta$ -D-fructofuranósidos.

Se ha visto que una u otra categoría funcional este más o menos representada por elementos *cis*-regulatorios relacionados a factores de transcripción, lo que generalmente permite inferir en qué momento se expresará el gen durante el ciclo de vida de la planta y/o bajo qué condiciones. Por ejemplo, en otros trabajos de tomate, arroz y *Arabidopsis thaliana*, se encontraron más representadas otras categorías funcionales. Así, para el gen perteneciente a la poligalacturonasa (PG) de tomate, la

mayoría de los factores de transcripción identificados pertenecieron a la categoría funcional Desarrollo de la planta y solo algunos estuvieron involucrados a Regulación hormonal (Lau *et al.*, 2009). Asimismo, en arroz (*Oryza sativa Japonica*) y *Arabidopsis thaliana* se encontró que en algunos grupos de genes pertenecientes a transportadores de sacarosa, poseen gran número de elementos *cis*-regulatorios asociados también a la categoría Desarrollo de la planta, mientras que un bajo número de estos estaban relacionados a la Regulación hormonal (Ibraheem *et al.*, 2010). Y aquellos asociados al estrés estaban presentes en una cantidad apreciable en todas las regiones reguladoras de los transportadores de sacarosa de ambas tipos de plantas (Ibraheem *et al.*, 2010).

Dentro de Respuesta al estrés, los elementos *cis*-regulatorios más representados en ambos grupos de genes, tanto por la variedad como por la cantidad de motivos encontrados, fueron los que tienen relación con la Respuesta a la Luz, que se conocen como elementos *cis* sensibles a la luz (LRE (light-responsive element) siglas en inglés). Esto podría indicar que la expresión de estos genes puede estar regulada por la luz (Ibraheem *et al.*, 2010). Entre otros, Box 4 y G-box fueron los motivos compartidos y encontrados con mayor presencia dentro de los cinco genes, aunque Box 4 se destacó mayormente entre los genes expresado en frutos de maduración en planta y G-Box entre los dos genes relacionados al estrés de frutos con maduración en estantería (Solyc11g020040 y Solyc08g080940). El elemento G-box (CACGTG) está ampliamente distribuido en muchos genes vegetales, en donde se ha visto que además de estar involucrado en la respuesta a la luz, está involucrado en la señalización hormonal (ácido abscísico, el metil jasmonato y la anaerobiosis y tiene un papel en la inducción de etileno) y a otras condiciones ambientales (Menkens *et al.*, 1995). El papel del elemento G-Box como parte del mecanismo de respuesta contra el estrés abiótico se ha descubierto en *Arabidopsis*, tabaco y trigo (Behnam *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2012). G-Box es uno de los elementos comunes relacionados con especies reactivas de oxígeno (ROS), mientras que W-box es uno de los principales elementos específicos de ROS (Kaur and Pati, 2016).

Los elementos *cis*-regulatorios que son necesarios para la unión de factores transcripcionales para la expresión génica inducible por sequía (Respuesta a sequía)



fueron los segundos más representados dentro de Respuesta al estrés (Figura 11 y 12). La mayoría de los mismos se repartieron entre los genes identificados en cada sitio de maduración de forma similar, en donde se destacaron los motivos MYB, MYC y Myb. Se ha demostrado que los miembros de factores de transcripción del dominio NAC inducidos por la sequía, la salinidad y el ABA se unen a estas secuencias y promueven la expresión de genes en *Arabidopsis* y el arroz (Gao *et al.*, 2010; Tran *et al.*, 2004). La sequía y la salinidad causan muchos daños estructurales y fisiológicos a las células / tejidos vegetales (McCue and Hanson, 1990; Yancey *et al.*, 1982).

Como ya se ha discutido, tres de los genes con expresión diferencial, uno expresado en frutos madurados en estantería y los dos restantes en frutos madurados en planta (Solyc03g115230.2 y Solyc06g082560.1), dan origen a proteínas de choque térmico (HSP siglas en inglés) relacionadas al estrés por alta temperatura, las cuales ayudan a proteger y replegar las proteínas celulares, y también mantienen un equilibrio de la homeostasis celular para la supervivencia de las plantas (Hartl, 1996; Larkindale and Vierling, 2008; Vierling, 1991). Generalmente, los genes implicados en estos mecanismos contienen motivos llamados elementos de choque térmico (HSE, heat shock element) que se unen a factores de choque térmico (HSF, heat shock transcription factor) y se regulan positivamente durante el estrés por calor. Se ha descubierto que los HSE se conservan de forma constante en las regiones reguladoras de muchos genes inducidos por el calor (Larkindale and Vierling, 2008). Solyc11g020040 de estantería y Solyc03g115230 de planta, en donde ambas dan origen a proteínas de choque térmico, y por tal motivo están relacionados al estrés por alta temperatura, contienen cada uno a pesar de su función, solamente un motivo relacionado a alta temperatura, el STRE elemento sensible al estrés (STRE, siglas en inglés), el cual se une específicamente a proteínas nucleares activadas por choque térmico (Freitas *et al.*, 2008). Por otro lado, en Solyc06g082560, también relacionada a la termotolerancia, no se le identificó ningún motivo relacionado a altas temperatura. Estos resultados, no serían llamativos, debido a que en un trabajo en tomate, en donde se analizó la presencia de dos HSEs asociados con familias de proteína de choque térmico pequeña (sHSP, small heat shock transcription factor), compuesta

por nueve genes y asociadas al factor de transcripción de calor A2 (HsfA2), un regulador clave de las HSP (Arce *et al.*, 2018), se encontró que en uno de los genes que estuvo fuertemente regulado durante la maduración del fruto, carece de los HSEs analizados en su región promotora. Se propone a otro motivo, como el CTAGA, el cual podría ser un sitio de unión válido al ADN, para factores de transcripción que permiten la respuesta a este gen, durante la maduración del fruto. Lo que permitiría sugerir la existencia de sistemas de acompañamiento alternativos para la respuesta al estrés. De tal forma, la falta o la escasa presencia de HSE en estos tres genes asociados al estrés térmico en este estudio, podrían ser regulados por un sistema alternativo no identificado en este análisis.

La respuesta más significativa de las plantas a diferentes estreses abióticos y bióticos, es el estrés oxidativo, que es un componente de muchas condiciones de estrés como la sequía, las altas temperaturas, la radiación UV-B, la salinidad, la toxicidad de los metales, el enfriamiento y las interacciones entre patógenos y plantas (Kaur *et al.*, 2017). En condiciones normales, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) en las plantas es muy baja y, bajo diversas tensiones ambientales, las ROS aumentan drásticamente, lo que altera el equilibrio normal de las especies reactivas de oxígeno que incluyen el anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) y el radical hidroxilo (HO) (KrishnaMurthy y Rathinasabapathi, 2013; Sharma *et al.*, 2012). La liberación de especies reactivas de oxígeno específicos y su sitio de producción depende del mecanismo de señalización que puede implicar la actividad de uno o un grupo de elementos *cis*-regulatorios presentes en la región corriente arriba de los genes diana (Kaur and Pati, 2016). Entre los tres genes identificados en frutos con maduración en estantería, Solyc08g080940 corresponde a una glutatión peroxidasa (GPX1e-1), que se encuentra en el citoplasma y responde al estrés oxidativo como se describió anteriormente y es el único al que se le identificó un elemento *cis*-regulatorio W box (TTGACC). W box es un elemento *cis*, que como ya se mencionó, es uno de los principales elementos específicos de ROS (Kaur and Pati, 2016), además de regular la expresión de genes relacionados con la defensa (Choi *et al.*, 2015; Rinerson *et al.*, 2015). Se ha encontrado que las cajas W box interactúan con factores de transcripción pertenecientes a la familia WRKY. Cabe mencionar que

otro elemento *cis* sensible al estrés oxidativo que se han encontrado en las plantas es ARE (elemento de respuesta anaeróbico o antioxidante) (Pastori y Foyer, 2002). ARE, es un elemento *cis*-regulatorios que se encontró presente en los cinco genes polimórficos analizados.

La segunda categoría funcional más representada entre los elementos *cis* regulatorios indentificados, fueron los motivos relacionados a Regulación hormonal (Figuras 9 y 10). En la actualidad, hay muchos estudios que muestran que la auxina, ABA y ácido jasmónico (JA) también influyen en la expresión de genes implicados en la biosíntesis de etileno y otros aspectos de la red de control de la maduración (Li *et al.*, 2021). Se encontró que entre los elementos *cis*-regulatorios que pertenecen a esta categoría, tres de los más representados están relacionados a hormonas vegetales, que son importantes reguladores de las vías de respuesta al estrés (Ibraheem *et al.*, 2010) como son el etileno, el JA (ácido jasmónico) y el ABA (ácido abscísico). Se sabe que las vías de transducción de las señales de estrés biótico y de heridas son a menudo complejas y pueden implicar un mensajero secundario común, como las hormonas vegetales, que incluyen las tres mencionadas anteriormente más el ácido salicílico (Ibraheem *et al.*, 2010). Como no todos los patrones de expresión de un gen están regulados por un solo elemento *cis*-regulatorio, sino por una combinación de diferentes elementos reguladores que confieren diferentes efectos en diferentes momentos o en diferentes células / tejidos (Qiu, 2003), los elementos *cis*-regulatorios de estas dos categorías podrían estar relacionadas trabajando en conjunto. De este modo, se observó que en genes identificados en frutos con maduración en estantería los elementos *cis*-regulatorios más representados, TGACG y CGTCA, fueron los relacionados a las funciones Respuesta a jasmonato de metilo en forma exclusiva (Figura 11), no encontrándose ningún motivo en los genes identificados en frutos madurados en planta. Tales motivos estarían involucrados tanto a la respuesta al jasmontato como a la regulación de la defensa de la planta contra el estrés abiótico y la descomposición poscosecha (Reyes-Díaz *et al.*, 2016). El jasmonato de metilo (MeJA), que es parte de la familia del jasmonato, activa sistemas antioxidantes para desintoxicar especies reactivas de oxígeno (ROS) en plantas estresadas (Takahashi y Hara, 2014; Yu *et al.*, 2019). Se ha demostrado que las redes de señalización relacionadas con las

hormonas ABA y JA están correlacionadas (Sun *et al.*, 2015). La inducción de la hormona ABA a menudo se basa en la presencia de un elemento de acción *cis* llamado elemento ABRE (sensible a ABA) (Shinozaki *et al.*, 2018; Thomashow, 1999; Uno *et al.*, 2000), fuertemente representado en Solyc08g080940, que codifica para la glutatión peroxidasa. Los elementos ABRE juegan un papel clave en la respuesta del ácido abscísico inducido por factores abióticos, latencia de las semillas y maduración (Shariatipour y Heidari, 2020).

Como ya se ha discutido, la maduración del fruto se ha estudiado ampliamente en tomate y es sabido que el etileno juega un papel clave en este proceso (Borghesi *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2015; Osorio *et al.*, 2013; Seymour *et al.*, 2013; Shinozaki *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019). Solyc03g115230 y Solyc06g082560 son los dos genes encontrados en frutos con maduración en planta a los que se les identificó un alto número de elementos *cis*-regulatorios, denominados ERE (ethylene responsive element), 3 y 7 respectivamente. El estado pintón (ropiente) en la que se trabajó en este estudio, es una etapa durante el proceso de maduración, en donde el etileno tiene gran presencia. Esto explicaría la existencia de los motivos ERE en los genes expresados en los frutos que han seguido el progreso normal de maduración en planta, y la ausencia o un único motivo (en el gen Solyc08g080940) en genes expresados en frutos madurados en estantería que han sido separados de la planta.

Otro de los elementos *cis*-regulatorios relacionados a hormonas con presencia en los genes expresados en fruto que maduran en planta, predominantemente en Solyc03g115230, fue giberelina (GA) (Figura 12). Es una hormona asociada a las etapas anteriores a la maduración de fruto. Durante el crecimiento activo del fruto, la división y elongación de las células del pericarpio es promovido por la biosíntesis de las giberelinas (GA) en el pericarpio (Obroucheva, 2014). Las auxinas y GA parecen ser las hormonas predominantes necesarias para la iniciación del fruto del tomate en respuesta a la fertilización, ya que la aplicación exógena de ambas hormonas conduce al inicio del fruto y al desarrollo partenocárpico (de Jong *et al.*, 2009).

Como se mencionó al principio del manuscrito, hasta la fecha, no se ha publicado ningún trabajo sobre los factores de transcripción / elementos *cis*-regulatorios que regulan la expresión de los genes con expresión diferencial en frutos que maduran

en planta y en estantería en genotipos discrepantes para la vida poscosecha de tomate. Los resultados indican que las diferencias en la expresión génica estarían asociados al tipo de maduración en planta o estantería. Además se observa una dependencia del genotipo en los frutos madurados en estantería. El genotipo NOR, evidenciaría otros genes activos que no estarían alcanzados por la modulación del factor de transcripción del gen *nor*. Los elementos *cis*-regulatorios de los genes de ambos grupos presentaron diferencias y su expresión estaría vinculada y regulada por las condiciones de estrés, especialmente en los frutos madurados en estantería. Este trabajo constituye el primer paso para descubrir las interacciones reguladoras de la transcripción de estos genes durante el desarrollo o en condiciones de estrés ambiental.

### 6.- Conclusión

De acuerdo a los objetivos específicos planteados a continuación se concluye:

La comparación de los perfiles de expresión diferencial obtenidos por ADNc-AFLP en frutos que alcanzan la madurez en planta con los perfiles de frutos que maduraron en estantería, permitió caracterizar cuatro genotipos de tomate que discrepan para la vida poscosecha de los frutos. El cultivar Caimanta de *S. lycopersicum* presentó la menor cantidad de fragmentos derivados de transcriptos (FDT) totales tanto cuando sus frutos maduran en planta como en estantería, indicando que el resto de los genotipos se encontrarían aún transcriptómicamente activos en el momento de la extracción de RNA. Por otra parte, hubo una disminución de los FDTs totales en todos los genotipos cuando los frutos maduran en estantería, en comparación con aquellos que lo hacen en planta.

La cantidad total de genes, como así también los genes específicos que se activan o reprimen, dependen del genotipo, en particular cuando el fruto madura en estantería. Por el contrario, durante la maduración del fruto en la planta, la cantidad total y específica de genes es independiente del genotipo, indicando que dicho proceso parece ser similar entre ellos.

Contrariamente a lo esperado, la mayor cantidad de fragmentos derivados de transcriptos detectados en el genotipo NOR, evidenciaría otros genes activos que escapan a la modulación del factor de transcripción codificado por el gen *nor*.

Se logró identificar genes a partir de la búsqueda en bases de datos bioinformáticas para las secuencias polimórficas encontradas en los genotipos Caimanta y Nor de *Solanum lycopersicum*.

El estrés fue la función con más representación de genes expresado en los frutos que maduraron en planta.

Se lograron validar por RT-qPCR algunos de los fragmentos derivados de transcriptos diferencialmente expresados en frutos que maduran en planta y estantería.

## CONCLUSIÓN

---

La comparación de los elementos *cis*-regulatorios de la región promotora de los genes con expresión diferencial en frutos que maduran en planta y estantería presentaron diferencias estructurales.

La combinación y número de motivos de elementos *cis*-regulatorios identificados en genes con expresión diferencial indican que la expresión de los mismos estaría vinculada y regulada por las condiciones de estrés.

En frutos que maduran en estantería se identificaron mayormente los motivos relacionados al estrés abiótico, indicando que separar al fruto inmaduro de tomate en la etapa rompiente, actuaría como un inductor de dicha respuesta.

El enfoque de este estudio fue utilizar la predicción de una herramienta bioinformática disponible para lograr una identificación completa de los elementos *cis*-regulatorios putativos que están presentes dentro de la región reguladora 5' de genes polimórficos encontrados en frutos madurados en estantería y planta, como fuente de información potencialmente útil para el análisis de la expresión y regulación de estos genes. Este análisis es el primer paso para dilucidar las interacciones reguladoras de la transcripción de estos genes. De todos modos, se necesitan estudios de seguimiento para validar funcionalmente la actividad de estos promotores aislados, mediante métodos transgénicos y estudios de expresión.

## ANEXO

### 7.- Anexo

Tabla 9. Elementos *cis*-regulatorios identificados en la región promotora de 1,5 kb corriente arriba, de los cinco genes de tomate (*Solanum lycopersicum*) que tuvieron expresión diferencial en Estanteria (1- Solyc03g083910.2, 2- Solyc11g020040.1, 3- Solyc08g080940.2) y en planta (4- Solyc03g115230.2 y 5- Solyc06g082560.1).

Elementos reguladores <i>cis</i>	Organismo	Secuencia	Función	1	2	3	4	5
A-box	<i>Petroselinum crispum</i>	CCGTCC	cis-acting regulatory element	-	-	575; +	-	-
AAAC-motif	<i>Spinacia oleracea</i>	CAATCAAAACCT	light responsive element	-	-	1239; +	-	-
AAGAA-motif	<i>Avena sativa</i>	GAAAGAA gGTAAAGAAA GAAAGAA	Desconocido	1060; -	243; - 455; + 697; +	-	245; + 585; -	446; + 622; - 1437; -
ABRE	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Triticum aestivum</i> <i>Hordeum vulgare</i>	ACGTG CACGTG GACACGTGGC GCAACGTGTC	cis-acting element involved in the abscisic acid responsiveness	-	-	1056; + 1410; + 1386; - 1407; - 1384; + 1387; +	698; + 699; +	-
ABRE3a	<i>Zea mays</i>	TACGTG	Regulatory elements related to abiotic stress response, involved in the abscisic acid response,	-	-	1055; +	-	-
ABRE4	<i>Zea mays</i>	CACGTA	Regulatory elements related to abiotic stress response, involved in the abscisic acid response	-	-	1055; -	-	-
ACA-motif	<i>Pisum sativum</i>	AATTACAGCCATT	part of gapA in (gapA-CMA1) involved with light responsiveness	-	-	-	-	361; -
ACE	<i>Petroselinum crispum</i>	GACACGTATG	cis-acting element involved in light responsiveness	-	-	-	-	423; +
ACTCATCCT sequence	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ACTCATCCT	drought response	-	-	1274; +	-	-
AP-1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TGAGTTAG	Desconocido	-	-	417; -	-	-
ARE	<i>Zea mays</i>	AAACCA	Antioxidant Responsive Element; a cis-acting regulatory element essential for anaerobic induction	98; -	365; + 1470; +	939; + 1078; +	1248; - 1441; - 1381; - 1294; - 1433; -	78; + 378; + 119; +
AT-rich element	<i>Glycine max</i>	ATAGAAATCAA	binding site of AT-rich DNA binding protein (ATBP-1)	746; +	-	585; -	-	-
ATC-motif	<i>Spinacia oleracea</i>	AGTAATCT	part of a conserved DNA module involved in light responsiveness	-	-	-	-	896; -
ATCT-motif	<i>Pisum sativum</i>	AATCTAATCC	part of a conserved DNA module involved in light responsiveness	1092; +	360; +	-	-	-
AT-TATA-box	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TATATA TATATAAA	core promoter / enhancer element	436; + 1451; - 951; -	160; + 1311; - 965; - 1389; -	593; + 595; +	191; - 279; + 199; +	706; + 969; - 266; +



## ANEXO

Box 4	<i>Petroselinum crispum</i>	ATTAAT	part of a conserved DNA module involved in light responsiveness	582; + 826; - 660; +	309; +	-	213; + 452; +	455; + 980; - 634; +
CAAT-box	<i>Pisum sativum</i> ; <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Nicotiana glutinosa</i>	CAAT CAAAT CCAAT	common cis-acting element in promoter and enhancer regions	1290; +	1058; +	1311; -	683; +	1117; -
CARE	<i>Oryza sativa</i>	CAACTCAC	GA response	-	-	506; -	-	-
CAT-box	<i>Arabidopsis thaliana</i>	GCCACT	cis-acting regulatory element related to meristem expression	-	-	-	39; -	-
CCGTCC-box	<i>Petroselinum hortense</i>	CCGTCC	Cis-acting regulatory element related to meristem specific activation	-	-	575; +	-	-
CGTCA-motif	<i>Hordeum vulgare</i>	CGTCA	cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness	-	315; + 738; + 431; -	395; - 398; +	-	-
ERE	<i>Nicotiana glutinosa</i>	ATTCATA ATTTTAAA	Ethylene-responsive element	-	-	1010; +	564; - 1338; + 1187; -	231; + 310; - 294; + 1166; + 233; - 771; - 308; +
G-box	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Zea mays</i> <i>Lycopersicon esculentum</i>	TACGTG CACGAC tgACACGTGGCA GCCACGTGGA CACGTC CACGTT	cis-acting regulatory element involved in light responsiveness	-	400; - 933; +	1055; + 1383; - 1407; + 1406; -	696; +	-
GA-motif	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ATAGATAA	part of a light responsive element	-	1291; -	-	-	-
GATA-motif	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAGATAAGATT GATAGGA	part of a light responsive element	476; -	-	-	-	244; -
GCN4_motif	<i>Oryza sativa</i>	TGAGTCA	cis-regulatory element involved in endosperm expression	-	-	-	1; -	-
GT1-motif	<i>Avena sativa</i> <i>Arabidopsis thaliana</i>	GGTTAAT	light responsive element	1327; -	-	-	-	-
GTGGC-motif	<i>Spinacia oleracea</i>	GATTCTGTGGC	part of a light responsive element	-	-	-	-	-
Gap-box	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAAATGAA(A/G)A	part of a light responsive element	964; -	-	-	490; +	-
I-box	<i>Gossypium hirsutum</i> <i>Triticum aestivum</i>	AAGATAAGGCT AGATAAGG	part of a light responsive element	476; -	-	-	-	-
LTR	<i>Hordeum vulgare</i>	CCGAAA	cis-acting element involved in low-temperature responsiveness	-	-	-	868; + 1398; -	-
MRE	<i>Petroselinum</i>	AACCTAA	MYB binding site involved in light	-	-	704; +	-	-

## ANEXO

	crispum		responsiveness					
MYB	Arabidopsis thaliana	CAACCA TAACCA	Cis-acting regulatory element involved in regulation of drought inducible gene expression	304; + 1329; +	35; + 510; + 225; + 1268; +	-	23; - 182; + 70; - 1207; -	476; - 28; +
MYC	Arabidopsis thaliana	CATTG CAATTG CATGTG	Cis-acting regulatory element involved in early response to drought and abscisic acid induction	968; +	395; -	776; - 1020; +	490; - 914; +	1430; + 71; +
Myb	Arabidopsis thaliana	TAACTG CAACTG	Cis-acting regulatory element involved in regulation of drought inducible gene expression	94; +	189; -	523; + 559; +	-	189; -
Myb-binding site	Nicotiana tabacum	CAACAG	cell cycle and cell proliferation response MYB binding site involved in drought-inducibility	-	-	-	-	476; -
Myc	Arabidopsis thaliana	TCTCTTA	Desconocido	-	-	-	1136; +	1442; +
P-box	Oryza sativa	CCTTTTG	gibberellin-responsive element	1396; +	-	-	542; + 940; -	498; -
RY-element	Helianthus annuus	CATGCATG	cis-acting regulatory element involved in seed-specific regulation	-	-	1251; -	-	-
STRE	Arabidopsis thaliana	AGGGG	Stress response element. heat shock protein-related element STRE	-	1170; +	-	1112; +	-
TATA	Arabidopsis thaliana	TATAAAAT	core promoter / enhancer element	72; +	-	727; + 997; -	-	678; + 787; - 395; + 674; -
TATA-box	Brassica napus Brassica oleracea	TATA ATTATA ATATAA ATATAT	core promoter element around -30 of transcription start	1385; +	1093; +	1349; +	TATA-less	1241; +
TATC-box	Oryza sativa	TATCCCA	cis-acting element involved in gibberellin-responsiveness	-	-	-	649; + 924; +	-
TCA-element	Nicotiana tabacum	CCATCTTTTT	cis-acting element involved in salicylic acid responsiveness	-	1016; -	-	-	-
TCCC-motif	Spinacia oleracea	TCTCCCT	part of a light responsive element	-	-	-	-	1039; - 1269; -
TC-rich repeats	Nicotiana tabacum	GTTTTCTTAC ATTCTCTAAC	cis-acting element involved in defense and stress responsiveness	1059; +	652; + 1091; - 1025; -	-	-	-
TCT-motif	Arabidopsis thaliana	TCTTAC	part of a light responsive element	-	1025; -	-	130; -	-
TGACG-motif	Hordeum vulgare	TGACG	cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness	-	315; - 738; - 431; +	395; + 398; -	-	-
Unnamed__1	Zea mays Petunia sp. Glycine max	CGTGG GCCACGTGGC GAATTTAATTAA	Desconocido 60K protein binding site	-	438; - 939; - 932; -	1384; - 1408; -	697; -	452; +
Unnamed__6	Zea mays	taTAAATATct	Desconocido	104; +	-	809; + 1140; -	-	276; +
W box	Arabidopsis	TTGACC	Cis-acting regulatory element	-	-	1468; +	106; -	-

## ANEXO

	thaliana		involved in direct fungal elicitor stimulated transcription of defense genes and activation of genes involved in response to wounding WRKY binding site					
WUN-motif	Nicotiana glutinosa	AAATTACT TTATTACAT AAATTTCTT TAATTACTC	Wound-responsive element	-	469; +	-	-	
chs-CMA1a	Daucus carota	TTACTTAA	part of a light responsive element	-	-	1154; +	-	
chs-CMA2a	Petroselinum crispum	TCACTTGA	part of a light responsive element	989; +	-	-	-	
circadian	Lycopersicon esculentum	CAAAGATATC	cis-acting regulatory element involved in circadian control	-	347; +	-	-	

**8.- Bibliografía**

- ALBA, R., PAYTON, P., FEI, Z., MCQUINN, R., DEBBIE, P., MARTIN, G.B., TANKSLEY, S.D., GIOVANNONI, J.J., 2005. Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. *Plant Cell* 17, 2954–2965. <https://doi.org/10.1105/TPC.105.036053>
- ANJANASREE, K., SRIVASTAVA, A., HANDA, A., BANSAL, K., 2005. Identification of differentially expressed ripening-related cDNA clones from tomato (*Lycopersicon esculentum*) using tomato EST array. *Curr. Sci.* 88(5), 792–796.
- ARCE, D., SPETALE, F., KRSTICEVIC, F., CACCHIARELLI, P., LAS RIVAS, J. DE, PONCE, S., PRATTA, G., TAPIA, E., 2018. Regulatory motifs found in the small heat shock protein (sHSP) gene family in tomato. *BMC Genomics* 19, 4–10. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5190-z>
- BACHEM, C.W.B., VAN DER HOEVEN, R.S., DE BRUIJN, S.M., VREUGDENHIL, D., ZABEAU, M., VISSER, R.G.F., 1996. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J.* 9, 745–753. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.9050745.x>
- BASEHOAR, A.D., ZANTON, S.J., PUGH, B.F., 2004. Identification and distinct regulation of yeast TATA box-containing genes. *Cell* 116, 699–709. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00205-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00205-3)
- BEHNAM, B., IUCHI, S., FUJITA, M., FUJITA, Y., TAKASAKI, H., OSAKABE, Y., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., KOBAYASHI, M., SHINOZAKI, K., 2013. Characterization of the promoter region of an arabidopsis gene for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase involved in dehydration-inducible transcription. *DNA Res.* 20, 315–324. <https://doi.org/10.1093/dnares/dst012>
- BERUMEN-VARELA, G., RIVERA-DOMÍNGUEZ, M., TRONCOSO-ROJAS, R., BÁEZ-SAÑUDO, R., TIZNADO-HERNÁNDEZ, M.E., 2017. Physiological function of rhamnogalacturonan lyase genes based in the analysis of cis-acting elements located in the promoter region. *Res. J. Biotechnol.* 12, 77–108.
- BETANCOURT, L., STEVENS, M., KADER, A., 1977. Accumulation and loss of sugars and reduced ascorbic acid in attached and detached tomato fruits. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 102, 721–723.
- BORGHESI, E., FERRANTE, A., GORDILLO, B., RODRÍGUEZ-PULIDO, F.J., COCETTA, G., TRIVELLINI, A., MENSUALI-SODI, A., MALORGIO, F., HEREDIA, F.J., 2016. Comparative physiology during ripening in tomato rich-anthocyanins fruits. *Plant Growth Regul.* 80, 207–214. <https://doi.org/10.1007/s10725-016-0158-y>
- BREYNE, P., DREESEN, R., CANNOOT, B., ROMBAUT, D., VANDEPOELE, K., ROMBAUTS, S., VANDERHAEGHEN, R., INZÉ, D., ZABEAU, M., 2003. Quantitative cDNA-AFLP analysis for genome-wide expression studies. *Mol. Genet. Genomics* 269, 173–179. <https://doi.org/10.1007/s00438-003-0830-6>
- BROWN, T.A., 2002. *Genomes*. 2nd, UK: Wiley-Liss Manchester. PMID: 20821850.
- CHOI, C., HWANG, S.H., FANG, I.R., KWON, S. IL, PARK, S.R., AHN, I., KIM, J.B., HWANG, D.J., 2015. Molecular characterization of *Oryza sativa* WRKY6, which binds to W-box-

- like element 1 of the *Oryza sativa* pathogenesis-related (PR) 10a promoter and confers reduced susceptibility to pathogens. *New Phytol.* 208, 846–859. <https://doi.org/10.1111/nph.13516>
- DE JONG, M., MARIANI, C., VRIEZEN, W.H., 2009. The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set. *J. Exp. Bot.* 60, 1523–1532. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp094>
- EXPÓSITO-RODRÍGUEZ, M., BORGES, A.A., BORGES-PÉREZ, A., PÉREZ, J.A., 2008. Selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies during tomato development process. *BMC Plant Biol.* 8, 131. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-131>
- FAUROBERT, M., MIHR, C., BERTIN, N., PAWLOWSKI, T., NEGRONI, L., SOMMERER, N., CAUSSE, M., 2007. Major proteome variations associated with cherry tomato pericarp development and ripening. *Plant Physiol.* 143, 1327–1346. <https://doi.org/10.1104/pp.106.092817>
- FISCHER, A., SAEDLER, H., THEISSEN, G., 1995. Restriction fragment length polymorphism-coupled domain-directed differential display: a highly efficient technique for expression analysis of multigene families. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 5331. <https://doi.org/10.1073/PNAS.92.12.5331>
- FRANK, G., PRESSMAN, E., OPHIR, R., ALTHAN, L., SHAKED, R., FREEDMAN, M., SHEN, S., FIRON, N., 2009. Transcriptional profiling of maturing tomato (*Solanum lycopersicum* L.) microspores reveals the involvement of heat shock proteins, ROS scavengers, hormones, and sugars in the heat stress response. *J. Exp. Bot.* 60, 3891–908. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp234>
- FREITAS, F.Z., CHAPEAUROUGE, A., PERALES, J., BERTOLINI, M.C., 2008. A systematic approach to identify STRE-binding proteins of the gsn glycogen synthase gene promoter in *Neurospora crassa*. *Proteomics* 8, 2052–2061. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700921>
- GAO, F., XIONG, A., PENG, R., JIN, X., XU, J., ZHU, B., CHEN, J., YAO, Q., 2010. OsNAC52, a rice NAC transcription factor, potentially responds to ABA and confers drought tolerance in transgenic plants. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 100, 255–262. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9640-9>
- GAO, Y., ZHU, N., ZHU, X., WU, M., CAI-ZHONG, J., GRIERSON, D., LUO, Y., SHEN, W., ZHONG, S., FU, D.Q., QU, G., 2019. Diversity and redundancy of the ripening regulatory networks revealed by the fruitENCODE and the new CRISPR/Cas9 CNR and NOR mutants. *Hortic. Res.* 6. <https://doi.org/10.1038/s41438-019-0122-x>
- GILLY, G., 2012. Regulation of the initiation of eukaryotic transcription. *Essays Biochem* 2001 Anal. Biol. Networks Transcr. Networks - Promot. Seq. Anal. Tel Aviv Univ.
- GIOVANNONI, J.J., 2007. Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 283–289. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2007.04.008>
- GIOVANNONI, J.J., 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell* 16, 170–181. <https://doi.org/10.1105/tpc.019158>
- GRAY, J., PICTON, S., SHABBEER, J., SCHUCH, W., GRIERSON, D., 1992. Molecular biology of fruit ripening and its manipulation with antisense genes. *Plant Mol. Biol.* 19, 69–87. <https://doi.org/10.1007/BF00015607>
- GRIERSON, D., FRAY, R., 1994. Control of ripening in transgenic tomatoes. *Euphytica* 79,

- 251–263. <https://doi.org/10.1007/BF00022526>
- HALL, T.A., 1999. BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.
- HARTL, F.U., 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/381571a0>
- HERNANDEZ-GARCIA, C.M., FINER, J.J., 2014. Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. *Plant Sci.* 217–218, 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.12.007>
- HEWITT, J.D., GARVEY, T.C., 1987. Wild sources of high soluble solids in tomato. *Plant Biol.* 4: Tomato, p.45-54.
- IBRAHEEM, O., BOTHA, C.E.J., BRADLEY, G., 2010. *In silico* analysis of cis-acting regulatory elements in 5' regulatory regions of sucrose transporter gene families in rice (*Oryza sativa* Japonica) and *Arabidopsis thaliana*. *Comput. Biol. Chem.* 34, 268–283. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2010.09.003>
- KARLOVA, R., CHAPMAN, N., DAVID, K., ANGENENT, G.C., SEYMOUR, G.B., DE MAAGD, R.A., 2014. Transcriptional control of fleshy fruit development and ripening. *J. Exp. Bot.* 65, 4527–4541. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERU316>
- KAUR, A., PATI, P.K., PATI, A.M., NAGPAL, A.K., 2017. In-silico analysis of cis-acting regulatory elements of pathogenesis-related proteins of *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. *PLoS One* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184523>
- KAUR, G., PATI, P.K., 2016. Analysis of cis-acting regulatory elements of Respiratory burst oxidase homolog (Rboh) gene families in *Arabidopsis* and rice provides clues for their diverse functions. *Comput. Biol. Chem.* 62, 104–118. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2016.04.002>
- KLEE, H.J., GIOVANNONI, J.J., 2011. Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. *Annu. Rev. Genet.* 45, 41–59. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132507>
- KOUL, A., SHARMA, D., KAUL, S., DHAR, M.K., 2019. Identification and *in silico* characterization of cis-acting elements of genes involved in carotenoid biosynthesis in tomato. *3 Biotech* 9, 287. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1798-1>
- KRISHNAMURTHY, A., RATHINASABAPATHI, B., 2013. Oxidative stress tolerance in plants: Novel interplay between auxin and reactive oxygen species signaling. *Plant Signal. Behav.* 8. <https://doi.org/10.4161/psb.25761>
- LABATE, J.A., SHEFFER, S.M., BALCH, T., ROBERTSON, L.D., 2011. Diversity and Population Structure in a Geographic Sample of Tomato Accessions. *Crop Sci.* 51, 1068–1079. <https://doi.org/10.2135/CROPSCI2010.05.0305>
- LARKINDALE, J., VIERLING, E., 2008. Core genome responses involved in acclimation to high temperature. *Plant Physiol.* 146, 748–761. <https://doi.org/10.1104/pp.107.112060>
- LAU, J.M., COOPER, N.G., ROBINSON, D.L., KORBAN, S.S., 2009a. Sequence and *in silico* characterization of the tomato polygalacturonase (PG) promoter and terminator regions. *Plant Mol. Biol. Report.* 27, 250–256. <https://doi.org/10.1007/s11105-008-0081-0>
- LAU, J.M., COOPER, N.G., ROBINSON, D.L., KORBAN, S.S., 2009b. Sequence and *in silico*

- characterization of the tomato polygalacturonase (PG) promoter and terminator regions. *Plant Mol. Biol. Report.* 27, 250–256. <https://doi.org/10.1007/s11105-008-0081-0>
- LESCOT, M., DÉHAIS, P., THUIS, G., MARCHAL, K., MOREAU, Y., VAN DE PEER, Y., ROUZÉ, P., ROMBAUTS, S., 2002. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 30, 325–327. <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.325>
- LI, L., WANG, X., ZHANG, X., GUO, M., LIU, T., 2017. Unraveling the target genes of RIN transcription factor during tomato fruit ripening and softening. *J. Sci. Food Agric.* 97, 991–1000. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7825>
- LI, S., CHEN, K., GRIERSON, D., 2021. Molecular and hormonal mechanisms regulating fleshy fruit ripening. *Cells* 10, 1–34. <https://doi.org/10.3390/cells10051136>
- LI, S., CHEN, K., GRIERSON, D., 2019. A critical evaluation of the role of ethylene and MADS transcription factors in the network controlling fleshy fruit ripening. *New Phytol.* 221, 1724–1741. <https://doi.org/10.1111/nph.15545>
- LIU, M., PIRRELLO, J., CHERVIN, C., ROUSTAN, J.-P., BOUZAYEN, M., 2015. Ethylene control of fruit ripening: revisiting the complex network of transcriptional regulation. *Plant Physiol.* pp.01361.2015. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01361>
- MCCUE, K.F., HANSON, A.D., 1990. Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends Biotechnol.* 8, 358–362. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(90\)90225-M](https://doi.org/10.1016/0167-7799(90)90225-M)
- MENKENS, A.E., SCHINDLER, U., CASHMORE, A.R., 1995. The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. *Trends Biochem. Sci.* [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)89118-5](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)89118-5)
- MICHAEL, T.P., ALBA, R., 2012. The tomato genome fleshed out. *Nat. Biotechnol.* 2012 308 30, 765–767. <https://doi.org/10.1038/nbt.2319>
- MILLER, J.C., TANKSLEY, S.D., 1990. RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theor. Appl. Genet.* 1990 804 80, 437–448. <https://doi.org/10.1007/BF00226743>
- MOLESINI, B., ROTINO, G.L., SPENA, A., PANDOLFINI, T., 2009. Expression profile analysis of early fruit development in *iaaM*-parthenocarpic tomato plants. *BMC Res. Notes* 2009 21 2, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-2-143>
- MOORE, S., VREBALOV, J., PAYTON, P., GIOVANNONI, J., 2002. Use of genomics tools to isolate key ripening genes and analyse fruit maturation in tomato. *J. Exp. Bot.* 53, 2023–2030. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERF057>
- MUTSCHLER, M.A., WOLFE, D.W., COBB, E.D., YOURSTONE, K.S., 1992. Tomato Fruit Quality and Shelf Life in Hybrids Heterozygous for the *alc* Ripening Mutant. *HortScience* 27, 352–355. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.27.4.352>
- NUEZ, F., 1991. La mejora genética de hortalizas. “Rallo, L.; Nuez, F. (Eds.). *La Hortic. española en la C. E. Soc. Española Ciencias Hortícolas*. Ediciones Hortic. Reus: 482–505.
- OBROUCHEVA, N. V., 2014. Hormonal regulation during plant fruit development. *Russ. J. Dev. Biol.* 45, 11–21. <https://doi.org/10.1134/S1062360414010068>

- OSORIO, S., SCOSSA, F., FERNIE, A.R., 2013. Molecular regulation of fruit ripening. *Front. Plant Sci.* 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00198>
- PASTORI, G.M., FOYER, C.H., 2002. Common Components, Networks, and Pathways of Cross-Tolerance to Stress. The Central Role of “Redox” and Abscisic Acid-Mediated Controls. *Plant Physiol.* 129, 460–468. <https://doi.org/10.1104/pp.011021>
- PAWEŁKOWICZ, M.E., SKARZYŃSKA, A., POSYNIAK, K., ZIĄBSKA, K., PŁADER, W., PRZYBECKI, Z., 2015. Advantages and disadvantages in usage of bioinformatic programs in promoter region analysis. *Photonics Appl. Astron. Commun. Ind. High-Energy Phys. Exp.* 2015 9662, 96621L. <https://doi.org/10.1117/12.2205542>
- PEREIRA DA COSTA, J.H., MARTÍNEZ, V.A., RODRÍGUEZ, G.R., PRATTA, G.R., ZORZOLI, R., 2009. Influencia de genes exóticos sobre la vida en estantería y el peso del fruto de tomate. *AgriScientia* 26.
- PEREIRA DA COSTA, J.H., RODRÍGUEZ, G.R., PICARDI, L.A., ZORZOLI, R., PRATTA, G.R., 2018. Genome-wide expression analysis at three fruit ripening stages for tomato genotypes differing in fruit shelf life. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 229, 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.11.004>
- PEREIRA DA COSTA, J.H., RODRÍGUEZ, G.R., PRATTA, G.R., PICARDI, L.A., ZORZOLI, R., 2014. Pericarp polypeptides and SRAP markers associated with fruit quality traits in an interspecific tomato backcross. *Genet. Mol. Res.* 13, 2539–2547. <https://doi.org/10.4238/2014.January.24.10>
- PORTO, M.S., PINHEIRO, M.P.N., BATISTA, V.G.L., DOS SANTOS, R.C., DE ALBUQUERQUE MELO FILHO, P., DE LIMA, L.M., 2014. Plant promoters: An approach of structure and function. *Mol. Biotechnol.* 56, 38–49. <https://doi.org/10.1007/s12033-013-9713-1>
- PRASINOS, C., 2005. Tight regulation of expression of two *Arabidopsis* cytosolic *Hsp90* genes during embryo development. *J. Exp. Bot.* 56, 633–644. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri035>
- PRATTA, G., ZORZOLI, R., PICARDI, L.A., 1996. Interacciones genéticas entre germoplasma silvestre y cultivado de *Lycopersicon* spp. con efectos sobre la calidad del fruto de tomate. *Hort. Arg.* 15(39):, 25–32.
- QIU, P., 2003. Computational approaches for deciphering the transcriptional regulatory network by promoter analysis. *BIOSILICO* 1, 125–133. [https://doi.org/10.1016/S1478-5382\(03\)02341-2](https://doi.org/10.1016/S1478-5382(03)02341-2)
- RANI, V., 2007. Computational methods to dissect cis-regulatory transcriptional networks. *J. Biosci.* 32, 1325–1330. <https://doi.org/10.1007/s12038-007-0142-9>
- REYES-DÍAZ, M., LOBOS, T., CARDEMIL, L., NUNES-NESE, A., RETAMALES, J., JAAKOLA, L., ALBERDI, M., RIBERA-FONSECA, A., 2016. Methyl jasmonate: An alternative for improving the quality and health properties of fresh fruits. *Molecules* 21, 1–18. <https://doi.org/10.3390/molecules21060567>
- RICHTER, K., HASLBECK, M., BUCHNER, J., 2010. The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. *Mol. Cell.* <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.10.006>
- RICK, C.M., 1988. Tomato-like nightshades: Affinities, autoecology, and breeders’ opportunities. *Econ. Bot.* 1988 422 42, 145–154. <https://doi.org/10.1007/BF02858915>



- RICK, C.M., 1978. The Tomato. *Sci. Am.* 239, 76–87. <https://doi.org/10.1038/SCIENTIFICAMERICAN0878-76>
- RINERSON, C.I., SCULLY, E.D., PALMER, N.A., DONZE-REINER, T., RABARA, R.C., TRIPATHI, P., SHEN, Q.J., SATTLER, S.E., ROHILA, J.S., SARATH, G., RUSHTON, P.J., 2015. The WRKY transcription factor family and senescence in switchgrass. *BMC Genomics* 16, 912. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2057-4>
- RODRÍGUEZ, G.R., PRATTA, G.R., LIBERATTI, D.R., ZORZOLI, R., PICARDI, L.A., 2010. Inheritance of shelf life and other quality traits of tomato fruit estimated from F1's, F2's and backcross generations derived from standard cultivar, nor homozygote and wild cherry tomato. *Euphytica* 176, 137–147. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0241-9>
- ROLIN, D., TEYSSIER, E., HONG, Y., GALLUSCI, P., 2015. Tomato fruit quality improvement facing the functional genomics revolution, *Applied Plant Genomics and Biotechnology*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100068-7.00009-4>
- SALADIÉ, M., MATAS, A.J., ISAACSON, T., JENKS, M.A., GOODWIN, S.M., NIKLAS, K.J., XIAOLIN, R., LABAVITCH, J.M., SHACKEL, K.A., FERNIE, A.R., LYTOVCHENKO, A., O'NEILL, M.A., WATKINS, C.B., ROSE, J.K.C., 2007. A Reevaluation of the Key Factors That Influence Tomato Fruit Softening and Integrity. *Plant Physiol.* 144, 1012–1028. <https://doi.org/10.1104/pp.107.097477>
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory model* xxxviii–1546.
- SARGENT, T., 1987. Isolation of differentially expressed genes. Abelson J Simon M (eds), *Methods Enzymol.*, Acad. Press. New York. 152, 423–432.
- SAWAMURA, M., KNEGT, E., BRUINSMA, J., 1978. Levels of endogenous ethylene, carbon dioxide, and soluble pectin, and activities of pectin methylesterase and polygalacturonase in ripening tomato fruits. *Plant Cell Physiol.* 19, 1061–1069. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a075672>
- SCHMITTGEN, T.D., LIVAK, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- SEYMOUR, G.B., ØSTERGAARD, L., CHAPMAN, N.H., KNAPP, S., MARTIN, C., 2013. Fruit Development and Ripening. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 219–241. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120057>
- SHAHMURADOV, I.A., UMAROV, R.K., SOLOVYEV, V. V., 2017. TSSPlant: A new tool for prediction of plant Pol II promoters. *Nucleic Acids Res.* 45, 1–12. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1353>
- SHARIATIPOUR, N., HEIDARI, B., 2020. Meta-Analysis of Expression of the Stress Tolerance Associated Genes and Uncover their Cis-Regulatory Elements in Rice (*Oryza sativa* L.). *Open Bioinforma. J.* 13, 39–49. <https://doi.org/10.2174/1875036202013010039>
- SHARMA, P., JHA, A.B., DUBEY, R.S., PESSARAKLI, M., 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *J. Bot.* 2012, 1–26. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
- SHI, W., ZHOU, W., 2006. Frequency distribution of TATA Box and extension sequences on human promoters. *BMC Bioinformatics* 7, S2. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-S4-S2>

- SHINOZAKI, Y., NICOLAS, P., FERNANDEZ-POZO, N., MA, Q., EVANICH, D.J., SHI, Y., XU, Y., ZHENG, Y., SNYDER, S.I., MARTIN, L.B.B., RUIZ-MAY, E., THANNHAUSER, T.W., CHEN, K., DOMOZYCH, D.S., CATALÁ, C., FEI, Z., MUELLER, L.A., GIOVANNONI, J.J., ROSE, J.K.C., 2018. High-resolution spatiotemporal transcriptome mapping of tomato fruit development and ripening. *Nat. Commun.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02782-9>
- SOL GENOMICS NETWORK, 2014. Sol Genomics Network [WWW Document]. URL <https://solgenomics.net/> (accessed 3.3.21).
- STÖLTING, K.N., GORT, G., WÜST, C., WILSON, A.B., 2009. Eukaryotic transcriptomics *in silico*: Optimizing cDNA-AFLP efficiency. *BMC Genomics* 10, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-565>
- SUN, W., CHEN, H., WANG, J., SUN, H.W., YANG, S.K., SANG, Y.L., LU, X.B., XU, X.H., 2015. Expression analysis of genes encoding mitogen-activated protein kinases in maize provides a key link between abiotic stress signaling and plant reproduction. *Funct. Integr. Genomics* 15, 107–120. <https://doi.org/10.1007/s10142-014-0410-3>
- TAKAHASHI, I., HARA, M., 2014. Enhancement of starch accumulation in plants by exogenously applied methyl jasmonate. *Plant Biotechnol. Rep.* 8, 143–149. <https://doi.org/10.1007/s11816-013-0304-1>
- THOMASHOW, M.F., 1999. PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 571–599. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.571>
- TRAN, L.S.P., NAKASHIMA, K., SAKUMA, Y., SIMPSON, S.D., FUJITA, Y., MARUYAMA, K., FUJITA, M., SEKI, M., SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., 2004. Isolation and functional analysis of arabidopsis stress-inducible NAC transcription factors that bind to a drought-responsive cis-element in the early responsive to dehydration stress 1 promoter. *Plant Cell* 16, 2481–2498. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.022699>
- UNO, Y., FURIHATA, T., ABE, H., YOSHIDA, R., SHINOZAKI, K., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., 2000. Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 11632–11637. <https://doi.org/10.1073/pnas.190309197>
- VIERLING, E., 1991. The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 579–620. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.003051>
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., LEE, T. VAN DE, HORNES, M., FRITERS, A., POT, J., PALEMAN, J., KUIPER, M., ZABEAU, M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23, 4407–4414. <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>
- VRIEZEN, W.H., FERON, R., MARETTO, F., KEIJMAN, J., MARIANI, C., 2008. Changes in tomato ovary transcriptome demonstrate complex hormonal regulation of fruit set. *New Phytol.* 177, 60–76. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02254.x>
- VUYLSTEKE, M., PELEMAN, J.D., VAN EIJK, M.J.T., 2007. AFLP-based transcript profiling (cDNA-AFLP) for genome-wide expression analysis. *Nat. Protoc.* 2, 1399–1413. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.174>
- WANG, R., ANGENENT, G.C., SEYMOUR, G., DE MAAGD, R.A., 2020. Revisiting the Role of

- Master Regulators in Tomato Ripening. *Trends Plant Sci.* 25, 291–301. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.11.005>
- WOODHEAD, M., TAYLOR, M.A., BRENNAN, R., MCNICOL, R.J., DAVIES, H. V., 1998. Cloning and characterisation of the cDNA clones of five genes that are differentially expressed during ripening in the fruit of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.). *J. Plant Physiol.* 153, 381–393. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(98\)80165-X](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(98)80165-X)
- XIAO, D., LIU, S.T., WEI, Y.P., ZHOU, D.Y., HOU, X.L., LI, Y., HU, C.M., 2016. CDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in incompatible interaction between infected non-heading Chinese cabbage and *Hyaloperonospora parasitica*. *Hortic. Res.* 3, 1–9. <https://doi.org/10.1038/hortres.2016.34>
- YANCEY, P.H., CLARK, M.E., HAND, S.C., BOWLUS, R.D., SOMERO, G.N., 1982. Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science* (80-. ). 217, 1214–1222. <https://doi.org/10.1126/science.7112124>
- YU, X., ZHANG, W., ZHANG, Y., ZHANG, XIAOJIA, LANG, D., ZHANG, XINHUI, 2019. The roles of methyl jasmonate to stress in plants. *Funct. Plant Biol.* 46, 197. <https://doi.org/10.1071/FP18106>
- ZHANG, H.B., BOKOWIEC, M.T., RUSHTON, P.J., HAN, S.C., TIMKO, M.P., 2012. Tobacco transcription factors NtMYC2a and NtMYC2b form nuclear complexes with the NtJAZ1 repressor and regulate multiple jasmonate-inducible steps in nicotine biosynthesis. *Mol. Plant* 5, 73–84. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr056>
- ZHAO, T., LIU, G., LI, S., LI, J., JIANG, J., ZHANG, H., KANG, L., CHEN, X., XU, X., 2015. Differentially expressed gene transcripts related to the Cf-19-mediated resistance response to *Cladosporium fulvum* infection in tomato. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 89, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2014.11.003>
- ZHONG, S., FEI, Z., CHEN, Y.R., ZHENG, Y., HUANG, M., VREBALOV, J., MCQUINN, R., GAPPER, N., LIU, B., XIANG, J., SHAO, Y., GIOVANNONI, J.J., 2013. Single-base resolution methylomes of tomato fruit development reveal epigenome modifications associated with ripening. *Nat. Biotechnol.* 31, 154–159. <https://doi.org/10.1038/NBT.2462>
- ZHU, M., CHEN, G., ZHOU, S., TU, Y., WANG, Y., DONG, T., HU, Z., 2014. A New Tomato NAC (NAM/ATAF1/2/CUC2) Transcription Factor, SINAC4, Functions as a Positive Regulator of Fruit Ripening and Carotenoid Accumulation. *Plant Cell Physiol.* 55, 119–135. <https://doi.org/10.1093/PCP/PCT162>
- ZORZOLI, R., PICARDI, L.A., PRATTA, G., 1998. Efecto de los mutantes nor y rin y de genes de origen silvestres sobre la calidad postcosecha de los frutos de tomate. *Mendeliana* 13, 12–19
- ZUO, Y.C., LI, Q.Z., 2011. Identification of TATA and TATA-less promoters in plant genomes by integrating diversity measure, GC-Skew and DNA geometric flexibility. *Genomics* 97, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2010.11.002>