



TESIS DOCTORAL

Análisis transcriptómico del proceso de abscisión del fruto  
maduro en *Cucumis melo* L.

Jorge Corbacho Sánchez

Departamento de Biología Vegetal, Ecología y Ciencias de  
la Tierra

2015





TESIS DOCTORAL

Análisis transcriptómico del proceso de abscisión del fruto maduro  
en *Cucumis melo* L.

Transcriptomes of mature-fruit abscission in *Cucumis melo* L.

Jorge Corbacho Sánchez

Departamento de Biología Vegetal, Ecología y Ciencias de la Tierra

V<sup>o</sup>B<sup>a</sup> Director:

Fdo: María del Carmen Gómez Jiménez

2015





UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL, ECOLOGÍA Y CIENCIAS DE LA TIERRA  
AREA DE FISILOGÍA VEGETAL  
Avda de Elvas, s/n  
06006 Badajoz  
Tel. +34 924 289300  
Email: mcgomez@unex.es

Dra. MARÍA DEL CARMEN GÓMEZ JIMÉNEZ, Profesora Titular del Área de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura

**INFORMA:**

Que el trabajo de investigación titulado "*Análisis transcriptómico del proceso de abscisión del fruto maduro en Cucumis melo L.*" del que es autor **D. JORGE CORBACHO SANCHEZ**, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Biología Vegetal, Ecología y Ciencias de la Tierra de la Universidad de Extremadura y que una vez revisada la Memoria presentada, como Directora del trabajo considero que posee las condiciones requeridas para ser defendida como Tesis Doctoral. Por todo ello, autorizo su presentación y defensa frente al tribunal designado al efecto.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente informe en Badajoz a 13 de Julio de 2015.

Fdo: M<sup>a</sup> del Carmen Gómez Jiménez



# Índice





# Índice

---

Resumen	1
Abstract	2
Abreviaturas	3
<b>1. Introducción</b>	<b>9</b>
1.1. Abscisión	11
1.2. Maduración del fruto	41
1.3. Transportadores ABC	47
1.4. Melón	56
<b>2. Objetivos</b>	<b>67</b>
<b>3. Material y métodos</b>	<b>71</b>
3.1. Material	73
3.2. Métodos	74
<b>4. Resultados y discusión</b>	<b>85</b>
4.1. Caracterización morfológica de la ZA del fruto	87
4.2. Secuenciación masiva del transcriptoma de la ZA	94
4.3. Expresión de genes relacionados con abscisión	135
4.4. Análisis de la expresión de transportadores ABC durante la maduración y post-cosecha del fruto	197
<b>5. Conclusiones</b>	<b>213</b>
<b>6. Bibliografía</b>	<b>219</b>



## Resumen

---

El conocimiento de los mecanismos implicados en la abscisión del fruto es esencial para desarrollar estrategias de control y mejora de la recolección de la cosecha o la pérdida indeseada de frutos. No obstante, los avances en los análisis moleculares sobre la abscisión de frutos carnosos han estado limitados por la falta de material genético experimental apropiado y por la pequeña cantidad de células de la zona de abscisión disponibles en la especie modelo para estos análisis. En particular, la abscisión del fruto maduro es un proceso fisiológico programado genéticamente y controlado mediante mecanismos que, contrariamente a la abscisión del fruto inmaduro, no han sido caracterizados completamente en ninguna especie de frutos carnosos. En el presente trabajo, se han incluido estudios anatómicos de la zona de abscisión y se ha realizado un análisis transcripcional a gran escala del proceso de abscisión del fruto en melón mediante secuenciación 454 que nos ha permitido identificar genes candidatos y rutas asociadas con la activación de este proceso, constituyendo un análisis detallado disponible de la actividad transcripcional de dicho proceso en melón. La utilización conjunta de la caracterización fisiológica y molecular nos ha permitido proponer un modelo de control del proceso de la abscisión del fruto que podría ser útil para mejorar el cultivo.

# Abstract

---

The knowledge of mechanisms involved in fruit abscission is essential for developing strategies to control and improve the yield or undesired loss of fruit. Nevertheless, the advances in the molecular analyses of fleshy-fruit abscission have been limited by the lack of suitable experimental genetic material and by the small amount of cells in the abscission zone available in the model species for such analyses. In particular, mature-fruit abscission is a programmed physiological process that is genetically programmed and controlled by mechanisms which, as opposed to immature fruit abscission, have not been characterized completely in any species bearing fleshy fruits. The present work has included anatomical studies of the abscission zone and a transcriptomic analysis of the AZ was made using 454 pyrosequencing in melon, which has enabled the identification of potential agents and pathways associated with the induction of this process, constituting the detailed analysis of the transcriptional activity of the process of abscission in melon. The joint use of physiological and molecular characterization has led to the proposal of a model for the control of the abscission process, which could prove useful in improving melon yield.

# Abreviaturas



# Abreviaturas

---

## A

ABA	Ácido abscísico
ABC	ATP-binding cassette
ABF3	Factor de transcripción
ABRE	Elemento de respuesta a ABA
ACC	1-aminociclopropano-1-carboxilato
ACS	ACC sintasa
ACO	ACC oxidasa
AEC	Transportador de eflujo de auxina
AGL	<i>AGAMOUS</i> -like
AIC	Transportador de influjo de auxina
AOH	ABCA One Homologue
AP	Activating protein
ARF	Auxine Response Factor
ARF-GAP	GTPasa activadora del factor de ribosilación del ADP
ARID	AT-rich interaction domain
ATH	Arabidopsis Thaliana Homeobox Gene / ABCA Two Homologue
ATM	ABC transporter of the mitochondria
AVG	Aminoetoxivinilglicina

## B

BA	Benziladenina
BAK	BRI associated kinase
BES1	Factor de transcripción
bHLH	basic helix-loop-helix; Factor de transcripción
BOP	Blade on petiole
BP	<i>BREVIPEDICELLUS</i>
BR	Brasinoesteroides
BRI	Brasinoesteroid insensitive
bZIP	Basic Leucine Zipper
BZR	Brasinazol resistant

## C

Cad	Cadaverina
CALS	Calosa sintasa
CBL	Casitas B-lineage Lymphoma
CDPK	Proteína quinasa dependiente de calcio
CEL	Celulasa
CIPK	Proteína serin/treonin quinasa que interactúa con CBL
CMNP	5-cloro-3-metil-4-nitro-1-pirazol
CNR	Colorless non-ripening
CPL	C-Terminal Domain Phosphatase-Like
CQ	Citoquinina
CST	<i>CASTAWAY</i>
CTR	Constitutive triple response

## D

DAB	Delayed abscission
DAO	Diamina oxidasa
DPA	Días post-antesis
DOF	DNA binding with One Finger
DRE	Factor de transcripción
DZ	Dedos de zinc

## E

EC	<i>Enzyme Comission Numbers</i>
EDF	Ethylene Response DNA Binding Factors
EG	Endo-1,4- $\beta$ -D-glucanasa
EIL	<i>EIN3-like</i>
EIN	Ethylene insensitive
ERF	Factor de respuesta a etileno
ETR	Ethylene receptor
ET	Elemento transponible
EXP	Expansina
EVR	<i>EVERSHED</i>
<b>F</b>	
FLC	<i>FLOWERING LOCUS C</i>
FT	Factor de transcripción
FYF	<i>FOREVER YOUNG FLOWERS</i>
<b>G</b>	
GA	Giberelina
GAI	<i>Gibberellin insensitive</i>
GAP	Proteína activadora de GTPasa
GATA	Factor de transcripción
GF	Green flesh
GH3	Gretchen Hagen 3
GO	Gene Ontology
GR	Green ripe
<b>H</b>	
HAE	<i>HAESA</i>
HP1	High pigment 1
HP2	High pigment 2
HSL2	<i>HAESA-LIKE 2</i>
H XK	Hexoquinasa
HY5	Factor de transcripción
<b>I</b>	
IAA	ácido 3-indolacético
IDA	<i>INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION</i>
IDL	IDA-like
IWS1	Factor de transcripción
<b>J</b>	
JA	Jasmonic acid
JAZ	Jasmonate ZIM-domain
<b>K</b>	
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database</i>
KNAT	Knotted1-like TALE
KNOX	Knotted1-like homeobox, factor de transcripción
<b>L</b>	
LOX	Lipoxigenasa
LS	<i>LATERAL SUPPRESSOR</i>
LRR-RLK	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinases
LX	Ribonucleasa
LTP	Proteína Transferidora de Lípidos
<b>M</b>	
MAP	Proteína activada por mitógenos
MCP	Muerte celular programada
1-MCP	1-metilciclopropeno
MDR / p-GP	Multidrug Resistance / p-glycoprotein
MPK	Proteín quinasa activada por mitógenos



MRP	Multidrug resistance associated protein
MYB	Myeloblastosis – factor de transcripción
MYC	Factor de transcripción
<b>N</b>	
NAA	Ácido naftaleneacético
NBD	Nucleotide binding domain
NCED	9-Cis-EpoxiCarotenoide Dioxigenasa
NOR	non-ripening
NPH	Nucleoside triphosphate phosphohydrolase
NR	Never ripe
<b>O</b>	
ODC	Ornitina descarboxilasa
<b>P</b>	
PA	Poliaminas
PAL	Phenylalanine ammonia-lyase
PAO	Poliamina oxidasa
PDR	Pleiotropic drug resistance
PE	Pectinesterasas
PG	Poligalacturonasas
PIN1	Auxin Efflux Carrier; Transportador de salida de auxinas
PL	Pectatoliasa
PLA2	Fosfolipasa A2
PP2C	Fosfatasa de tipo 2C
PR	Proteína relacionada con patogénesis
Put	Putrescina
<b>Q</b>	
QTL	Quantitative trait locus
RAN	Ras-related Nuclear protein
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RIN	Ripening-inhibitor
RLI1	RNase L inhibitor
RLK	Receptor like kinase
ROS	Especies reactivas del oxígeno
<b>S</b>	
SA	Ácido salicílico
SAM	S-adenosilmetionina
SAMDC	S-adenosilmetionina descarboxilasa
SAUR	Small auxin upregulated RNA
SCL	Factor de transcripción
SCR	<i>SCARECROW</i>
SEM	Scanning electron microscope - microscopía electrónica de barrido
SEP	<i>SEPALLATA</i>
SERK1	<i>SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE 1</i>
SH	Shattering
SHP	<i>SHATTERPROOF</i>
Snrk	quinasa relacionada con SNF1
SPB	<i>SQUAMOSA PROMOTOR BINDING</i>
Spd	Espermidina
SPDS	Spd sintasa
Spm	Espermina
STK	<i>SEEDSTICK</i>
S6PDH	D-sorbitol-6-fosfato deshidrogenasa
<b>T</b>	
TAP	Transporter associated with antigen processing

TBN	Taube nuss
TDR	Tapetum Degeneration Retardation
TGA	Factor de transcripción
TIR	<i>TRANSPORT INHIBITOR RESISTANT</i>
TKN	Tachykinins
TMD	Transmembrane domain
TPS	Trehalosa-6-fosfato isomerasa
TSS	Transcription Start Sit
<b>W</b>	
WAK	Quinasa asociada a pared
WBC	White-brown complex homologue
WRKY	Factor de transcripción
<b>X</b>	
XTH	Xiloglucano endotransglucosilasa
<b>Z</b>	
ZA	Zona de abscisión
ZFP	<i>ZINC FINGER PROTEIN</i>

# **Introducción**



# Introducción

---

## 1.1. Abscisión

### 1.1.1. Generalidades

Durante su ciclo de vida, las plantas experimentan diferentes procesos que implican separación celular. Esta separación se produce mediante la disolución de materiales de adhesión celular y la descomposición de paredes celulares en lugares específicos (Roberts y González-Carranza, 2007). La abscisión permite tanto a órganos vegetativos (yemas y hojas) como a reproductivos (partes de flores, flores enteras, ovarios, semillas maduras y frutos en desarrollo o maduros) separarse en respuesta a señales del desarrollo, hormonales o ambientales (Addicott, 1982; Leslie y cols., 2007; Osborne y Morgan, 1989; Roberts y cols., 2002; Sexton y Roberts, 1982; Taylor y Whitelaw, 2001).

La abscisión es un proceso clave en los programas reproductivos de las plantas, ya que hace posible la caída de frutos maduros y la liberación y dispersión de semillas. Desde un punto de vista evolutivo, la abscisión de frutos y semillas es un proceso altamente ventajoso. Sin embargo, en un contexto agrícola, la abscisión es un factor limitante en la productividad de los cultivos (Zhang y cols. 2015). De hecho, los primeros agricultores seleccionaron cultivares de vegetales que estaban afectados en ciertas características agronómicas, incluyendo una reducida abscisión de frutas y semillas (Gross y Olsen, 2010). La domesticación de los hábitos de abscisión de órganos aún se persigue. Algunos ejemplos en esta dirección son las variedades de tomate *jointless* y las variedades tardías de naranja dulce.

Las variedades de tomate *jointless* se caracterizan por un desarrollo defectuoso del pedúnculo del fruto (Mao y cols., 2000). Esta característica permite una cosecha rápida y fácil ya que el cáliz queda unido a la planta lo que también previene lesiones a otros frutos en los contenedores de recogida (Zahara y Scheuerman, 1988). En las variedades tardías de naranja dulce, la disminución en la fuerza de retención del fruto está retrasada durante el periodo de maduración respecto a las variedades tempranas y de media temporada, las cuales son propensas a sufrir caídas de frutos antes de la cosecha (Gallasch, 1996). Por tanto, la recolección de variedades tardías de naranja dulce y la temporada de comercialización incrementan los beneficios para los cultivadores y la industria.

## *Introducción*

Una estrategia evolutiva que favorece la reproducción de las plantas es la producción de un gran número de flores, lo que asegura que un número suficiente de frutos completen su desarrollo y produzcan semillas maduras. Muchos árboles frutales (manzana, albaricoque, aguacate, cereza o cítricos) muestran este comportamiento (Sexton, 2001). Posteriormente, un gran número de flores y frutos jóvenes se caen durante el periodo de fructificación (caída fisiológica) ya que el árbol retiene solo a aquellos a los que puede nutrir y mantener hasta la madurez. Demasiada abscisión resulta en una producción pobre de frutos, pero demasiado poca puede resultar en un gran número de frutos con una calidad demasiado baja para el mercado debido a su pequeño tamaño. Además, menos abscisión en una temporada resulta en una menor inducción de botones florales durante la siguiente floración o incluso fructificaciones no consecutivas (Bangerth, 2000). Para solucionar este problema y conseguir frutos de alta calidad y producciones regulares, la sobreproducción de flores y frutos jóvenes se eliminan de los árboles a mano o usando tratamientos químicos.

La recolección de fruta es tradicionalmente realizada a mano, pero el incremento en el coste de la mano de obra necesaria para recoger grandes cantidades de fruta en actividades de agricultura intensiva ha aumentado el interés por la recolección mecánica. Sin embargo, estos sistemas de cosecha presentan inconvenientes asociados con la recogida ineficiente de la fruta y daños a la fruta y a los troncos (Li y cols., 2011).

Se han probado varios químicos desencadenantes de la abscisión para reducir la fuerza mecánica aplicada durante la cosecha y mejorar así su eficiencia minimizando el daño al árbol. El etephon (ácido 2-cloroetil fosfónico) es usado en cereza para inducir la abscisión en la zona de abscisión (ZA) del pedicelo en fruta madura para facilitar la recolección mecánica (Bukovac, 1979), mientras que en cítricos, el CMNP (5-cloro-3-metil-4-nitro-1-pirazol) es el único químico testado que selectivamente afloja la fruta madura aplicándolo a una dosis concreta (Burns y cols., 2005).

Un mayor conocimiento sobre los mecanismos que conducen a la abscisión ayudaría a regular la producción de cultivos y a mejorar las prácticas culturales actuales. La investigación molecular podría ayudar a encontrar nuevos marcadores moleculares, útiles para la mejora genética.

### 1.1.2. Eventos de separación celular en la zona de abscisión

Los eventos de separación celular durante la abscisión ocurren en un grupo de células funcionalmente especializadas conocidas como zona de abscisión (ZA). Esta zona se desarrolla muy pronto, a la vez que los órganos laterales formados a partir del meristemo apical del tallo (Addicott, 1982; Osborne y Morgan, 1989; Roberts y cols., 2002; Sexton y Roberts, 1982; Taylor y Whitelaw, 2001). Esta zona es la ZA primaria, en oposición a las llamadas ZA adventicias o secundarias que se forman posteriormente al desarrollo de órganos laterales (Addicott, 1982).

La ZA primaria se desarrolla en posiciones bien definidas de la planta, generalmente en el límite entre la zona de separación del órgano y la planta. Este es el caso de la ZA de órganos florales y semillas en *Arabidopsis thaliana* (Khan y cols., 2014), de flores de melocotón (Zanchin y cols., 1995) o de hojas de cítricos (Estornell y cols., 2013). Sin embargo existen excepciones, como las de las ZA situadas en el extremo proximal o distal dentro del pedicelo de la flor de tomate y cítricos respectivamente (Ito y Nakano, 2015; Tadeo y cols., 2008).

En general, el fenómeno de abscisión en plantas perennes afecta principalmente a órganos vegetativos y reproductivos, mientras que en plantas anuales como *Arabidopsis*, afecta a órganos florales y semillas únicamente. Sin embargo, en la base de los pedúnculos de las flores, de los tallos de las inflorescencias y de las hojas caulinares de *Arabidopsis*, que no sufren abscisión, se pueden observar células con las características típicas de células de la ZA (McKim y cols., 2008; Stenvik y cols., 2006). Estos tipos de ZA son conocidos como ZAs vestigiales. Sorprendentemente, estas ZAs mantienen la expresión de genes relacionados con la abscisión encargados de la diferenciación y activación de la ZA (Cho y cols., 2000; Douglas y cols., 2002; Gomez-Mena y Sablowski, 2008; Jinn y cols., 2000; Norberg y cols., 2005; Ragni y cols., 2008).

Las células de la zona de abscisión son claramente distinguibles morfológica y anatómicamente de sus células vecinas, ya que son más pequeñas, tienen un citoplasma más denso y están interconectadas por plasmodesmos (Addicott, 1982; Osborne y Morgan, 1989; Sexton y Roberts, 1982). Estas características sugieren que estas células podrían haberse detenido en un estado indiferenciado (van Nocker, 2009) El número de capas de células de la ZA es muy variable. Por ejemplo, la ZA localizada entre la unión del peciolo con el pulvino de la hoja primaria de *Phaseolus vulgaris* consiste en una sola capa de

células (Wright y Osborne, 1974), mientras que la ZA de *Sambucus nigra* contiene 20-30 capas (Osborne y Sargent, 1976).

Los procesos fisiológicos que conducen a la separación celular dentro de las ZAs de muchas capas están restringidos a una estrecha banda de células conocida como capa de separación (Addicott, 1982), esta capa comprende normalmente de 1 a 5 células de grosor (Niederhuth y cols. 2013). Las ZAs no están necesariamente activas durante la vida completa del órgano. En melocotones inmaduros, la abscisión depende de la activación secuencial de 3 ZAs durante el periodo de cuajado (Nascio y cols., 1985). En cítricos inmaduros la abscisión también toma lugar en dos ZAs diferentes, una localizada en el pedúnculo y otra localizada en el cáliz entre el pericarpo de la fruta y el nectario o disco floral. Durante el periodo de crecimiento temprano del fruto, la primera se va volviendo progresivamente inoperativa, mientras que a su vez, la segunda se va activando gradualmente (Tadeo y cols., 2008).

No todas las células de la ZA someten sus paredes a disolución durante la abscisión, por lo que se supone que ocurren eventos específicos de expresión génica y actividades enzimáticas en regiones celulares específicas dentro de la ZA. Se ha sugerido que genes asociados a muerte celular programada (MCP), a remodelación de pared celular y a biosíntesis de etileno, se expresan asimétricamente en la ZA del pedúnculo de tomate (Bar-Dror y cols., 2011). Entre ellos se ha observado una expresión asimétrica de una nucleasa asociada a MCP (TBN1), una celulasa (Cel1) y una ACC sintasa (ACS) (Estornell y cols., 2013), además, también ha sido observada la expresión asimétrica de poligalacturonasas en la ZA del pedicelo de tomate (Qi y cols., 2014)

La utilización de plantas transgénicas, unido a la aplicación de técnicas que permitan la selección de tipos celulares específicos de ZA como la microdissección o la clasificación de células podrían ser de gran utilidad para confirmar esta nueva contribución a la abscisión. La abscisión de órganos y la dehiscencia de anteras y silicuas están caracterizadas por la diferenciación de tejidos donde se producirá la separación efectiva de las células. Esta característica común de la abscisión y la dehiscencia sugiere que podrían existir mecanismos comunes y conservados que regulen ambos procesos de separación celular. El control de la dehiscencia de anteras y silicuas en *Arabidopsis* ha sido muy investigado y han sido identificados un gran número genes clave relacionados con estos procesos (Lewis y cols., 2008; Wilson y cols., 2011).



Al igual que *Arabidopsis*, cereales como el maíz y el arroz no muestran abscisión de hojas. En estas plantas, la lámina de la hoja se articula con la vaina a través de la región ligular. El desarrollo de esta región ligular requiere una precisa coordinación de eventos de formación de patrones en diferentes tejidos (Becraft, 1990). Una posibilidad es que el desarrollo normal en distintos dominios límites de las hojas como la hoja/peciolo o la hoja/vaina podría involucrar rutas similares que en el desarrollo de límites laterales de órganos. Un gran número de mutantes con alteraciones morfológicas en el dominio del límite hoja/vaina han sido identificados en maíz y arroz y la caracterización de genes involucrados en estos fenotipos ha sido realizada (Becraft, 1990; Freeling y Hake, 1985; Walsh, 1998; Lee y cols., 2007).

#### **1.1.2.1. Etapas del proceso de abscisión**

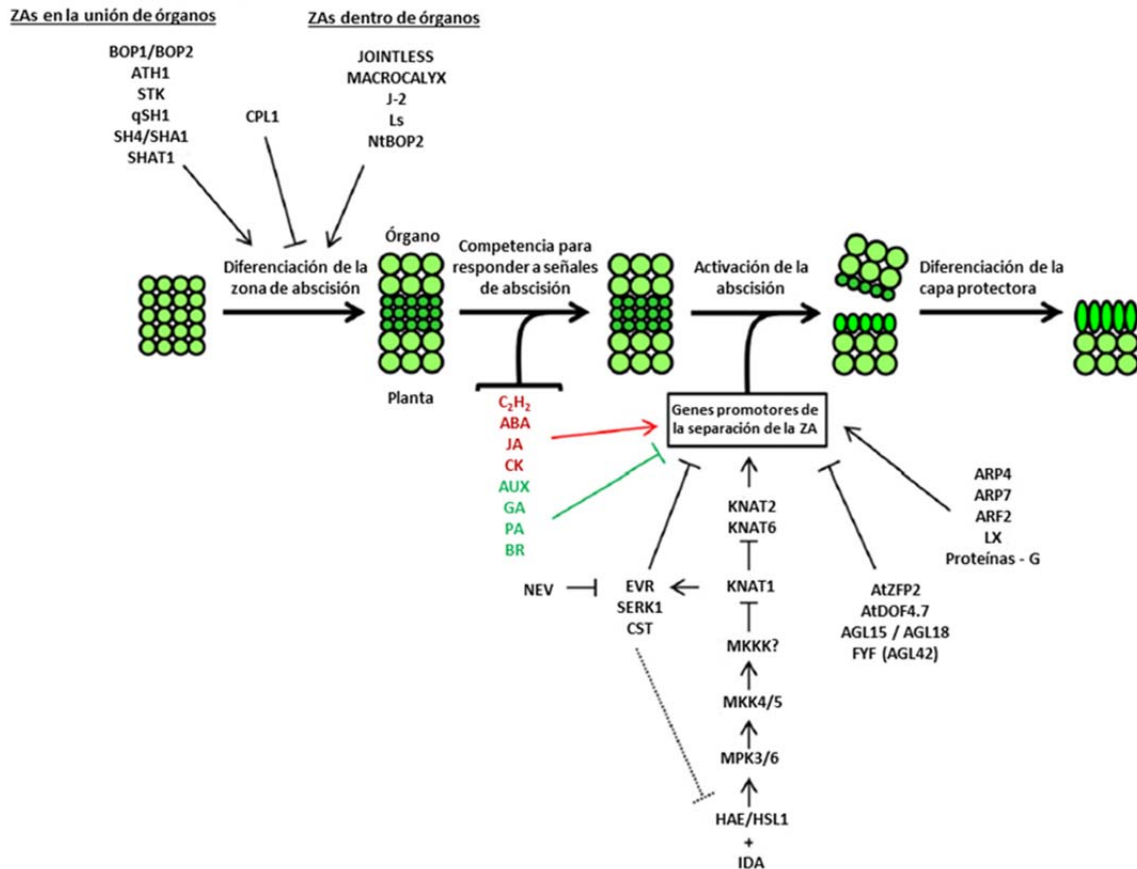
El modelo actualmente aceptado de abscisión define cuatro etapas principales en el proceso (Patterson, 2001):

1. Diferenciación de la ZA en el futuro sitio de separación del órgano
2. Adquisición por las células de la ZA de competencia para reaccionar a las señales de abscisión
3. Activación del proceso de abscisión en la ZA y separación del órgano
4. Diferenciación de una capa protectora sobre la superficie de la capa de separación en el lado de la planta (Fig.1).

El proceso de abscisión está regulado por gran cantidad de señales ambientales y del desarrollo. Entre ellas, son de principal importancia los efectos reguladores de las hormonas vegetales. De manera general, hormonas como el etileno, ABA, ácido jasmónico y en algunas circunstancias, citoquininas, actúan como señales aceleradoras de abscisión (Taylor, 2001; Dal Cin y cols., 2007; Hartmond y cols., 2000; Sipes y Einset, 1983), mientras, otras como las auxinas, giberelinas, poliaminas y brasinoesteroides actúan como señales inhibitoras de la abscisión (Taylor, 2001; Aziz, 2003; Ben-Cheikh y cols., 1997; Khripach y cols., 1999; Parra-Lobato y Gomez-Jimenez, 2011; Stutte y Gage, 1990) (Fig. 1). La abscisión es un proceso fisiológico que muchas veces está relacionado con el estrés y la senescencia (Addicott, 1982).

En general, se piensa que el órgano distal percibe una situación de estrés (sequía, salinidad, temperaturas extremas, baja irradiación o ataque de patógenos), entra en

senescencia y genera la señal de abscisión que se dirige hacia la ZA activando la abscisión. Sin embargo, en algunos casos como cuando son aplicados químicos inductores de abscisión, la senescencia del órgano y la activación de la abscisión ocurren simultáneamente. La respuesta de los órganos vegetales al estrés y la senescencia está mediada por hormonas que también participan en la activación de las células de la ZA (Estornell y cols, 2013).



**Figura 1.** Representación esquemática mostrando los factores moleculares que intervienen en el desarrollo y activación de la ZA. La primera etapa del proceso está relacionada con la diferenciación de un tejido especializado que permite la abscisión, la ZA está representada por los círculos pequeños. Varios factores de transcripción que pertenecen a diferentes familias génicas están involucrados en la ontogenia de la ZA. Una vez que la ZA está diferenciada, las células de la ZA deben adquirir competencia para responder a factores ambientales y del desarrollo que activan la abscisión. La respuesta de las células de la ZA a las señales internas y externas podría estar mediada por fitohormonas que regulan la abscisión modulando la expresión de genes relacionados con abscisión durante la fase de activación. Un amplio conjunto de genes que codifican factores de transcripción están asociados con el control de la separación celular en la ZA. El último paso de la abscisión comprende la diferenciación de una capa protectora sobre la superficie de separación del órgano que permanece en la planta (ABA = ácido abscísico, AUX = auxina, BR = brasinoesteroides, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> = etileno, CK = citoquinina, GA = giberelina, JA = ácido jasmónico, PA = poliaminas. (Adaptado de Estornell y cols., 2013).

El sistema de señalización hormonal vegetal está basado en actividades de síntesis e inactivación de rutas hormonales y en el transporte de hormonas dentro y entre células (la ZA es rica en conexiones de plasmodesmos entre células) y también entre órganos de la planta. Las hormonas y sus precursores metabólicos pueden moverse grandes distancias a

través del xilema y el floema para comunicar órganos y activar respuestas influyendo en la actividad de las ZAs. Por ejemplo, el establecimiento de condición de estrés por encharcamiento en cítricos induce la expresión de genes biosintéticos de ácido abscísico (9 - cis - epoxicarotenoide dioxigenasa CcNCED3) y el incremento en los niveles de ABA en raíces (Agustí *et al.*, 2007; Gomez-Cadenas *et al.*, 1996). A su vez, el aumento en ABA promueve la síntesis y acumulación de ácido 1 - aminociclopropano - 1 - carboxílico (ACC) mediante la estimulación de la actividad ACC sintasa en raíces (Tudela y Primo-Millo, 1992), esto es facilitado por el bloqueo del flujo del xilema inducido por estrés hídrico. Tras la rehidratación de la planta, el flujo del xilema es restaurado y el ACC es transportado desde raíces a hojas donde se metaboliza a etileno y produce la abscisión de la hoja. Así, la síntesis de ABA promovida por estrés hídrico en raíces activa la producción de etileno en hojas causando su caída. Condiciones ambientales adversas incluyendo baja radiación (sombra), sequía, temperaturas extremas y ataque de patógenos interfieren con la asimilación de carbonos y/o respiración, causando privación de energía (Baena-Gonzalez y Sheen, 2008). Ha sido demostrado que el estrés por falta de carbohidratos provoca la activación de la abscisión de órganos (Li y cols., 2015). La competencia por fotoasimilados entre los órganos en crecimiento activo provoca condiciones de estrés nutricional y de déficit de energía. Por lo tanto, es probable que las señales derivadas de la privación de energía pudieran participar junto a hormonas en la ruta de señalización que da lugar a la activación de ZAs. En cítricos, la manipulación del suministro de azúcar disponible para el desarrollo de frutos a través de defoliación estimula el brote de yemas, incrementando así la competencia por carbohidratos entre brotes y frutos y activando la abscisión de frutos (Gomez-Cadenas y cols., 2000). La defoliación provoca un descenso de la concentración de azúcar soluble (glucosa y sacarosa) en frutos. Además, se produce un incremento secuencial en el nivel de ABA y ACC en frutos antes del comienzo de la abscisión. Así, el ABA parece actuar como mediador entre la defoliación inducida por estrés de nutrientes y el ACC, el precursor inmediato del etileno, el cual, una vez metabolizado a etileno, induce la abscisión de frutos. Esta misma respuesta ha sido observada recientemente en Lichi (Li y cols., 2015).

En manzanos, el tratamiento en dosel con la citoquinina benziladenina (BA) incrementa la abscisión de frutos jóvenes ya que aumenta la competencia entre los brotes y las infrutescencias, debido a la estimulación del crecimiento vegetativo (Dal Cin y cols., 2007). El tratamiento con BA induce la expresión de genes de biosíntesis de etileno (principalmente ACC oxidasa, MdACO1), y provoca un incremento transitorio en la producción de etileno en frutos jóvenes con una alta probabilidad de abscisión (Dal Cin y

cols., 2007; Botton y cols., 2011). Nakano y cols (2013) observaron la represión de genes relacionados con la degradación de citoquininas durante la abscisión de tomate.

Basado en un estudio transcripcional a gran escala de la respuesta a BA en la corteza del fruto y en el desarrollo de semillas de manzanas jóvenes persistentes y en abscisión, se sugirió un hipotético modelo de abscisión de frutos (Botton y cols., 2011): El efecto de BA sobre frutos jóvenes parece ser percibido primero por los tejidos corticales del fruto y termina alcanzando las semillas en desarrollo. El transcriptoma de tejido cortical de fruto muestra principalmente una regulación de genes asociada a privación de energía (trehalosa-6-fosfato sintasa y asparragina sintetasa), producción (estallido respiratorio NADPH oxidasa) y detoxificación (peroxidasa) de especies reactivas del oxígeno, y la inactivación de señalización de giberelinas (GA-2oxidasa) citoquininas (citoquinina deshidrogenasa) ABA (proteín quinasa activada por AMP y MAP kinasa) y etileno (ERFs). Se hipotetizó que el etileno generado dentro de la corteza del fruto podría difundir a las semillas en desarrollo llevando la señal de abscisión y afectando a la expresión génica. El transcriptoma de semillas en desarrollo muestra principalmente una disminución de la expresión de genes asociados con embriogénesis (Seedstick/AGL11) y desarrollo de semillas y un aumento de expresión de genes que participan en la regulación de ABA (homeobox-Leu zipper) y etileno (ERF) sugiriendo el comienzo de la degeneración de la semilla (Botton y cols. 2011). Como las semillas en desarrollo son fuentes importantes de auxina, también se hipotetizó que una reducción del suministro de auxina desde las semillas en degeneración a la ZA del fruto mejoraría su sensibilidad al etileno, activando la maquinaria celular involucrada en el desensamblaje de la pared celular y la abscisión.

La aplicación de ciertos químicos como el CMNP estimula la abscisión de cítricos. Este efecto está también asociado con la privación de la energía y cambios en la homeostasis celular. El tratamiento en dosel con CMNP causa daños en la piel de la fruta y estimula la producción de etileno por heridas y la abscisión de frutos. Se ha observado que el tratamiento con CMNP es altamente efectivo reduciendo la fuerza de fijación del fruto a la zona de abscisión del cáliz cuando el balance de auxina respecto al ABA en la piel de las frutas es bajo. El CMNP actúa como un desacoplador en la mitocondria y el cloroplasto reduciendo el contenido en ATP en la piel de cítricos (Alferez y cols., 2005). Tras su aplicación se produce un aumento de actividad de enzimas como la fosfolipasa A2 y la lipoxigenasa, relacionadas con la señalización de lípidos (Xie y cols., 2013). Aplicado a plantas de Arabidopsis, el CMNP incrementa la expresión génica asociada con estrés y

energía celular (trehalosa-6-fosfato sintasa) y otros genes relacionados a anoxia, senescencia y detoxificación en hojas (Alferez y cols., 2007).

El etileno desempeña un importante papel como regulador positivo de la abscisión, acelera la senescencia y aumenta bajo estrés ambiental (Brown, 1997; Jackson y Osborne, 1970). El tratamiento con etileno aumenta la abscisión de hojas, flores y frutos mientras que tratamientos con inhibidores de la biosíntesis de etileno retrasan la abscisión (Wang y cols., 2013). El etileno activa la expresión de genes que codifican enzimas remodeladoras de la pared celular y de secreción (Addicott, 1982; Sexton y Roberts, 1982; Brown, 1997; Brummel, 1999; del Campillo y Bennett, 1996). Sin embargo, estudios con mutantes de *Arabidopsis* carentes de percepción a etileno (*etr1 -1*) y señalización (*ein2*) mostraron que la abscisión era retrasada pero se seguía produciendo lo que puede significar que el etileno podría regular su ritmo en lugar de inducirla directamente (Niederhuth y cols., 2013).

En tomate, varios mutantes afectados en la función del receptor del etileno y la sensibilidad a etileno como *Never ripe (Nr)* y *Sletr1-1* han sido aislados (Lanahan y cols., 1994; Okabe y cols., 2011). Todas estas mutaciones son mutaciones genéticas individuales semidominantes que provocan un retraso en la madurez de los frutos y la abscisión de órganos. Las plántulas de los mutantes *Nr* responden a bajas concentraciones de etileno (1 ppm) (Lanahan y cols., 1994) mientras los mutantes *Sletr1-1* no muestran respuesta a 10 ppm de etileno (Okabe y cols., 2011) lo que sugiere que la insensibilidad de etileno en *Sletr1-1* se parece al mutante *Arabidopsis etr1-1*, una mutación completamente insensible a etileno.

Una ruta etileno - independiente que participa en la regulación de la abscisión de órganos ha sido propuesta en *Arabidopsis* (Bleecker y Patterson, 1997) y varios mutantes con abscisión retrasada (*dab*) que exhiben una respuesta normal a etileno han sido identificados (Patterson y Bleecker, 2004). Esta ruta etileno - independiente reguladora de la abscisión podría ser operativa también en tomate. Se ha sugerido que el efecto del etileno sobre la expresión génica podría ser dependiente del tejido (Lincoln, 1987; Riechmann y Meyerowitz, 1998). Además, no puede ser descartado que el efecto del etileno en la abscisión floral pudiera ser realizado por proteínas específicas de abscisión diferentes a los receptores de clase I de etileno y EIN2 en lugar de por los intermediarios de una ruta etileno - independiente.

## Introducción

El conocimiento de los mecanismos hormonales que establecen el momento y la progresión de la abscisión de órganos se basó en una correlación positiva entre la senescencia de órganos, los niveles de auxina en órganos y la abscisión (Addicott, 1982).

Se observó que la aplicación de auxina en el extremo distal de explantos de ZA retrasaba la abscisión, mientras que si se aplicaba en el lado proximal se aceleraba (Addicott y Lynch, 1951) sugiriendo que los cambios en el gradiente de auxina podrían señalar el comienzo de la senescencia y abscisión (Addicott y Lynch, 1955).

Además, la interacción de la auxina con otras hormonas, especialmente con etileno ha sido también demostrada (Sexton y Roberts, 1982; Taylor y Whitelaw, 2001). La adquisición de sensibilidad a etileno por las células de la ZA fue estudiada utilizando explantos de ZA de flores de tomate y se asoció con una expresión alterada de genes regulados por la reducción de auxina. El momento y nivel de abscisión en la ZA de pedicelo de tomate dependen de la presencia o ausencia de flores sobre los explantos. En presencia de flores, el tratamiento con etileno estimula la abscisión aunque esta respuesta está altamente atenuada en explantos florales del mutante de tomate *Nr* mostrando una abscisión más lenta (Tucker y cols., 1984). La eliminación de flores produce un incremento rápido y transitorio en la producción de etileno durante las primeras 4 h y estimula la abscisión del pedicelo (Roberts y cols., 1984). La abscisión de la ZA del pedicelo comienza entre 6 y 10 h después de la eliminación de las flores dependiendo de la variedad de tomate (Roberts y cols., 1984; Meir y cols., 2010).

El tratamiento con inhibidores de la biosíntesis de etileno como amino-etoxivinil glicina (AVG) previo a la eliminación de flores reduce la producción de etileno y retrasa su abscisión. El efecto de IAA depende de su concentración, previene la abscisión del pedicelo a altas concentraciones (10<sup>-3</sup>M) (Roberts y cols., 1984; Meir y cols., 2010). El transcriptoma de la ZA del pedicelo muestra un aumento de expresión de genes que codifican enzimas remodeladoras de pared celular, de biosíntesis de etileno, proteínas de transducción de señales, FTs (familias génicas bZIP, MADS – box y WRKY) y una disminución de la expresión de genes que codifican Aux/IAA y factores de transcripción KNOX durante las primeras 14 h después de la eliminación de las flores (Meir y cols., 2010). Recientemente ha sido observado que un descenso de auxina proporciona la primera señal para la abscisión, dando lugar a la disminución de genes inducidos por esta hormona (como Aux/IAA y otros factores de transcripción) y observándose a su vez el aumento de expresión de genes reprimidos por auxina, confiriendo sensibilidad a etileno y competencia para la abscisión a células de la ZA (Ito y Nakano, 2015). Además, en uva se

ha observado que un mayor transporte de auxina desde las flores y los frutos provoca un descenso en la sensibilidad a etileno (Kühn y cols., 2014).

El tratamiento de explantos de ZA con 1-MCP provoca un retraso en la abscisión que está caracterizado por el bloqueo de hidrolasas de pared celular, biosíntesis de etileno, transducción de señales y FTs. La prevención de la abscisión causada por IAA también bloquea la disminución de expresión de Aux/IAA y los FTs KNOX sugiriendo la posibilidad de que la adquisición de sensibilidad a etileno en la ZA está asociada con una expresión alterada de genes regulados por auxina como resultado de una disminución de esta (Meir y cols., 2010).

Otra posible conexión entre auxina, etileno y abscisión retrasada proviene del análisis genético de los mutantes de *Arabidopsis* defectivos en varios miembros de la familia génica ARF (Auxine Response Factor). El comienzo de la senescencia y abscisión de órganos florales está retrasada en mutantes *arf2* pero no en *arf1*, *nph4/arf7* ni *arf19* (Ellis y cols., 2005). Sin embargo, este efecto está aumentado en los dobles mutantes *arf1* y *arf2* y en triples mutantes *arf2*, *nph4/arf7* y *arf19*. Esto sugiere que la auxina se encuentra involucrada en abscisión a través de estos cuatro FTs ARF. Se ha observado que ARF1 y ARF2 reprimen la transcripción, mientras que NPH4/ARF7 y ARF19 la estimulan (Tiwari y cols., 2003; Ulmasov y cols., 1999). El mecanismo de cómo estos FTs regulan la abscisión de órganos florales necesita ser aclarado. Además, la expresión de genes Aux/IAA en ZAs de órganos está reprimida en mutantes *arf1* pero no en mutantes *arf2* (Ellis y cols., 2005) y la expresión global de genes regulados por auxina en plántulas no está afectada en mutantes *arf2* (Okushima y cols., 2005). Esto sugiere que ARF2 no participa en la señalización de auxina de una manera general y que la función de ARF2 probablemente implica mecanismos adicionales diferentes al modelo de respuesta a auxina.

Por otro lado, la expresión de genes de biosíntesis de etileno ACS2, ACS6 y ACS8 se observó en ZAs de órganos florales en flores de *Arabidopsis* tras la polinización (Yamagami y cols., 2003), pero la expresión de estos tres genes ACS se encuentra suprimida en flores mutantes de *arf2* (Okushima y cols., 2005) lo que sugiere que el efecto de ARF2 en abscisión podría estar unido al etileno. Sin embargo, el doble mutante *arf2*, *ein2* muestra un efecto aditivo de retraso en la abscisión del órgano floral indicando que el efecto de ARF2 en abscisión es independiente de etileno (Ellis y cols., 2005).

## *Introducción*

En resumen, el mecanismo molecular de la acción de auxina y la interacción entre auxina y etileno en la abscisión de órganos no están del todo claros aún. La auxina podría ser capaz de promover la abscisión por inducción de la producción de etileno. En orquídeas, la auxina es necesaria para el crecimiento de los ovarios tras la polinización y desencadena la síntesis de etileno para iniciar la senescencia del órgano floral (Zhang y O'Neill, 1993). En clavel, tratamientos de auxina imitando a la polinización inducen la síntesis de ACC y la producción de etileno en flores (Jones y Woodson, 1999). En tomate, la polinización induce la producción de etileno y acelera la senescencia y la abscisión del órgano floral. (Llop-Tous y cols., 2000). Como los tratamientos de auxina producen frutos partenocárpicos, parece que la auxina actúa como señal de la polinización, pero también podría actuar como un activador mediado por etileno de senescencia floral y abscisión.

La función de ABA fue inicialmente relacionada con la abscisión, pero ahora está más asociada con su habilidad para iniciar la senescencia del tejido. Su efecto en abscisión podría depender de interacciones con auxina o etileno más que ser un efecto directo (Roberts y Elliot, 2002; Patterson, 2001). Estudios transcriptómicos obtenidos en la fase de inducción temprana de la abscisión de manzana encontraron la expresión de genes de biosíntesis de ABA y sugieren la participación en el proceso de la señalización de ABA, y su probable coordinación con otras hormonas (Botton y cols., 2011; Giulia y cols., 2013). Por tanto, mientras que el etileno parece ser el activador hormonal final de la abscisión, el ABA como la auxina, podría tener un papel intermedio. Además, el ABA junto con los jasmonatos (JA) son requeridos para activar la expresión de algunas enzimas que modifican la pared celular durante la abscisión en mutantes insensibles a algunas hormonas de *Arabidopsis*. (Ogawa y cols., 2009).

Las citoquininas están implicadas en la regulación de la división celular y expansión, interviniendo en muchos procesos fisiológicos. A pesar de que altas concentraciones de citoquininas han mostrado inhibir la abscisión (Pierik y Abbadi, 1972), el efecto de las citoquininas está más bien relacionado con su inducción. De hecho, algunos compuestos sintéticos semejantes a ellas inducen la abscisión y son usados como defoliantes. Sin embargo, se piensa que la acción que la citoquinina realiza en abscisión está mediada por etileno (Dal Cin y cols., 2007; Sipes y Einset, 1983; Grossman, 1981).

El ácido jasmónico está tradicionalmente asociado con la respuesta a patógenos. Aunque los tratamientos con jasmonatos aceleran la abscisión (Staswick, 1995), esta es una respuesta general a estrés que finalmente provoca la producción de etileno (Taylor y



Whitelaw, 2001). La expresión de genes relacionados con jasmonatos ha sido observada en abscisión de flores de tomate (Wang y cols., 2013). Algunos estudios sugieren un papel más directo de los jasmonatos en la activación de la abscisión, además de la creación de una respuesta de defensa (Hartmond y cols., 2000; Agustí y cols., 2008; Beno-Moualen, 2004; Miyamoto y cols., 1997; Ueda y cols., 1996).

Tras la abscisión, los órganos separados sufren un proceso similar al de la MCP (Van Doorn, 2011), que implica la inducción de nucleasas y especies reactivas del oxígeno (ROS) (Bar-Dror y cols., 2011; Meir y cols., 2010; Farage-Barhom, 2008; Sakamoto, 2008). A menudo, algunos elementos del proceso participan no solo en la senescencia del órgano separado, sino también en la aparición de la abscisión en sí. En tomate, la supresión de una ribonucleasa relacionada con la MCP y la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas comprometen la abscisión (Bar-Dror, 2011; Lers y cols., 2006) mientras que en pimiento, inhibidores de ROS previenen la abscisión por supresión de la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sakamoto y cols., 2008).

#### **1.1.2.2. Ontogenia de las zonas de abscisión**

Se han realizado muchos estudios sobre los procesos morfológicos, citológicos y bioquímicos en la activación de la ZA pero todavía son poco conocidos los procesos que participan en su diferenciación. La caracterización de mutantes que muestran caídas atípicas de órganos revela varios aspectos del proceso de diferenciación de la ZA, incluyendo sus aspectos moleculares (Robert y cols., 2002; Roberts y cols., 2000; Van Nocker, 2009).

Se ha observado que la expresión de genes KNOX que codifican proteínas que previenen la diferenciación celular en el meristemo apical, promueven una baja concentración de auxina en la región anatómica que contiene la ZA lo que podría mantener un estado de falta de diferenciación característico de las células de ZA (Van Nocker, 2009).

El gen más estudiado relacionado al desarrollo de la ZA es JOINTLESS, que codifica un FT MADS box en tomate. Una mutación *jointless* suprime la formación de la ZA del pedúnculo y afecta al crecimiento provocando algunos efectos pleiotrópicos (Mao y cols., 2010). Otro gen de tomate, también relacionado con al desarrollo de la ZA del pedicelo, LATERAL SUPPRESSOR (Ls), codifica una proteína VHIID que tiene alta homología con proteínas asociadas a la transducción de señales de giberelinas (Schumacher y cols., 1999). Mutantes

supresores *jointless* y *ls* no desarrollan una correcta ZA en el pedúnculo, aunque hojas y órganos florales de ambos mutantes si sufren abscisión, lo que sugiere que existe una diferencia en las señales morfogénicas que regulan la formación de la ZA en diferentes tejidos (Roberts y cols., 2002; Roberts y cols., 2000). Otro gen requerido para la diferenciación de la ZA del pedúnculo en tomate identificado es MACROCALYX, el cual codifica un FT MADS box con una similitud de secuencia significativa al gen FRUITFULL de Arabidopsis, que está involucrado en la regulación del desarrollo de la zona de dehiscencia en las silicuas (Nakano y cols., 2011). La supresión de MACROCALYX bloquea el desarrollo de la ZA del pedúnculo y produce un fenotipo “leafy” lo que indica que MACROCALYX es requerido para la determinación de inflorescencias. De hecho, la supresión de MACROCALYX altera los patrones de expresión de cuatro FTs relacionados con la identidad del meristemo (Nakano y cols., 2011). Junto con JOINTLESS y MACROCALYX, otro nuevo gen identificado, SEPALLATA MADS-BOX PROTEIN21 también es necesario para la formación de la ZA en el pedicelo del tomate (Liu y cols., 2014). Se ha sugerido que este gen podría formar un complejo proteico con JOINTLESS y MACROCALYX para regular la formación de la ZA.

Varios genes con similitud a genes de Arabidopsis relacionados con auxina fueron inhibidos en mutantes *macrocalyx*, sugiriendo que el control del desarrollo de la ZA podría estar dada también por la influencia de la ruta mediada por auxina y la relación auxina / etileno (Nakano y cols., 2011).

Otro mutante de tomate similar a *jointless*, *jointless-2* (j-2) no desarrolla una ZA normal en el pedúnculo y tiene efectos pleiotrópicos en la arquitectura de la parte aérea. Aunque su función sigue siendo desconocida, el mapeo genético ha identificado a una fosfatasa, CPL1 (C-Terminal Domain Phosphatase-Like 1), como una candidata probable para J-2 (Van Nocker, 2009).

Los genes de Arabidopsis BLADE ON PETIOLE 1 (BOP1) y BOP2 son importantes para el desarrollo de la ZA, codifican proteínas que pertenecen a una familia que contiene dominios BTB/POZ y repeticiones anquirina. BOP1 y BOP2 promueven la formación de la anatomía especial de ZA necesaria para la abscisión del órgano floral (Khan y cols., 2014). La expresión espacial y temporal de genes que actúan corriente debajo de BOP1 y BOP2 no era alterada en mutantes *bop1 bop2*, lo que sugiere un control aparte o redundante de su transcripción en la zona de unión de órganos laterales (McKim y cols., 2008; Gonzalez-Carranza y cols., 2012).

BOP1/BOP2 podrían tener un papel más amplio en diferenciación, ya que regulan el desarrollo de hojas y flores controlando la actividad de genes homeóticos en hojas e inflorescencias (McKim y cols., 2008; Norberg y cols., 2005; Ha y cols., 2004; Ha y cols., 2003; Hepworth y cols., 2005; Khan y cols., 2011; Xu y cols., 2010). Un homólogo en tabaco de la proteína BOP2 de Arabidopsis (NtBOP2) controla la elongación celular y tiene un papel específico en la diferenciación de la ZA de la corola (Wu y cols., 2012). La supresión antisentido de NtBOP2 detiene la abscisión de la corola bloqueando la elongación de las células de la ZA cercanas a la base de la corola. NtBOP2 podría controlar la longitud celular interactuando con al menos un FT tipo TGA que podría modular la biosíntesis de giberelina. El mecanismo por el cual NtBOP2 determina la diferenciación de la ZA podría ser diferente del de Arabidopsis (Khang y cols., 2014).

ARABIDOPSIS THALIANA HOMEODOMAIN BOX GENE 1 (ATH1) es una proteína BELL que también participa en el desarrollo de la ZA floral. ATH1 interactúa con proteínas KNOX en el meristemo e inhibe el crecimiento celular en los límites de los órganos (Gubert y cols., 2014). La ZA floral de mutantes *ath1* no se desarrolla correctamente en las etapas tempranas del desarrollo, y en estas plantas, los órganos florales unidos a los frutos en desarrollo se fusionan. Sin embargo, una ZA funcional se desarrolla finalmente en flores maduras y los órganos florales se desprenden tras fertilización. Las ZAs vestigiales en la unión entre las hojas caulinares y la raíz de la inflorescencia no se desarrollan, lo que sugiere que en general, ATH1 se requiere para el desarrollo de los límites basales de órganos vegetales aunque no es esencial en la creación de una ZA (Gomez-Mena y Sablowski, 2008; Cole y cols., 2006).

Un gen KNOX de clase I, BREVIPEDICELLUS (BP)/KNAT1, podría estar implicado en el desarrollo de las ZAs de órganos florales en Arabidopsis ya que una supresión de BP/KNAT1 resulta en una ZA anormalmente hinchada en mutantes *bp-101* (Wang y cols., 2006), la función de BP/KNAT1 podría requerir unas ZAs ya diferenciadas. La abscisión de órganos florales no está restablecida en mutantes triples *bop1 bop2 bp*, además, se ha observado una participación principal de BP/KNAT1 y otras proteínas KNOX como KNAT2 y KNAT6 al estudiar la ruta de señalización de abscisión en el fenotipo IDA (Shi y cols., 2011; Butenko y cols., 2012). Recientemente ha sido observado como la supresión del gen BP restaura la separación de órganos en flores *ida* y *hae hsl2* (Liu y cols., 2013; Gubert y cols., 2014).

## Introducción

KNAT6 y un complejo compuesto por ATH1 y KNAT2 juegan un importante papel en el control del desarrollo del pedicelo en *Arabidopsis*, lo que sugiere que los genes homeobox mencionados antes podrían interactuar con los límites que definen las proteínas BELL y perfeccionar el desarrollo de la ZA (Li y cols., 2012). BP/KNAT1 probablemente perfeccionen la formación de la ZA actuando corriente abajo de los genes BOP1 y BOP2 que tienen un efecto epistático sobre BP/KNAT1.

El FT de *Arabidopsis* SEEDSTICK (STK) está implicado en el desarrollo normal del funículo, el tallo que conecta el óvulo/semilla con la placenta, mediante el control de la expansión y la división celular (Pinyopich y cols., 2003). Las semillas de mutantes *stk* fallan al separarse debido al desarrollo celular defectuoso en la unión entre la semilla y el funículo donde la ZA está correctamente formada. Así, STK está implicado en la diferenciación de la ZA en semillas.

El desgrane en el arroz depende de la diferenciación de la ZA situada en la base del grano. Los genes SH4/SHA1 y qSH1, que codifican factores de transcripción homeobox de los tipos MYB-like y BEL1, respectivamente, juegan un importante papel en el establecimiento de la ZA desde las etapas tempranas del desarrollo floral. Se originaron variedades que no desgranaban como consecuencia de seleccionar mutaciones en estos genes (Konishi y cols., 2006; Li y cols., 2006; Lin y cols., 2007). El gen qSH1 está exclusivamente unido a la formación de la ZA mientras que SH4/SHA1 podrían ser también requeridos para su activación (Konishi y cols., 2006; Li y cols., 2006; Onishi y cols., 2007). La caracterización de otro mutante de arroz con un fenotipo que no desgrana, *shat1*, ayudó a explicar la interacción entre los últimos genes en el desarrollo de la ZA de la semilla. SHAT1 es un ortólogo en arroz de la proteína de *Arabidopsis* AP2 que está implicada en la regulación del desarrollo floral (Zhou y cols., 2012). Variaciones en el gen SHAT1 en un arroz silvestre resultó en la ausencia de una correcta ZA y un incremento en la fuerza requerida para separar granos de arroz. SHAT1 podría actuar corriente abajo de SH4/SHA1, activando qSH1 y manteniendo la expresión de SH4/SHA1 en la ZA (Zhou y cols., 2012).

El sorgo que no desgrana (sorgo bicolor) está controlado por un solo gen: SHATTERING1 (SH1) (Lin y cols., 2012), un FT YABBY-like asociado con el desarrollo de la ZA en la unión que conecta la cáscara de la semilla y el pedicelo. Ortólogos al gen SH1 de sorgo responsable del fenotipo que no desgrana se han identificado en arroz (*OsSh1*) y maíz (familia génica *ZmSh1*) (Lin y cols., 2012). Inversamente a SH4/SHA1, qSH1, SHAT1 y *Sh1* que promueven diferenciación en ZA, el locus SH-H en arroz, el cual codifica una proteína

fosfatasa-like nuclear (OsCPL1), ha sido propuesto como represor de la formación de la ZA de semillas, ya que mutantes OsCPL1 muestran un desarrollo acelerado de la ZA y un fenotipo que desgrana (Ji y cols., 2010).

El desarrollo de la región ligular, localizada en la misma posición en la que es encontrada la ZA hoja/peciolo, aunque no está implicada en la separación celular de hojas de cereal, está asociada con la actividad de diferentes proteínas KNOX de clase I (Freeling y Hake, 1985; Freeling, 1992; Muehlbauer y cols., 1999; Schneeberger y cols., 1995; Smith y cols., 1992; Vollbrecht y cols., 1991). Los genes ortólogos de Arabidopsis de maíz knotted1/rough sheath1 y liguleless3/liguleless4 son, KNAT1 y KNAT2/6, respectivamente. Son componentes de la ruta de señalización IDA de abscisión de órganos actuando corriente abajo a IDA y HAE/HSL2 (Shi y cols., 2011; Butenko y cols., 2011; Ma y cols., 2015). El gen de arroz SCARECROW (OsSCR) se expresa en la capa celular endodérmica de la raíz y también en células ligulares lo que sugiere un posible papel de este gen en la formación de la lígula (Kamiya y cols., 2003). Dos miembros de la familia génica SCARECROW de cítricos aumentan en la ZA laminar, localizada entre la hoja y el peciolo, siguiendo a la activación de la abscisión de hojas en cítricos por etileno (Agustí y cols., 2009).

### **1.1.2.3. Activación de la zona de abscisión**

La activación de la maquinaria molecular de abscisión implica alteraciones en la expresión génica de un gran número de familias de genes, incluyendo enzimas de remodelación de pared celular, de biosíntesis y modificación de proteínas y FTs homeóticos en la ZA así como proteínas de defensa en órganos que permanecen unidos a la planta. Un gran número de FTs que regulan la abscisión han sido recientemente identificados (Fig.1).

Se ha centrado mucha atención en la actividad de enzimas que actúan sobre polisacáridos estructurales, que conducen a la hidrólisis de la lámina media y pared celular de las células de la ZA (Brummel y cols., 1999; del Campillo y Bennet, 1996; Burns y cols., 1998; Gonzalez-Carranza y cols., 2007; Gonzalez-Carranza y cols., 2002; Jiang y cols., 2008; Kalaitzis y cols., 1995; Kalaitzis y cols., 1997; Lashbrook y cols., 1998; Ratner y cols., 1969; Riov, 1974; Tucker y cols., 1991; Tsuchiya y cols., 2015). Algunos miembros específicos de la familia génica  $\beta$ -1,4-glucanasas (celulasas) aumentan debido a la acción del etileno durante la abscisión de órganos en diferentes especies (Sexton y Roberts, 1982; Taylor y Whitelaw, 2001; Burns y cols., 1998; Ferrarese y cols., 1995; Lashbrook y cols., 1994;

Mishra y cols., 2008; Trainotti y cols., 1997). Los genes de tomate CEL1, CEL2 y CEL5 se expresan en alto nivel en la ZA del pedicelo floral (del Campillo y Bennett, 1996; Gonzalez-Bosch y cols., 1997; Kalaitzis y cols., 1999). CEL1 y CEL2 están implicados en la degradación de la pared celular en esta zona (Brummel y cols., 1999; Lashbrook y cols., 1998).

Tres PG: TAPG1, TAPG2, y TAPG4, con diferentes perfiles de expresión espacial y temporal también están implicadas en la abscisión del fruto de tomate (Kalaitzis y cols., 1997). Tsuchiya y cols. (2015) también observaron la expresión de poligalacturonasas en la ZA de tomate. Mientras, en *Arabidopsis*, tres PGs llamadas ADPG1, ADPG2 y QRT2 están implicadas en la dehiscencia de anteras, silicuas y abscisión floral respectivamente. El mutante *pgazat*, que codifica una PG expresada en la base de las estructuras florales, retrasa la abscisión floral (Ogawa y cols., 2009).

Las expansinas están específicamente implicadas en abscisión, dos genes de expansinas que son inducidas por etileno: SniEXP2 y SniEXP4 han sido clonados y caracterizados en ZA de hojas de saúco (Belfield y cols., 2005). La expresión de otra expansina, RbEXPA1, está asociada con la abscisión de pétalos en la *Rosa bourboniana* (Sane y cols., 2007). En *Arabidopsis*, AtEXP10 se expresa en el peciolo y la nervadura en hojas y también en la ZA vestigial del pedicelo (Cho y Cosgrove, 2000). En plantas que sobreexpresan AtEXP10, la incidencia de rotura completa del pedicelo fue más alta que en las plantas control. Sin embargo, la expresión de AtEXP10 en la base de los órganos florales no ha sido descrita. Recientemente, expansinas han sido detectadas mediante técnicas inmunohistoquímicas en la ZA de tomate (Tsuchiya y cols., 2015). Otras enzimas que modifican la pared celular como las pectinmetilesterasas, las pectato liasas y las xiloglucano endotransglucosilasas han sido también propuestas como implicadas en la abscisión de hojas y órganos florales (Agustí y cols., 2008; Cai y Lashbrook, 2008; Singh y cols., 2011; Sun y van Nocker, 2010).

El análisis de microarrays junto con la microdissección asistida con láser proveen datos útiles respecto a los niveles de expresión de genes relacionados con abscisión (Agustí y cols., 2009; Cai y Lashbrook, 2008). Este enfoque molecular aclaró la actividad transcriptómica de genes que codifican miembros de diferentes familias en enzimas que remodelan la pared celular y también de genes asociados con biosíntesis y modificación de proteínas que actúan al inicio de la abscisión. La mayoría de los genes que codifican proteínas modificantes de la pared celular, cuya expresión aumentó significativamente, podría facilitar la separación de órganos y la formación de capas de células protectoras.

Además, la alta expresión de algunos FTs homeóticos podría actuar como control del proceso. Un programa de defensa que previene de patógenos y de daño abiótico se activa en aquellos órganos que permanecen unidos a la planta (Meir y cols., 2010; Agustí y cols., 2008; Agustí y cols., 2009; Cai y Lashbrook, 2008; Meir y cols., 2011; Zhu y cols., 2011).

Investigaciones en *Arabidopsis* dilucidaron el papel de muchos genes que controlan la abscisión de órganos florales en un sistema basado en un péptido señal y receptores específicos (Fig. 1) (Shi y cols., 2011; Butenko y cols., 2011; Cho y cols., 2008; Stenvik y cols., 2008). El gen IDA fue identificado en mutantes de *Arabidopsis* que no mostraban abscisión en órganos florales (Butenko y cols., 2003). Las plantas que sobreexpresan IDA están caracterizadas por una abscisión prematura de órganos florales, un incremento en el número de células esféricas en la ZA y la secreción de grandes cantidades de arabinogalactanos en los lugares de abscisión (Stenvik y cols., 2006). El gen IDA codifica una proteína pequeña de 77 aminoácidos con una región N-terminal hidrofóbica que actúa como péptido señal, no se detectó ninguna región transmembrana. IDA pertenece a una familia multigénica de *Arabidopsis* con cinco genes adicionales IDA-LIKE (IDL) que conservan un motivo denominado EPIP (Stenvik y cols., 2008), este dominio resultó estar conservado en proteínas IDA-IDL de judía, tomate y soja (Tucker y Yang, 2012). La sobreexpresión de IDA e IDLs resulta en fenotipos similares a la abscisión floral prematura y a la abscisión ectópica de órganos vegetales adicionales (Stenvik y cols., 2006; Butenko y cols., 2003). Sin embargo, los cinco genes IDL tienen patrones de expresión distintos a los de IDA, lo cual es detectado solo en la ZAs florales (Stenvik y cols., 2006; Butenko y cols., 2003; Stenvik y cols., 2008).

HAESA (HAE) y HAESA-LIKE2 (HSL2) son proteínas quinasas receptoras funcionalmente redundantes con repeticiones de leucina (LRR-RLK) imprescindibles para la regulación de la separación celular durante la abscisión, ya que el doble mutante *hae hsl2* resultó en una abscisión floral defectuosa (Jinn y cols., 2000; Cho y cols., 2008; Stenvik y cols., 2003). La co-expresión de IDA y HAE en la ZA sugirió que IDA podría funcionar como un ligando de HAE. La sobreexpresión de IDA en un genotipo *hae hsl2* no recupera el fenotipo de abscisión lo que muestra que la función de IDA requiere a HAE y a HSL2 (Stenvik y cols., 2008).

La activación de HAE o HSL2 por IDA induce una cascada MAP kinasas dentro del citoplasma de las células de la ZA (Cho y cols., 2008). La expresión de MKK4 y MKK5 ha sido detectada en los órganos florales y la ZA. Las plantas con expresión reducida de MKK4

y MKK5 presentan fenotipos defectivos en abscisión similares a los del mutante *ida*. MKK4 y MKK5 podrían actuar a través de las MAP kinasas de Arabidopsis MPK3 y MPK6, las cuales tienen funciones superpuestas ya que una forma mutante de MPK6 confiere un fenotipo defectuoso en abscisión en mutantes *mpk3* pero no en plantas silvestres (Cho y cols., 2008). Se han identificado componentes adicionales de la ruta de señalización de IDA (Shi y cols., 2011; Butenko y cols., 2011): Una versión mutante de gen BP/KNAT1 de Arabidopsis recupera los fenotipos de *ida* y de *hae hsl2*, proporcionando una abscisión normal de los órganos florales. Los mutantes *bp* se parecen a plantas que sobreexpresan IDA en la estructura de la ZA floral y en la desorganización prematura de la pared. Por lo tanto, BP/KNAT1 podría actuar como un regulador negativo corriente abajo, siendo suprimido probablemente por la señalización de IDA (Shi y cols., 2011). BP/KNAT1 debería, por tanto, funcionar restringiendo la expresión de KNAT2 y KNAT6, lo cual a su vez regularía positivamente la transcripción de genes involucrados en la separación celular (Shi y cols., 2011; Butenko y cols., 2011), tales como genes de remodelación de pared (Kumpf y cols., 2013).

Investigaciones sobre el tráfico de membranas en Arabidopsis han revelado una ruta distinta que lleva a la activación de la ZA (Fig.1) (Leslie y cols., 2010; Lewis y cols., 2010; Liljegren y cols., 2009). Tal ruta fue propuesta tras la caracterización de los mutantes *nevershed* (*nev*) en los cuales, la separación de los órganos está bloqueada como resultado de un tráfico defectuoso. NEV codifica una proteína ARF-GAP que funciona como regulador general del tráfico de membrana (Liljegren y cols., 2009; Liu y cols., 2013).

La búsqueda de mutaciones que restauren la separación de órganos en flores *nev* ha llevado al descubrimiento de EVERSHED (EVR) y SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1 (SERK1) como inhibidores de la abscisión. EVR1 y SERK1 codifican dos receptores quinasa transmembrana que podrían funcionar como inhibidores de la abscisión actuando sobre otras quinasa en la membrana plasmática. Como la pérdida de EVR no recupera la separación de órganos florales en flores *ida* ni *hae hsl2*, se ha sugerido que NEV y EVR (y también SERK1) podrían actuar corriente arriba de IDA y HAE/HSL2, o en una ruta paralela que convergiera en el punto de la función de HAE/HSL2 o incluso corriente abajo (Leslie y cols., 2010). Un reciente estudio ha demostrado que NEV interactúa físicamente in vivo con la cadena pesada de clatrina y marca un subconjunto de vesículas cubiertas por clatrina purificadas (Sauer y cols., 2013). Durante la abscisión, NEV podría potencialmente regular la exocitosis de enzimas modificadoras de la pared celular,



la endocitosis de materiales de pared, u otros transportes requeridos en tal proceso (Gubert y cols., 2014).

Un nuevo receptor quinasa, CASTAWAY (CST) ha sido descrito como un inhibidor de la abscisión al igual que EVR y SERK1. Ha sido propuesto que CST estabilizaría a EVR en la membrana plasmática y junto a otro receptor kinasa-like contribuiría a bloquear la ruta de señalización que lleva a la abscisión de órganos promoviendo la internalización de los receptores HAE/HAESA antes de la unión del ligando (Burr y cols., 2011). Ya que la disminución regulada de EVR ha sido detectada en mutantes *bp*, se ha sugerido la existencia de una interacción entre las rutas IDA-HAE/HSL2 y EVR a nivel de BP/KNAT1, (Shi y cols., 2011; Wang y cols., 2006; Butenko y cols., 2011). Se ha mostrado que la pérdida de función de EVR, SERK1 o CST no restaura la separación de órganos en mutantes *ida* o *hae hsl2*. Sin embargo, a pesar de las similitudes entre los fenotipos *nev evr*, *nev serk1* y la sobreexpresión de IDA, la pérdida de actividad de IDA no es suficiente para bloquear la separación de órganos en flores *nev evr* o *nev serk1*. Estos resultados sugieren que la restauración de la separación celular en flores *nev evr* y *nev serk1* es independiente a IDA, y que la activación ectópica de la ruta de señalización HAE/HSL2 podría ocurrir al nivel de los receptores HAE/HSL2 o corriente abajo (Gubert y cols., 2014).

Muchos FTs participan en la activación de la abscisión de órganos florales en Arabidopsis (Fig. 1). AGAMOUS like 15 (AGL15) es un FT MADS-box que se acumula durante el desarrollo embrionario de Arabidopsis. Se piensa que AGL15 mantiene un estado de no senescencia en tejidos jóvenes. La expresión constitutiva de AGL15 resulta en un retraso de la separación de pétalos, pero no modifica la estructura de la ZA ni su habilidad para responder al etileno (Fernandez y cols., 2000; Heck y cols., 1995). Similarmente a AGL15, AGAMOUS like 18 (AGL18) y AGAMOUS like 42 (AGL42; FOREVER YOUNG FLOWER, FYF) también retrasan la senescencia de órganos florales y la abscisión cuando se expresan a altos niveles (Adamczyk y cols., 2007; Chen y cols., 2011). En contraste a las plantas que sobreexpresan AGL15 y AGL18, la senescencia y abscisión en plantas que sobreexpresan FYF es independiente de etileno. Cuando las plantas que sobreexpresan FYF se cruzan con mutantes *etr1*, *ein2* y *ctr1*, la senescencia y la abscisión se retrasa. La sobreexpresión de FYF también resulta en la disminución regulada de los genes EDF1 y EDF2 de la ruta de etileno. FYF tiene un papel inhibidor sobre estos genes, bloqueando la ruta de señalización del etileno que regula la senescencia y la abscisión (Chen y cols., 2011; Xie y cols., 2014). FYF también tiene un papel regulador sobre IDA y BOP2, el cual podría implicar un control de este gen sobre la activación de la ZA y su desarrollo. Estas hipótesis están basadas en

cambios en los niveles de expresión génica y se requieren más investigaciones para aclararlas.

Microdisecciones asistidas con láser y análisis transcriptómicos han revelado el papel de un gen que codifica una proteína con dedos de zinc, ZINC FINGER PROTEIN 2 (AtZFP2) como un represor de la abscisión de órganos florales en *Arabidopsis* ya que incrementó la retención de órganos (Cai y cols., 2008). Esta proteína interactúa con AtDOF4.7, un miembro de la familia de FT DOF. Esta interacción podría controlar la expresión de enzimas hidrolíticas de la pared celular como PGAZAT (Wei y cols., 2010). La aplicación de etileno exógeno no aceleró ninguna parte del proceso de abscisión de órganos florales en individuos que sobreexpresaban AtDOF4.7, lo cual ha llevado a sugerir que AtDOF4.7 actúa dentro de una ruta independiente de etileno (Wei y cols., 2010) similar a FYF.

Tratamientos sobre hojas y frutos de cítricos con etefón, un compuesto liberador de etileno, aumenta la expresión de dos genes de biosíntesis de etileno CsACS1 y CsACO en ZAs lo que activa la abscisión de órganos (Yuan y cols., 2005). El tratamiento combinado de etefón con guanfacina o clonidina, dos agonistas selectivos de proteínas G acopladas a adrenergico  $\alpha_{2A}$ , reducen la expresión aumentada por etefón de los genes CsACS1 y CsACO en la ZA laminar y la abscisión de hojas. Los efectos observados en abscisión de hojas sugieren una unión entre la señalización relacionada con proteínas G, biosíntesis de etileno y abscisión.

Los genes AtARP4 y AtARP7 codifican dos proteínas relacionadas con actina que promueven la abscisión (Kandasamy, 2005a; Kandasamy, 2005b). Es muy factible que puedan intervenir en numerosos procesos ya que codifican proteínas que modifican la cromatina. El silenciamiento de estas proteínas resulta en efectos pleiotrópicos tales como crecimiento retrasado de la raíz, desarrollo alterado de flores y fertilidad reducida.

Una ribonucleasa de tomate T2/S-like, LX, está asociada con respuestas a etileno, senescencia, MCP y abscisión (Lehmann y cols., 2001; Lers y cols., 1998). Tanto los transcritos de LX como los péptidos se acumulan alrededor de los tejidos de las ZAs peciolares en hojas maduras. (Lers y cols., 1996; Lers y cols., 1998). La supresión antisentido de LX en tomate retrasa la senescencia foliar y la abscisión (Lers y cols., 1996) lo que sugiere un papel funcional de la LX RNasa en abscisión de órganos. Recientemente, se ha sugerido que la expresión de LX podría ser requerida para la progresión normal de la abscisión de órganos, ya que la MCP y la expresión de LX están asociadas con la abscisión

de hojas y flores en tomate (Bar-Dror y cols., 2011). Cuando se comparan el lado proximal con el lado distal, la expresión del gen *LX* y la acumulación de proteínas coinciden con una mayor expresión génica de celulasas relacionadas con abscisión y *ACS* en el lado distal, en contraste con una expresión más baja de *PG* (Bar-Dror y cols., 2011).

Los genes *SH4/SHA1* de arroz no solo intervienen en un desarrollo temprano de la *ZA* sino que también se expresan en las etapas tardías de la maduración de semillas, lo que sugiere que el gen activa la abscisión regulando la actividad de hidrolasas de pared celular (Li y cols., 2006; Li y cols., 2007). Otros genes tales como *TDR4* también controlan la expresión de enzimas modificantes de pared celular y podrían estar involucradas en la activación de *ZAs*. *TDR4* es un FT MADS box (Busi y cols., 2003). Su expresión se reduce en los mutantes *rin* y *nor* de tomate que no maduran y también en el mutante *Cnr*, en paralelo con una reducción en la expresión de genes que codifican algunas enzimas remodeladoras de la pared celular como poligalacturonasa, pectinesterasas y pectato liasas (Eriksson y cols., 2004). Un gen con alta homología al *Cnr* del tomate están específicamente sobreexpresado en células de la *ZA* durante la abscisión promovida por el etileno de frutos maduros en cítricos. Esto es simultáneo con los aumentos en los transcritos que codifican hidrolasas de la pared celular que están expresadas antes de la abscisión de frutos (Merelo Cremades, 2011).

### 1.1.3. Abscisión del fruto

Las plantas han desarrollado un sofisticado mecanismo de abscisión de frutos con el fin de propagarse exitosamente y responder a ataques de patógenos, estrés por sequía, daño por frío o desequilibrios de nutrientes u hormonales (Xie y cols. 2013). La abscisión de frutos es un proceso muy coordinado mediado por multitud de factores como hormonas, azúcares, poliaminas (PAs),  $H_2O_2$  etc. Todos estos compuestos derivan de rutas biosintéticas o catabólicas pudiendo ejercer su actividad tanto en el sitio de generación como en otras zonas gracias a su transporte a través de la planta (Iglesias y cols. 2006, Dal Cin y cols. 2009a, Parra-Lobato y Gómez-Jimenez, 2011; Gil-Amado y cols. 2011, Ish-Shalom y cols. 2011).

Sin embargo, estos compuestos no actúan de manera independientemente sino que están interrelacionados a través de interacciones sinérgicas o antagonistas cuyo fin consiste en regular la biosíntesis o respuesta que consecuentemente activa o inhibe la expresión de un conjunto de genes relacionados con la abscisión de frutos. Por tanto, un sistema de

transducción de la señal muy complejo debe estar involucrado en abscisión y nuevos mecanismos quedan aún por aclarar.

En los últimos años, se han realizado progresos significativos para comprender estas rutas de transducción de señales (Mahouachi y cols., 2009, Zhu y cols. 2011, Gil-Amado y cols., 2013, Ito y Nakano, 2015). Mediante detección genética y métodos analíticos bioquímicos se han identificado algunos receptores y otros componentes de la señal relacionados con abscisión de frutos (Xie y cols., 2013). Sin embargo, debido al limitado conocimiento de genes relacionados con abscisión y sus funciones, la comprensión de los eventos moleculares asociados con la abscisión de frutos permanece desconocida.

Varios años atrás, revisiones sobre la señalización asociada a la abscisión y su background biológico fueron publicadas (Taylor y cols., 2001; Racskó y cols. 2006) mostrando que los eventos moleculares de la abscisión de frutos son diferentes de aquellos de abscisión de flores u hojas. Esto va siendo corroborado gracias al descubrimiento y aportación de nuevos datos sobre el proceso de abscisión de frutos (Xie y cols., 2013; Ito y Nakano, 2015).

#### **1.1.3.1. Compuestos involucrados en la abscisión de frutos**

- **Azúcares:** La carencia de azúcares promueve la abscisión de frutos a la vez que provoca el aumento las concentraciones de ABA y ACC (Iglesias y cols. 2003; Li y cols., 2015). El tratamiento mediante suplementación con sacarosa y anillado de ramas, aumentó el contenido en sacarosa y, por tanto, incrementó el cuajado pero esto no contrarrestó el efecto abscísico inducido por el ACC (Iglesias y cols. 2006). Estos resultados indican que los azúcares podrían actuar no solo como nutrientes esenciales sino también como moléculas señalizadoras (Iglesias y cols. 2003). También se ha sugerido que los azúcares controlan la abscisión de frutos afectando al metabolismo de hormonas y/o sus rutas de señalización (Kuang y cols., 2012; Li y cols., 2015). Es probable que el nivel umbral de azúcar que lleva a la abscisión de frutos sea diferente en diferentes etapas del desarrollo. Varios genes relacionados con abscisión de frutos que detectan el contenido en azúcares han sido aislados y caracterizados. Uno de ellos es trehalosa-6-fosfato isomerasa (TPS) que pertenece a los genes de metabolismo de trehalosa. Como la trehalosa generalmente funciona como azúcar de reserva y normalmente se acumula bajo condiciones de inanición (Rolland y cols. 2006, Fernandez y cols. 2010), la

participación de TPS en abscisión es sugerida por su alta expresión (Botton y cols. 2011) también en cítricos (Alferez y cols. 2007) o lichi (Li y cols., 2015). El gen SnRK3-like y el gen Suc sintasa (SUS-like) posiblemente funcionen como moléculas señalizadoras detectando el almacenamiento de nutrientes y estando, por tanto, involucradas en abscisión de frutos (Botton y cols. 2011). A través de análisis de la expresión de genes, el gen de la hexoquinasa (HXK) aumenta por NAA solo en la ZA de manzana, lo que sugiere que también es probable que participe en la abscisión de frutos actuando como un gen señalizador. Los genes de sorbitol-6-fosfato deshidrogenasa parecen no expresarse en frutos jóvenes, pero juegan un papel clave en la biosíntesis de sorbitol, y son inducidos tras sombreado. Sin embargo, es necesaria más investigación para saber si están involucrados en abscisión de frutos (Zhou y cols 2008). Además de los genes de señalización relacionados con azúcares mencionados anteriormente, dos genes transportadores de azúcares (los genes de transporte de sorbitol y sacarosa; MdSOT y MdSUT) han sido caracterizados en detalle mediante análisis con microarrays combinados con métodos de análisis de expresión génica. Estos dos genes son expresados en la ZA de frutos por NAA y sombreado, lo que sugiere que el transporte de azúcares a los frutiolos es obstaculizado lo cual provoca la abscisión de frutos. Todos los descubrimientos mencionados anteriormente indican que los azúcares no solo proveen nutrición sino que también juegan un papel crucial como moléculas señalizadoras y que las interacciones entre azúcares y hormonas u otros factores pueden regular la abscisión de frutos (Xie y cols., 2013; Li y cols., 2015). Sin embargo, en algunos casos, la hipótesis de que los azúcares actúan como moléculas señal estando directamente involucrados en la regulación de la abscisión de frutos necesita todavía más investigación.

- **Poliaminas:** Las PAs, incluyendo principalmente a la putrescina (Put), espermidina (Spd), y la espermina (Spm), son compuestos catiónicos distribuidos ubicuamente en los organismos vivos, involucrados en una gran variedad de procesos fisiológicos y situaciones de estrés (Bouchereau, 1999; Kusanto y cols., 2008; Takahashi y Kakehi, 2010). Estos compuestos están también implicados en aumentar el cuajado de frutos (Alburquerque y cols., 2006, Dal Cin y cols., 2009 a, b). En cultivares de olivo, las actividades de la diamina oxidasa (DAO) y la poliamina oxidasa (PAO) están inversamente asociadas con la abscisión de frutos (Gomez-Jimenez y cols. 2010). La utilización de ciclohexilamina y  $\beta$ -hidroxietilhidrazina como inhibidores para la Spd sintasa (SPDS) y PAO,

respectivamente, resultó en el aumento de la abscisión de uva (Aziz y cols. 2001). Estos datos indican que la Put podría tener un papel importante en la regulación de la abscisión de frutos. Sin embargo, solo la Put soluble (no la Spd ni la Spm) está involucrada en obstaculizar la abscisión de frutos y con una influencia positiva en el cuajado (Aziz y cols. 2001, Gomez-Jimenez y cols. 2010). El mecanismo tras el papel de las Puts soluble e insoluble en abscisión de frutos podría ser que la conversión de Put libre a Put conjugada podría mitigar el efecto dañino de la Put libre sobre la membranas de las células vegetales y estabilizar la función y configuración de las proteínas (Gomez-Jimenez y cols. 2010). De acuerdo a los descubrimientos anteriores, el descenso en actividad de PAO, DAO y SPDS contribuyen a un incremento en el contenido de Put libre. Además de Put, otras PAs, tales como Spd y cadaverina (Cad), están también asociadas con la abscisión de frutos (Gomez-Jimenez y cols. 2010). La aplicación de inhibidores de poliaminas o etileno exógeno provoca el aumento de Put libre y disminuye los conjugados solubles de Spd, Spm, homoespermidina y Cad en la ZA de olivo, mientras que la inhibición de etileno incrementa estos conjugados solubles pero no afecta a etileno (Gil-Amado y Gomez-Jimenez, 2013). La S-adenosilmetionina (SAM) descarboxilasa (SAMDC) es considerado como un gen regulador principal involucrado en la síntesis de Spd y Spm y también es conocido que afecta a la producción de etileno debido a la relación antagonista entre PA y biosíntesis de etileno ya que ambas rutas sintéticas compiten por la utilización de SAM, un precursor común. También se ha observado que la Spd provoca la represión de genes relacionados con la síntesis de etileno, afectando a la abscisión de frutos en olivo (Parra-Lobato y Gomez-Jimenez, 2011). Durante la abscisión de frutos, la actividad de SAMDC se inhibe mientras que el contenido endógeno de Put libre y etileno se incrementa (Gomez-Jimenez y cols. 2010; Gil-Amado y Gomez-Jimenez, 2013), ambos fenómenos contribuyen a la abscisión de frutos. Adicionalmente, algunas PAs regulan genes de biosíntesis y señalización de etileno tales como OeACS2, OeEIL2, y están relacionados con la producción de NO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ambas moléculas sirven como moléculas señal durante la abscisión de frutos (Gil-Amado y cols. 2011, Parra-Lobato y Gomez-Jimenez 2011) lo que indica que las PAs están implicadas en las rutas de transducción de señales relacionadas con la abscisión de frutos.

- **Otros:** Los lípidos proveen las bases estructurales para las membranas celulares y además son combustibles para el metabolismo (Wang, 2004). En los últimos

años se han acumulado evidencias que indican que los lípidos también funcionan en transducción de señales (Wang, 2004). Tras la aplicación de CMNP a cítricos, la actividad de la fosfolipasa A2 (PLA2) y de la lipoxigenasa (LOX) así como el contenido en hidroperóxido lipídico aumentaron en el flavedo. Por el contrario el ácido aristolóquico, un inhibidor de la actividad de PLA2, redujo el incremento inducido por CMNP en la actividad de PLA2 y LOX y los niveles de hidroperóxido lipídico a la vez que se produjo una reducción en la abscisión de frutos. La expresión de LOX también ha sido observada en el pedicelo de fruto de tomate y podría participar en el proceso de abscisión (Nakano y cols., 2013) Estos datos indican que los lípidos juegan papeles importantes en la abscisión de frutos (Alferez y cols. 2005), aunque los mecanismos tras la detección y la transducción de las señales de abscisión permanecen desconocidos. Un gen de una proteína transferidora de lípidos (LTP) ha sido aislado de frutos maduros de cítricos. A través de análisis genéticos y de expresión, se reveló que el gen LTP parecía jugar un papel importante en la abscisión de frutos posiblemente por asistir en el transporte de monómeros de cutina al plano de fractura de la ZA o a través de su actividad antimicrobiana reduciendo el potencial de ataque microbiano (Wu y Burns 2003). Colectivamente, además de las rutas biológicas mencionadas, otros mecanismos podrían estar también involucrados en la abscisión de frutos los cuales necesitan ser explorados.

#### **1.1.3.1.1. Interacciones entre hormonas, azúcares y poliaminas**

La gran cantidad de evidencias que apoyan las interacciones entre hormonas, entre hormonas y azúcares, así como entre hormonas y poliaminas se obtuvieron principalmente mediante investigación en manzana, mango y cítricos. La acción sinérgica o antagonista de estos compuestos y la regulación coordinada de sus rutas biosintéticas juegan papeles importantes en modular la abscisión de frutos permitiendo una respuesta adecuada a los factores internos y externos (Xie y cols., 2013) (Fig. 2). Como ha sido mencionado anteriormente, un balance entre el contenido de auxina y etileno en la ZA es un factor crucial en la regulación de la abscisión de frutos. Sin embargo, la auxina por si misma estimula la producción de etileno mediante el incremento de la expresión de genes ACS (Vandenbussche y Straiten 2007, Li y Yuan 2008). El etileno, funcionando como un inhibidor de retroalimentación bloquea el transporte de auxina desde el fruto (Zhu y cols., 2011). Además, también se ha observado que un transporte más intenso de auxina disminuye la sensibilidad a etileno y que éste a su vez, inhibe el transporte de auxina

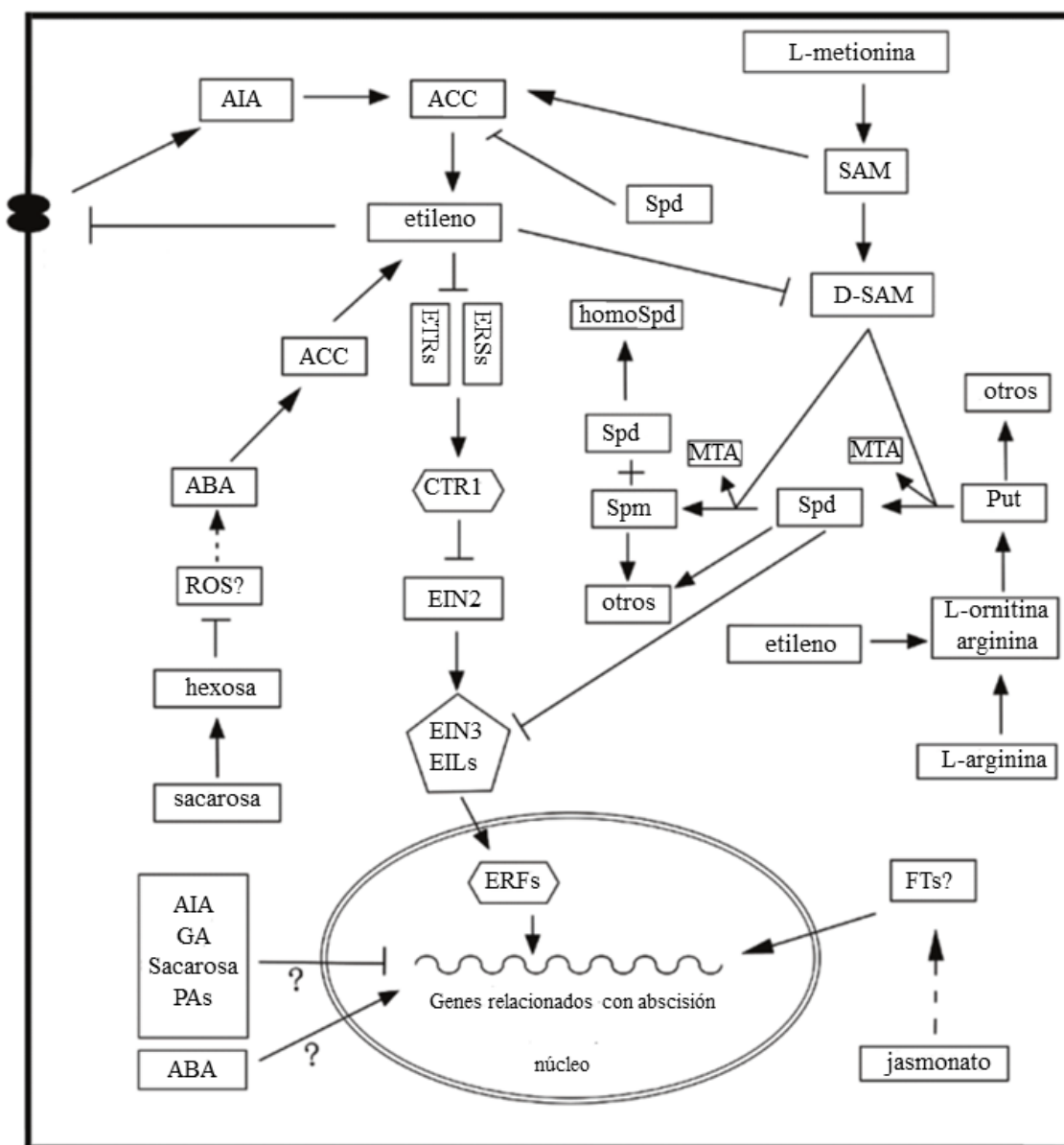
desde frutos de uva (Kühn y cols., 2014). La comprensión detallada de los eventos moleculares con respecto a la interacción entre auxina y etileno permanecen desconocidos. La fitohormona ABA parece tener un efecto acelerador de abscisión mediante el incremento en los niveles de ACC (Bangerth 2000, Gómez-Cadenas y cols. 2000). Por tanto, la abscisión de frutos está determinada por las concentraciones relativas de IAA y ABA (Racskó y cols. 2006). Todavía no está claro si el ABA es capaz de iniciar la abscisión de frutos directamente. El ABA podría estar involucrada en la detección de deficiencias de azúcares y relacionar así la escasez de azúcares con la abscisión de frutos (Gómez-Cadenas y cols., 2000).

Basados en datos transcriptómicos, la señalización por especies reactivas del oxígeno (ROS) podría estar implicada en la escasez de azúcares y la señalización de ABA podría simultáneamente organizar la interacción entre sacarosa y ROS (Botton y cols., 2011). Una interacción entre ABA y ROS también ha sido propuesta en la abscisión de manzana (Giulia y cols., 2013). La interacción ABA-etileno mediante proteínas relacionadas podría llevar a la abscisión de frutos. El estrés energético producido por defoliación produce cambios en el metabolismo celular que implica activación de rutas de transducción de señales (etileno, auxina y ABA), actividad de protein-kinasas (LRR-RLK) y actividad de FTs (AP2/ERF, bHLH, LBD, GRAS) (Li y cols., 2015). Un gen que codifica una proteína quinasa activada por AMP podría participar en la interacción ABA-sacarosa. Este gen aumenta su expresión en los frutos en abscisión (Botton y cols., 2011). Otro gen, D-sorbitol-6-fosfato deshidrogenasa (S6PDH), podría actuar como un gen de respuesta a estrés mediado por ABA implicado en la interacción ABA-sacarosa (Zhu y cols., 2011). Los genes responsables en la interacción entre azúcares y hormonas relacionados con el control de la abscisión de frutos necesitan más investigación para comprender plenamente su funcionamiento. Especialmente, el papel de los azúcares como moléculas señal en la regulación directa de la biosíntesis de hormonas o en las rutas de señalización de abscisión de frutos debe ser evidenciado.

Durante la abscisión de la aceituna, un aumento en la producción de etileno se encuentra acompañado por una acumulación de Put libre con un aumento y una disminución de las actividades de arginina descarboxilasa (ADC) y SAMDC respectivamente, lo que señala a una relación entre el etileno y las rutas de biosíntesis de PA, los cuales coordinadamente controlan la abscisión de frutos (Gomez-Jimenez y cols. 2010, Parra-Lobato y Gomez-Jimenez 2011). La actividad de ADC y de la ornitina descarboxilasa (ODC) aumentaron por etileno exógeno aunque solo la actividad de ADC estuvo inhibida por  $\text{CoCl}_2$ , un inhibidor de



ACO asociado con la abscisión de frutos, lo que sugiere que la síntesis de Put via ADC está regulada principalmente por etileno mediante la estimulación de la actividad de ACO en la ZA del fruto (Gil-Amado y cols. 2011). Además, el  $\text{CoCl}_2$  aumentó las cantidades de Spd y Spm en la ZA del fruto mediante el aumento de la actividad de SAMDC lo que resulta en un aumento del flujo de SAM. Sin embargo, el etileno exógeno disminuyó la actividad de SAMDC así como la expresión del gen OeSAMDC1 (Gil-Amado y cols. 2011).



**Figura 2.** Integración de los mecanismos de abscisión de frutos. El etileno juega un papel fundamental en facilitar la abscisión de frutos. La auxina y el etileno mantienen un equilibrio importante en la zona de abscisión mediante mecanismos de feedback reguladores. Un segundo mecanismo de abscisión de frutos se produce por escasez de azúcares, lo que eleva el contenido en ABA. ABA y etileno son sinérgicos en cuando a abscisión de frutos. La relación entre las rutas de biosíntesis de etileno y PA, los cuales coordinadamente controlan la abscisión de frutos, se ajusta por SAMDC. El jasmonato lleva a la abscisión de frutos a través de un mecanismo independiente de etileno. AIA, ABA, GA, PAs y sacarosa se han sugerido como moléculas directamente involucradas en regular la abscisión de frutos (Adaptado de Xie y cols., 2013).

También se ha observado que la aplicación de etileno exógeno provoca el aumento de Put y disminuye la cantidad de otras PAs conjugadas, mientras que la inhibición del etileno provoca su aumento. Además se observó que la Spd provoca la represión de genes relacionados con la síntesis de etileno (Gil-Amado y Gomez-Jimenez, 2013). Dado que las rutas biosintéticas de etileno y PA están relacionadas a través de SAM, se observó que la relación antagónica entre etileno y PAs está principalmente regulada por la actividad de SAMDC (Gil-Amado y cols. 2011) y que todos los factores internos y externos que pueden afectar a la biosíntesis de PAs y etileno tienen gran potencial para alterar la actividad de SAMDC. Un apoyo adicional para indicar la competición entre estas dos rutas viene de las observaciones de que las expresiones de OeACS2 y OeEIL2 se encuentran bajo control negativo de Spd mientras que etileno exógeno induce su expresión durante la abscisión de fruto maduro en olivo (Parra-Lobato y Gomez-Jimenez 2011).

### **1.1.3.2. Degradación de la pared celular**

Los compuestos de la pared celular en la ZA, tales como la celulosa y la pectina, tienen que ser degradados antes de la abscisión del fruto. Esta es la etapa final del desarrollo de este proceso, y está caracterizado por incrementos de expresión génica y actividad enzimática de hidrolasas de pared celular incluyendo PGs, Endo-1,4- $\beta$ -D-glucanasa (EG),  $\beta$ -galactosidasa, expansina, y pectato liasa (Wu y Burns, 2004, Zhu y cols., 2011, Tsuchiya y cols., 2015). De estas hidrolasas de pared celular, PG y EG son las principales enzimas implicadas en la abscisión de frutos en muchas especies. Estas enzimas se encuentran directamente reguladas por el etileno (Kazokas y Burns 1998, Li y cols. 2010, Gil-Amado y Gomez-Jimenez, 2011, Ito y Nakano, 2015). Sin embargo, no hay información disponible sobre si otras hormonas, azúcares, PAs, y otros metabolitos también participan en su regulación.

PGs y EGs han sido aisladas y caracterizadas y parecen pertenecer a una familia multigénica. Por ejemplo, en manzana, solo un miembro de la familia génica PG, MdPG2 (pero no MdPG1) está asociado con la abscisión en fructificación (Li y Yuan 2008, Zhu *et al.* 2008, 2011); de manera similar, solo MdEG1, un miembro de MdEGs, participa en la abscisión de frutos. La expresión de MdPG2 puede ser aumentada por NAA en la ZA en fructificación pero es inhibido en la ZA del fruto maduro (Zhu *et al.*, 2008). Quizás, la diversificación en la función de los miembros de la familia génica concuerda con la demanda de regulación espacial y/o temporal haciendo a las plantas más adecuadas para sobrevivir.

## **1.2. Maduración del fruto**

Los frutos son una característica distintiva de Angiospermas, presentan una gran diversidad existiendo en un gran número de formas y tamaños. El fruto ancestral, seco y dehiscente, surgió probablemente en el periodo Cretácico Inferior, mientras que los frutos carnosos aparecieron en el Cretácico más tardío o en el Cenozoico temprano (Eriksson y cols., 2000). La evolución de los frutos desde las formas secas dehiscentes hasta frutos como las drupas o las bayas carnosas está relacionada con el aumento de los vertebrados, principales agentes de dispersión de semillas (Knapp, 2002). La maduración de frutos es un proceso del desarrollo complejo, altamente coordinado. En la madurez, los frutos secos presentan un pericarpo seco (Simpson, 2011). En frutos carnosos, la maduración resulta en la producción de un pericarpo carnoso, aromático y blando, atractivo para los animales, lo que facilita la dispersión de sus semillas (Giovannoni, 2001). El atractivo de los frutos carnosos se origina en importantes modificaciones citológicas en el tejido parenquimático durante la maduración, incluyendo degradación de clorofila, acumulación de carotenoides y flavonoides, desarrollo de aroma y sabor y ablandamiento de la pulpa (Rodríguez y cols., 2013). Los frutos son una importante fuente de compuestos nutritivos, ya que contienen minerales, vitaminas, fibra y antioxidantes beneficiosos para los seres humanos.

Desde un punto de vista agronómico, el valor nutricional, el sabor y la vida útil determinan la calidad de los frutos. Como se ha mencionado anteriormente, los principales cambios asociados con la maduración incluyen un cambio de color (pérdida de color verde e incremento en pigmentos no fotosintéticos que varían dependiendo de las especies y los cultivares), firmeza (ablandamiento causado por degradación de la pared celular y alteración de las propiedades de la cutícula), sabor (incremento en azúcar y disminución de ácidos orgánicos), y aroma (producción de compuestos volátiles que proporcionan el aroma característico). Las herramientas analíticas que permiten un fenotipado exhaustivo a nivel del transcriptoma (Alba y cols., 2005; Vriezen y cols., 2008; Matas y cols., 2011; Rohrmann y cols., 2011; Ye y cols., 2015), proteoma (Lee y cols., 2004; Rose y cols., 2004; Saravanan y Rose, 2004; Zheng y cols., 2013) y metaboloma (Fait y cols., 2008; Lombardo y cols., 2011; Ye y cols., 20) facilitan una visión en conjunto de la red metabólica (Carrari y cols., 2006; Deluc y cols., 2007; Grimplet y cols., 2007; Enfissi y cols., 2010; Zamboni y cols., 2010; Osorio y cols., 2011; Rohrmann y cols., 2011; Lee y cols., 2012; Pan y cols., 2013); estos análisis están comenzando a producir un conocimiento detallado de la regulación de los sistemas que subyacen al desarrollo de frutos.

### 1.2.1. Regulación hormonal y transcripcional de la maduración

Según su tipo de maduración, existen dos tipos de frutos, climatéricos y no climatéricos. En climatéricos como manzana, plátano, tomate y aguacate, se da un repentino aumento en la respiración al comienzo de la maduración, la cual está acompañada por síntesis autocatalítica de etileno (Giovannoni, 2004). Por el contrario, existe una mínima o casi inexistente producción de etileno en la maduración de frutos no climatéricos como la uva, cítricos, fresa o piña (Giovannoni, 2004). Sin embargo, hay muchas características de la maduración de frutos que son comunes a ambos tipos, indicando que existe un solapamiento en los mecanismos moleculares que subyacen al proceso de maduración, a pesar de las diferencias en la respiración y la producción de etileno (Saladié y cols., 2015). La síntesis de etileno en frutos climatéricos es esencial para la maduración normal del fruto y el bloqueo tanto de la síntesis como de la percepción de esta hormona impide la maduración (Hamilton y cols., 1990; Oeller y cols., 1991; Rottmann y cols., 1991; Barry y cols., 1996). Los estudios realizados sobre la regulación transcripcional durante el desarrollo del carpelo y el fruto se centraron primero en las silicuas dehiscentes de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Liljegren y cols., 2000; Dinneny y cols., 2005). Estos estudios aclararon el papel de algunos factores de transcripción MADS-box en la especificidad de tejido y el mecanismo de dehiscencia. Entre ellos, los genes redundantes SHATTERPROOF 1/2 (SHP, miembros de la subfamilia AGAMOUS) que especifican los márgenes de las valvas en la silicua. Cuando este gen es mutado, los frutos se vuelven indehiscentes. Sin embargo, a pesar de las notables diferencias entre los frutos secos y carnosos, sucesivos estudios, principalmente centrados en tomate, han mostrado la participación en la regulación de la maduración de varios ortólogos de estos genes MADS-box previamente caracterizados en *Arabidopsis* (Pnueli y cols., 1994; Itkin y cols., 2009; Vrebalov y cols., 2009; Giménez y cols., 2010; Bemer y cols., 2012, Saladié y cols., 2015).

Actualmente está claro que una parte de las redes de regulación esenciales para el desarrollo del fruto han sido conservadas durante la evolución de los frutos carnosos (Smaczniak y cols., 2012; Seymour y cols., 2013). Importantes avances en la comprensión de los mecanismos que regulan la maduración han provenido de la caracterización de mutantes de tomate monogénicos: ripening-inhibitor (*rin*), non-ripening (*nor*) colorless non-ripening (*Cnr*), green-ripe (*Gr*), green flesh (*gf*), high pigment 1 (*hp1*), high pigment 2 (*hp2*), y never-ripe (*Nr*; Lanahan y cols., 1994; Mustilli y cols., 1999; Vrebalov y cols., 2002; Liu y cols., 2004; Barry y Giovannoni, 2006; Manning y cols., 2006; Barry y cols., 2008).

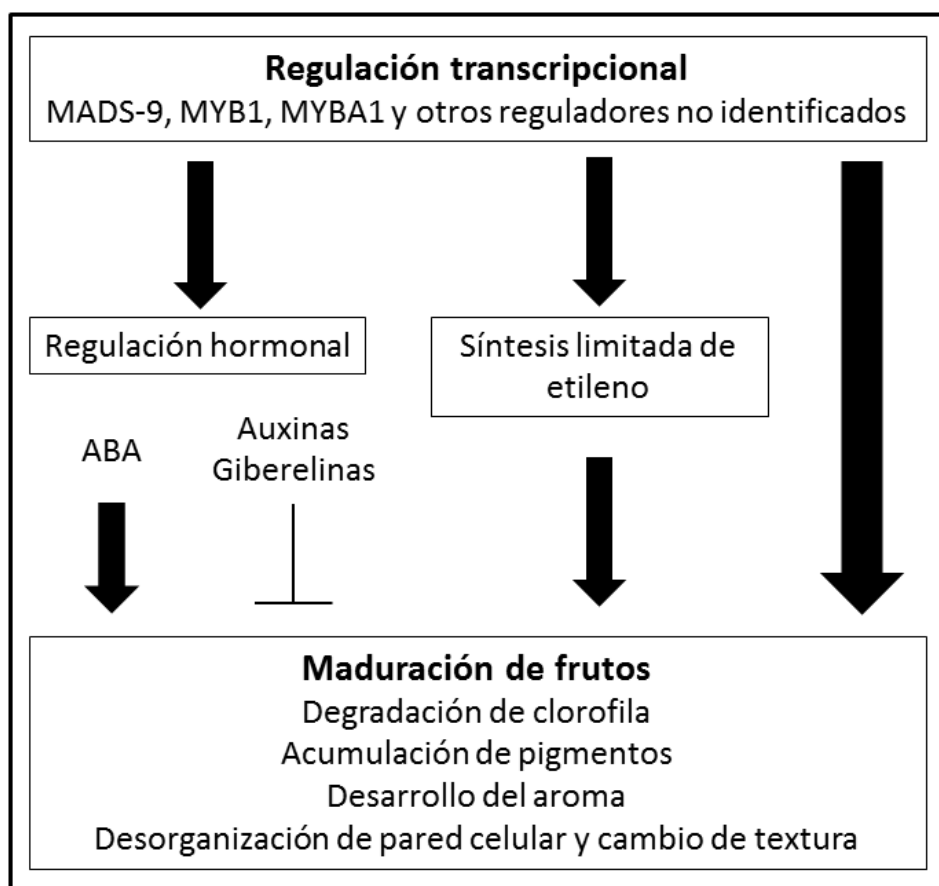
## Introducción

El mutante *rin* codifica una proteína MADS-box parcialmente eliminada de la subfamilia SEPALLATA (*SEP4*; Hileman y cols., 2006), mientras que la mutación *Cnr* consiste en un cambio epigenético que altera la metilación del promotor de la proteína SQUAMOSA PROMOTOR BINDING (*SPB*), *NOR* es un miembro de la familia de factores de transcripción NAC-domain (Giovannoni, 2007). Un estudio en el cual se combinaron análisis de transcriptoma, proteoma y de metabolitos específicos durante el desarrollo y la maduración de mutantes *nor* y *rin* ha ayudado a aclarar la expresión regulada por etileno de genes corriente abajo y arrojó luz al conocimiento de esta hormona en la regulación de proteínas y metabolitos en la maduración de tomate (Osorio y cols., 2011). Estos datos apoyaron la perspectiva de que *nor* y *rin* actúan juntos en una cascada de transducción de señales para controlar la maduración (Giovannoni y cols., 1995; Thompson y cols., 1999) y también sugirieron que *nor* tiene un efecto más global sobre la expresión génica relacionada con el etileno y la maduración que *rin*, lo cual indica que *NOR* probablemente opere corriente arriba de *RIN*. Recientemente, a través de una aproximación combinada basada en inmunoprecipitación de cromatina y análisis de transcriptoma, se han proporcionado evidencias de que *RIN* interactúa con los promotores de más de 200 genes, modulando la expresión de sus dianas activándolas o reprimiéndolas. Los genes diana de *RIN* son reguladores principales del control de la maduración tales como *CNR* y *NOR*, o pertenecen (Martel y cols., 2011) a rutas conocidas que son activas durante la transición de los frutos verdes a maduros (ej: acumulación de carotenoides, degradación de clorofila, y síntesis y percepción de etileno; Fujisawa y cols., 2013). Recientemente, ha sido observado que genes relacionados con el metabolismo, regulados por *RIN*, presentan una secuencia en su promotor conocida como CarG box (Irfan y cols., 2014).

En frutos no climatéricos como el pimiento, algunos cultivares parecen ser insensibles a etileno, mientras que otros cultivares tratados con etileno exógeno fueron capaz de estimular la expresión de genes específicos de maduración (Armitage, 1989; Ferrarese y cols., 1995; Harpster y cols., 1997; El-Kereamy y cols., 2003). En fresa, la cual ha emergido como modelo principal de maduración no climatérica, el etileno es relativamente alto en frutos verdes, desciende en los frutos blancos y finalmente se incrementa de nuevo en la etapa roja de la maduración (Perkins-Veazie y cols., 1996; Iannetta y cols., 2006). Este último ascenso está acompañado por un nivel más elevado de respiración que recuerda al producido en frutos climatéricos al comienzo de la maduración (Iannetta y cols., 2006). Para entender mejor la función del etileno durante la maduración de la fresa han sido utilizados diferentes aproximaciones. La aplicación externa de etileno provocó la disminución de muchos genes relacionados con pared celular, tales como  $\beta$ -galactosidasa,

pectinmetilesterasa, o  $\beta$ -xilosidasa (Trainotti y cols., 2001; Castillejo y cols., 2004; Bustamante y cols., 2009), mientras que la expresión de otros genes tales como expansina, FaEXP2 (Civello y cols., 1999) era insensible a etileno. Recientes estudios a niveles transcriptómico y metabolómico en frutos de fresas transgénicas con sensibilidad reducida a etileno indican que la acción del etileno es necesaria para un desarrollo normal del fruto, actuando de manera diferente en las dos partes del fruto de fresa, los aquenios y el receptáculo (Merchante y cols., 2013). Estos resultados muestran que, aunque no es tan relevante como en frutos climatéricos, el etileno podría sin embargo participar en la maduración de fresas.

Estudios comparativos de transcriptoma y metaboloma durante los procesos de maduración de frutos climatéricos y no climatéricos (tomate y pimiento respectivamente) sugieren que ambas especies tienen componentes similares de señalización mediados por etileno (Osorio y cols., 2013). En pimiento, la regulación de estos genes es, sin embargo, claramente diferente y podría reflejar una sensibilidad alterada a etileno u otros reguladores diferentes al etileno que en tomate (Osorio y cols., 2012). A diferencia de la situación descrita en tomate, los genes de biosíntesis de etileno 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) sintasa y ACC oxidasa, no están inducidos en pimiento. Sin embargo, los genes corriente abajo de la percepción de etileno, tales como los genes relacionados con pared celular, el factor 3 de respuesta a etileno (ERF3), y los genes de biosíntesis de carotenoides si están inducidos durante la maduración de este fruto (Osorio y cols., 2012). Otros genes comúnmente regulados entre frutos climatéricos y no climatéricos también han sido descritos. En fresa, un gen SEPALLATA (SEP1/2; MADS-box) es necesario para un desarrollo y maduración correctos (Seymour y cols., 2011). Similarmente, en banana, la cual es clasificada como fruto climatérico, el gen MADS-box SEP3 también muestra una expresión relacionada con la maduración (Elitzur y cols., 2010). En manzana, la expresión del gen MADS2 también está asociada con la firmeza del fruto (Cevik y cols., 2010), mientras que en arándano, el ortólogo SQUAMOSA MADS-box del gen TDR4 de tomate, participa en la regulación de la biosíntesis de antocianina (Jaakola y cols., 2010; Fig 3) Dong y cols., (2014) también han corroborado la participación de un gen SEP en la maduración de tomate y pimiento.



**Figura 3.** Visión general de la regulación de la maduración en frutos no climatéricos (Adaptado de Osorio y cols., 2013).

El conocimiento actual sobre la participación de otras hormonas diferentes a etileno en el desarrollo y maduración de frutos climatéricos y no climatéricos es limitado. En tomate, pimiento, banana, melón y fresa, la auxina libre más abundante, ácido 3-indolacético (IAA), desciende previamente al comienzo de la maduración (Osorio y cols., 2013).

Esta reducción está acompañada por un incremento de su forma conjugada (IAA-Asp; Bottcher y cols., 2010), el gen IAA aminosintasa (GH3) es el encargado de catalizar la reacción de conjugación. En tomate, 15 miembros de la familia génica GH3 han sido descritos, pero solo dos de ellos muestran un patrón de expresión asociado con maduración (Kumar y cols., 2012). Los frutos de tomate que sobreexpresan el gen de pimiento GH3 muestran una anticipación de la maduración (Liu y cols., 2005), lo cual concuerda con la visión de que el ratio entre IAA y su forma conjugada podría, más que el nivel de IAA por sí mismo, contribuir a la regulación temporal de la maduración (Bottcher y cols., 2010). En frutos no climatéricos, ningún regulador del crecimiento parece jugar un papel análogo al realizado por el etileno, pero se ha observado que la auxina puede controlar negativamente la maduración de algunos frutos no climatéricos.

En fresa, se ha observado que la expresión de muchos genes específicos de maduración puede ser disminuida mediante tratamientos con auxina exógena. También en uva, la auxina parece jugar un papel negativo en la regulación de la maduración ya que tratamientos con auxina sintética retrasan la expresión de algunos genes relacionados con maduración (Davies y cols., 1997). En tomate se ha encontrado un aumento de expresión de genes relacionados con la señalización de auxina durante la maduración (Saldíe y cols., 2015), y una regulación de genes de biosíntesis y señalización de auxina mediada por RIN (Kumar y cols., 2015)

Como consecuencia del papel de la auxina en el desarrollo y maduración de algunos frutos no climatéricos se ha prestado poca atención a la posible participación de otras hormonas vegetales tales como las giberelinas (GAs). En fresa, ha sido demostrado que la aplicación externa de GA3 a frutos en maduración causó un retraso significativo en el desarrollo del color rojo (Martinez y cols., 1996) y modificó la expresión de genes involucrados en expansión celular (de la Fuente y cols., 2006) y en desorganización de pared celular (Bustamante y cols., 2009). La expresión de genes relacionados con la biosíntesis y señalización de GAs ha sido observada en maduración de tomate (Kumar y cols., 2015).

En plantas, la fitohormona ácido abscísico (ABA) es conocida por estar involucrada en varios aspectos del crecimiento y desarrollo de plantas así como en respuestas a estreses del medio ambiente (Leung y Giraudat, 1998; Finkelstein y Rock, 2002; Himmelbach y cols., 2003; Hirayama y Shinozaki, 2007). ABA promueve la acumulación de azúcar en frutos carnosos (Yamaki y Asakura, 1991; Kobashi y cols., 1999; Richings y cols., 2000; Pan y cols., 2005) y participa en la regulación de maduración en frutos climatéricos y no climatéricos (Coombe, 1992; Davies y cols., 1997; Giovannoni, 2001; Rodrigo y cols., 2003; Zhang y cols., 2009; Sun y cols., 2012). En tomate, la supresión del gen que cataliza el primer paso de la biosíntesis de ABA (NCED1: 9-Cis-EpoxiCarotenoide Dioxigenasa) resulta en la disminución de algunos genes de pared celular relacionados con la maduración tales como las poligalacturonasas y pectinmetilesterasas, así como un incremento en la firmeza y una vida útil más larga (Sun y cols., 2012). En estudios más recientes se ha relacionado el tratamiento con ABA exógeno con la aceleración de la maduración en tomate, ya que regula positivamente muchos genes de importancia en el proceso (Mou y cols., 2015). Además se han encontrado genes que regulan la síntesis y catabolismo de ABA involucrados también en la maduración de tomate (Ji y cols., 2014).



De manera similar, la reducción de la expresión de NCED se correlaciona con un retraso en la maduración de fresas (Jia y cols., 2011). ABA está considerado como un inductor de la maduración en fresa y uva (Chai y cols., 2011; Jia y cols., 2011). Los mecanismos de la señalización de esta hormona no son conocidos totalmente, sin embargo, en uva, el análisis del promotor de GH3 identificó elementos ABRE-like, lo cual podría indicar que el ratio del contenido ABA/auxina es relacionado con la iniciación de la maduración (Perkins-Veazie, 1995; Jiang y Joyce, 2003; Bottcher y cols., 2010).

En los últimos años, el nivel de conocimiento de los eventos moleculares en los niveles transcripcionales, bioquímicos, hormonales y de metabolitos que subyacen a la maduración en frutos climatéricos y no climatéricos han aumentado considerablemente. Sin embargo, aún se conoce poco sobre el interruptor que responde a hormonas durante la transición de fruto inmaduro a maduro. Hasta la fecha, los estudios publicados sobre regulación transcripcional y metabólica son de una baja resolución en cuanto a los niveles espacial y temporal y restringidos en cuanto a la cobertura de varias entidades moleculares celulares. Sin embargo, nuevas tecnologías emergentes así como herramientas estadísticas mejoradas (Klie y cols., 2011) permitirán mejorar la capacidad analítica con el objetivo de hacer frente al estudio de la compartimentación subcelular y contrastar el comportamiento de diferentes tipos celulares (Caldana y cols., 2012). Adicionalmente, la disponibilidad de datos de secuencia de genoma de frutos de alta calidad (Jaillon y cols., 2007; Shulaev y cols., 2011; Tomato Genome Consortium, 2012) ayudará a nuestra comprensión sobre la regulación genética de desarrollo y maduración de frutos.

### **1.3. Transportadores ABC**

Las proteínas ABC (ATP-binding cassette) constituyen una de las familias proteicas más numerosas, presentes en todo tipo de organismos, desde procariotas hasta humanos (Henikoff y cols., 1997). Su función principal es el transporte de una gran variedad de compuestos a través de membranas biológicas, aunque algunos miembros de esta familia ejercen otras funciones. Para el transporte utilizan la energía liberada en la hidrólisis de ATP. Esto se produce de manera independiente al gradiente del sustrato y los potenciales de membrana (Kretzschmar y cols., 2011, Andolfo y cols., 2015).

Inicialmente, se pensó que los transportadores ABC eucarióticos estaban involucrados exclusivamente en la extrusión de compuestos desde el citosol, ya que originalmente fueron identificados como transportadores que participaban en la detoxificación celular.

Estudios posteriores mostraron que los transportadores ABC están presentes en la mayoría de membranas celulares y participan en otros procesos diferentes (Nguyen y cols., 2014). Hasta hace poco, se asumía que las proteínas ABC transportaban los sustratos unidireccionalmente, sin embargo, descubrimientos posteriores demostraron que al menos los transportadores ABC de plantas pueden actuar también en dirección opuesta (Shitan y cols., 2003).

En plantas, las proteínas ABC también fueron identificadas originalmente como transportadores involucrados en los procesos finales de detoxificación, por ejemplo, deposición vacuolar (Martinoia y cols., 1993). Desde este descubrimiento, numerosos estudios han ido demostrando que las funciones de este tipo de transportadores se extienden mucho más allá de la detoxificación (Kretzschmar y cols., 2011; Andolfo y cols., 2015). Se ha observado frecuentemente que los transportadores ABC están involucrados en procesos tan diversos como respuesta a patógenos, deposición de lípidos en la superficie, acumulación de fitato en semillas, o transporte de las hormonas auxina y ácido abscísico (Kang y cols., 2013). Por tanto, los transportadores ABC juegan un papel importante en el crecimiento de órganos, nutrición vegetal, desarrollo de la planta, respuesta a estreses abióticos y la interacción de la planta con el medio.

Entre los compuestos que son transportados por estas proteínas se encuentran moléculas como lípidos, fitohormonas, carboxilatos, metales pesados, catabolitos de clorofila y conjugados xenobióticos (Andolfo y cols., 2015). La mayoría de miembros caracterizados en plantas se han encontrado en la membrana plasmática y el tonoplasto y participan en secreción celular y secuestro vacuolar de sustancias. Otros miembros, por el contrario se han encontrado en membranas mitocondriales, de plastidios y membranas de peroxisomas, por lo que participarían en procesos diferentes (Kretzschmar y cols., 2011). Según su estructura y función, las proteínas pertenecientes a esta familia se clasificaron en 8 familias en humanos: ABCA-ABCH, este tipo de clasificación se adoptó posteriormente para los miembros identificados en plantas (Verrier y cols., 2008).

### **1.3.1. Estructura**

La estructura mínima de los miembros pertenecientes a la familia de transportadores ABC requiere un dominio altamente conservado de unión a nucleótido (NBD – Nucleotide Binding Domain) y un dominio transmembrana, que está menos conservado (TMD – Transmembrane Domain)(Kang y cols., 2011). Dentro del dominio NBD se encuentran los

motivos Walker A y B que unen la molécula de ATP y loops H y Q para su hidrólisis. El dominio TMD forma el poro de membrana y sitio de unión al ligando mediante estructuras  $\alpha$ -hélices y además, determina la especificidad de sustratos. Un transportador ABC típico de unión a membrana contiene cuatro dominios: dos TMDs y dos NBDs que pueden estar formados a partir de uno o dos genes, conocidos respectivamente como transportadores heterodímeros u homodímeros (Andolfo y cols., 2015). Los miembros de tamaño completo están organizados de una manera modular, consistiendo en dos dominios TMD formadores de poro de membrana alternos con dos dominios citosólicos NBD. Los miembros de medio tamaño, contienen un dominio TMD y otro NBD y forman los dímeros, que actúan como unidades funcionales. En la mayoría de subfamilias (ABCA – ABCD), los dominios TMD preceden a los NBD, una topología que es conocida como orientación hacia delante, mientras que la opuesta se considera como orientación reversa, solo presente en la subfamilia ABCG (Nguyen y cols., 2014).

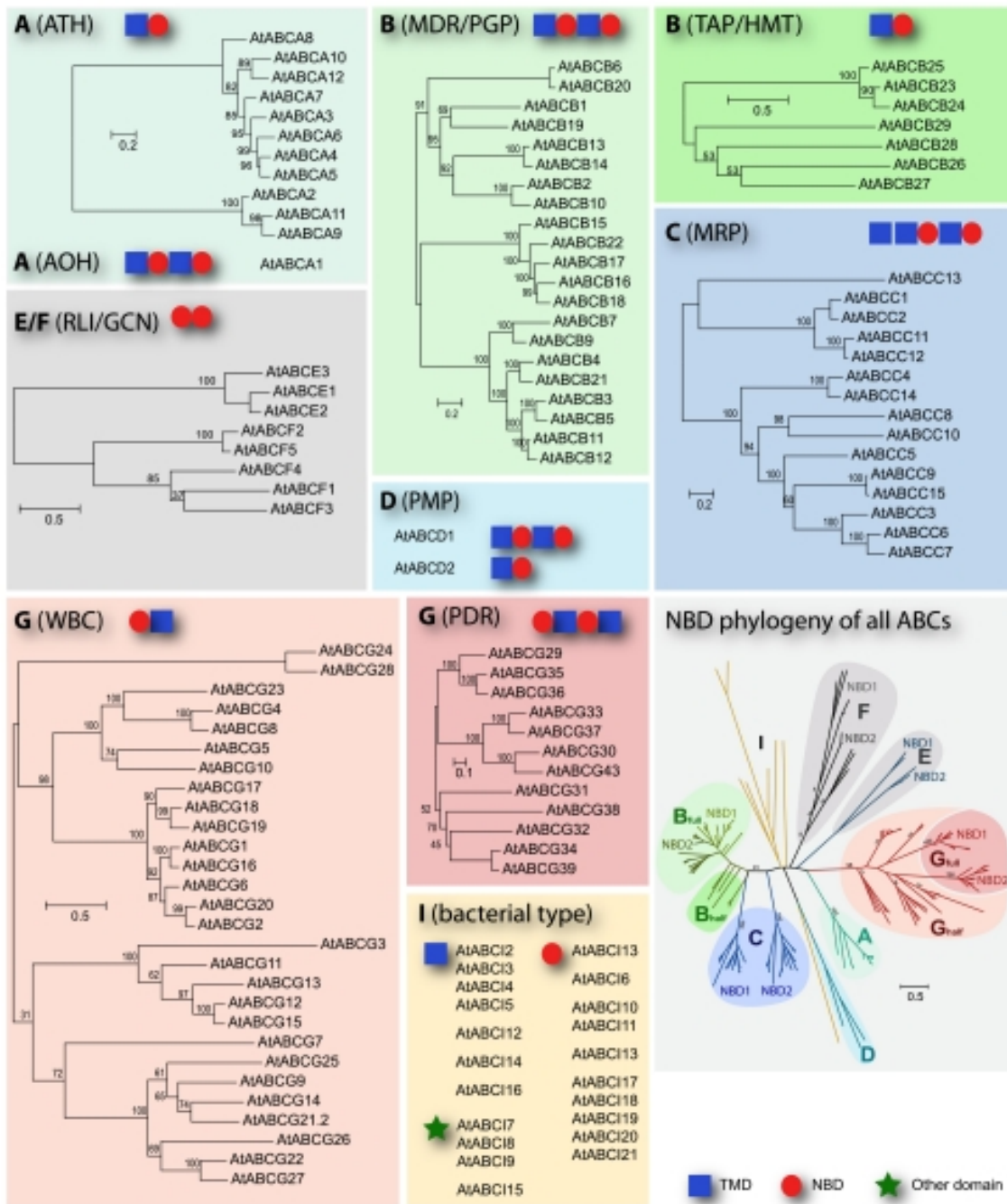
Una característica común de las proteínas ABC es la presencia de la denominada como firma ABC, que contiene la siguiente secuencia de aminoácidos: [LIVMFY]S[SG]GX3[RKA][LIVMYA]X[LIVFM][AG]. Esta secuencia consenso es el caso general aunque también existen algunas excepciones (Rea, 2007).

### 1.3.2. Clasificación y subfamilias

Debido a diferencias entre el tamaño de la proteína, la orientación (organización de dominios) y la secuencia del dominio TMD, los transportadores ABC de plantas se clasifican actualmente en 8 subfamilias: ABCA-ABCI, exceptuando a la subfamilia ABCH de la que no se ha encontrado ningún miembro en plantas (Verrier y cols., 2008). En la figura 4 se presenta un esquema representando las diferentes familias con su estructura y miembros encontrados en *Arabidopsis thaliana*.

De manera general, las subfamilias desde ABCA a ABCD se caracterizan por una orientación hacia delante de sus dominios (TMD-NBD) mientras que la familia ABCG presenta una orientación reversa NBD-TMD. Las familias E y F están formadas por miembros solubles que solo codifican para NBDs y no para TMD. Por último, los miembros de la subfamilia ABCI presentan dominios independientes, pudiendo ser dominios NBD u otros dominios accesorios (Pang y cols., 2013).

## Introducción



**Figura 4.** Subfamilias de proteínas ABC, con sus relaciones filogenéticas más probables y un análisis filogenético de los dominios NBDs de todas las proteínas ABC de *Arabidopsis thaliana*

- **ABCA:**

En *Arabidopsis thaliana*, esta subfamilia cuenta con 1 miembro de tamaño completo, AtABCA1 conocido también como AOH (ABCA One Homologue) y 11 miembros de medio tamaño que forman el subgrupo ATH (ABCA Two Homologue) (Verrier y cols., 2008). La proteína AtABCA1 es el transportador ABC

de mayor tamaño en esta especie, ya que posee un gran dominio linker. Los miembros de la subfamilia ABCA aún no han sido caracterizados funcionalmente aunque se piensa que pueden participar en metabolismo de lípidos como esteroides (Rea, 2007; García y cols., 2011; Pang y cols., 2013). La localización subcelular de estas proteínas es también desconocida.

▪ **ABCB:**

El genoma de *Arabidopsis* codifica para 21 proteínas ABCB de tamaño completo englobadas en el subgrupo MDR/p-GP (Multidrug Resistance/p-glycoprotein) y siete de medio tamaño, tres de ellas forman el subgrupo ATM (ABC transporter of the mitocondria), mientras que las cuatro restantes se agrupan dentro del conjunto TAP (Transporter associated with antigen processing). Hasta la fecha, todas las proteínas de tamaño completo han sido localizadas en la membrana plasmática (Blakeslee y cols., 2007; Rea, 2007; Lee y cols., 2008). Los miembros del subgrupo ATM han sido localizados en la mitocondria (Rea, 2007), mientras que dentro del subgrupo TAP se han localizado miembros tanto en cloroplasto (AtABCB26) como en la membrana vacuolar (AtABCB27) (Ferro y cols., 2010; Jaquinod y cols., 2007). En cuanto a sus funciones, los miembros de tamaño completo (MDR) están asociados con la resistencia múltiple a drogas y el transporte de lípidos en humanos. En plantas han sufrido una gran diversificación funcional, y existen evidencias de su participación en el transporte de auxinas, metabolitos secundarios y xenobióticos (Geisler y Murphy, 2006; Shitan y cols., 2003; Geisler y cols., 2005; Santelia y cols., 2005; Terasaka y cols., 2005; Yazaki, 2006; Wu y cols., 2007; Lewis y cols., 2007; Cho y cols., 2007). Dentro del subgrupo ATM encontramos al transportador AtABCB25, el cual es requerido para el exporte de grupos hierro-azufre desde la matriz mitocondrial (Chen y cols., 2007). Los miembros del subgrupo TAP aún no han sido caracterizados funcionalmente en plantas, estos transportadores están asociados con el transporte de péptidos y lípido A en otros organismos (Dassa y Bouige, 2001; Rea, 2007; García y cols., 2004), también se ha relacionado a AtABCB27 con la resistencia a aluminio (Larsen y cols., 2007).

▪ **ABCC:**

Dentro de esta subfamilia solo se encuentran transportadores de tamaño completo. Como característica específica, todos ellos presentan un dominio transmembrana adicional (TMD0) (Tusnády y cols., 2006; Klein y cols., 2006). La función de este dominio es desconocida en plantas, sin embargo, en algunas ABCCs de humanos y levaduras se ha observado que está involucrado en

señalización (Mason y Michaelis, 2002; Westlake y cols., 2005). La mayoría de las proteínas ABCC se localizan en la membrana vacuolar (Rea, 2007; Nagy y cols., 2009), siendo hasta la fecha, los únicos transportadores ABC encontrados en el tonoplasto de *Arabidopsis*. Estudios bioquímicos del secuestro vacuolar de conjugados de glutatión llevaron al descubrimiento de esta subfamilia de proteínas, también conocida como MRP (Multidrug resistance associated protein). Sin embargo, actualmente está claro que sus miembros participan en más procesos aparte de la detoxificación (Wanke y cols., 2010), ya que se ha observado que los transportadores ABCCs de *Arabidopsis* son activos en el transporte vacuolar de otros compuestos, incluyendo glucurónidos, y catabolitos de clorofila, además, también se ha observado que confieren resistencia a cadmio en levaduras (Martinoia y cols., 2002; Klein y cols., 2006). Estudios en maíz han demostrado también la participación de miembros de esta subfamilia en la compartimentación vacuolar de antocianina y la modulación del fitato en las semillas (Goodman y cols., 2004; Shi y cols., 2007). Existen evidencias que sugieren que las proteínas AtABCC4 y AtABCC5 juegan papeles clave en la regulación de los canales iónicos de la membrana plasmática de las células de guarda (Klein y cols., 2006; Suh y cols., 2007). Además se ha sugerido que proteínas ABCC pueden participar en el transporte de sustancias tóxicas durante la respuesta a patógenos (Wanke y cols., 2010).

▪ **ABCD:**

Esta subfamilia contiene predominantemente proteínas de medio tamaño con una estructura TMD-NBD, las cuales homodimerizan y heterodimerizan para formar transportadores asociados con el importe peroxisomal de ácidos grasos. En el genoma de *Arabidopsis*, se han identificado dos miembros de esta subfamilia: AtABCD1 y AtABCD2. El primero es requerido para el transporte hacia el peroxisoma de sustratos para la  $\beta$ -oxidación y el ciclo del glioxilato. Mutaciones en este gen provocan defectos en germinación y fertilidad (Footitt y cols., 2006; Footitt y cols., 2007; Theodoulou y cols., 2006; Hooks y cols., 2007). Por otra parte, AtABCD2 codifica para un transportador de medio tamaño que aún no ha sido caracterizado (Sánchez-Fernandez y cols., 2001; Theodoulou y cols., 2006). Recientemente se ha observado que HvABCD1 y HvABCD2 participan en el metabolismo de ácidos grasos, jasmonatos y en la determinación del tamaño del grano y revirtieron total y parcialmente los efectos causados por la mutación de otra proteínas ABCD de *Arabidopsis*, lo que sugiere una conservación de la función (Mendonzo y cols., 2014)

▪ **ABCE y ABCF:**

Los miembros de estas familias son conocidos como transportadores solubles, ya que no poseen ningún dominio transmembrana detectable, en cambio presentan dos dominios NBD (Kang y cols., 2011). Es posible que funcionen en otros procesos distintos al transporte, como es el caso de sus ortólogos de humanos y levaduras, que participan en el reciclaje de ribosomas y el control transcripcional (Vazquez de Aldana y cols., 1995; Tyzack y cols., 2000; Braz y cols., 2004; Dong y cols., 2004; Pisarev y cols., 2010). La subfamilia ABCE está muy conservada en arqueobacterias así como en eucariotas, lo que podría indicar que realizan una función fundamental conservada. Esto concuerda con el papel de un miembro de esta subfamilia en levaduras, RLI1 (RNase L inhibitor), en la traducción de proteínas, y el hecho de que los homólogos de este miembro en plantas están involucrados en la supresión del silenciamiento de ARN (Braz y cols., 2004; Sarmiento y cols., 2006). Los miembros de plantas de la subfamilia F no han sido caracterizados funcionalmente, pero en levaduras y humanos contribuyen al control de la traducción a través de la activación de la quinasa eIF-2 $\alpha$  (Verrier y cols., 2008).

▪ **ABCG:**

Se trata de la mayor subfamilia de transportadores ABC. En *Arabidopsis* contiene 28 proteínas de medio tamaño (WBC - White-brown complex homologue) y 15 de tamaño completo (PDR - Pleiotropic drug resistance) (Verrier y cols., 2008). Todos los miembros de la subfamilia ABCG comparten la característica especial de poseer una organización reversa de dominios en su estructura (NBD-TMD) (Andolfo y cols., 2015). Los genes que codifican proteínas ABCG de tamaño completo han sido solamente identificados en plantas, hongos, oomicetos, algas pardas y mohos (Anjard y Loomis, 2002; Tyler y cols., 2006; Cock y cols., 2010). Todos los transportadores ABCGs de tamaño completo y medio caracterizadas, exceptuando a AtABCG19, se localizan en la membrana plasmática (Lee y cols., 2005; Stein y cols., 2006; McFarlane y cols., 2010; Kang y cols., 2010b; Kuromori y cols., 2010; Růžička y cols., 2010; Choi y cols., 2011). La función de los transportadores WBC era desconocida hasta el descubrimiento de que AtABCG11 (AtWBC11) y AtABCG12 (AtWBC12) son necesarios para exportar lípidos de la cutícula (Pighin y cols., 2004; Bird y cols., 2007). Análisis utilizando mutantes de ambos miembros mostraron que los dos son necesarios para el exporte de componentes cerosos como los alcanos, mientras que solo AtABCG11 es requerido para la acumulación normal de cutina en la superficie de la planta

(Pighin y cols., 2004; Bird y cols., 2007; Luo y cols., 2007; Panikashvili y cols., 2007; Ukitsu y cols., 2007). Otros miembros presentan funciones diferentes, como AtABCG19 (AtWBC19) que confiere resistencia a kanamicina, aunque esta función no es una característica general del subgrupo WBC (Mentewart y Stewart, 2005). En hongos, los miembros del subgrupo PDR están involucrados en resistencia a ácidos débiles, drogas, fungicidas y compuestos defensivos vegetales (Crouzet y cols., 2006). Sus funciones en plantas parecen ser similarmente diversas, incluyendo resistencia a patógenos, plomo, terpenoides antimicrobianos y herbicidas auxínicos (Lee y cols., 2005; Kim y cols., 2007; Stein y cols., 2006; Kobae y cols., 2006; Ito y cols., 2006). También se han sugerido papeles en producción de compuestos volátiles y en señalización, debido al patrón de expresión de genes PDR en flores y superficie de raíces y hojas (Crouzet y cols., 2006; Sugiyama y cols., 2006).

▪ **ABCH:**

Esta subfamilia contiene transportadores de medio tamaño, con una organización reversa de dominios (NBD-TMD), presentan homología con transportadores de procariotas implicados en resistencia a drogas. No ha sido caracterizado ningún miembro de esta subfamilia en plantas hasta la fecha (Nguyen y cols., 2014).

▪ **ABCI:**

Esta subfamilia está formada por componentes de transportadores multisubunidad. Las plantas poseen una colección de proteínas ABC que presentan similitudes a los componentes de los transportadores ABC multisubunidad de procariotas (Kang y cols., 2011). Estos genes de forma separada codifican para el núcleo y los dominios accesorios de estos transportadores. En plantas se ha predicho que muchos de los miembros ABCI estaban relacionados con la mitocondria y el cloroplasto ya que algunos están codificados en su material genético (Verrier y cols., 2008; Shimon-Shor y cols., 2010). Algunos de los miembros de la subfamilia ABCI se originaron a partir de los progenitores endosimbiontes de las mitocondrias y cloroplastos, pero la gran mayoría se encuentran en el genoma nuclear y poseen los intrones propios de eucariotas. Esto complicó al principio su análisis, ya que algunos componentes como las subunidades TMD no se reconocen inmediatamente por su secuencia primaria, haciendo la identificación y agrupamiento de estos transportadores problemática (Sánchez-Fernández y cols., 2001). Sin embargo, con la adquisición de nuevas pruebas genéticas y a través de comparación con los transportadores



## *Introducción*

ABC conocidos de bacterias (Dassa y Bouige, 2001; García y cols., 2004), el listado de subunidades ABCI de plantas se ha extendido para incluir otros dominios aparte de NBD y TMD como son los homólogos de proteínas solubles citosólicas que interactúan con NBDs, así como supuestas proteínas de unión a sustrato similares a las proteínas de unión periplasmática de bacterias (Pang y cols., 2013). Ya que aún quedan otras subunidades sin descubrir a las que los componentes ABC se unen, es probable que la subfamilia ABCI experimente cambios a medida que vaya apareciendo más información experimental (Verrier y cols., 2008).

El estudio funcional de los transportadores ABC de plantas avanza rápidamente en la actualidad. La evidencia de que el transporte mediado por proteínas ABC no solo sirve para detoxificar aumenta, ya que está siendo demostrado que este tipo de proteínas son indispensables para el correcto desarrollo de las plantas, una adecuada interacción con el medio ambiente y para procesos metabólicos básicos (Kang y cols., 2011; Nguyen y cols., 2014) . No parece haber una clara separación funcional entre las diferentes subfamilias aunque es posible trazar algunas líneas generales en cuanto a las preferencias específicas de sustratos de cada una.

Miembros de la subfamilia ABCB han sido principalmente implicados en el transporte de ácidos orgánicos a través de la membrana plasmática y es posible que otros miembros cumplan funciones similares, como por ejemplo la excreción de carboxilatos para equilibrar el pH del citosol o para acidificar la rizofera. Los compuestos secundarios de origen terpenoico y compuestos altamente lipofílicos son sustratos generales para miembros de la subfamilia ABCG. Esto hace pensar si las proteínas ABCG podrían también mostrar especificidad por otras clases de compuestos secundarios como alcaloides y flavonoides, lo que podría ser de interés para la industria (Verrier y cols., 2008). La capacidad de varias familias para secuestrar eficientemente compuestos xenobióticos y metales pesados es también de interés, ya que podrían ser de gran utilidad para detoxificar suelos contaminados gracias a la fitorremediación.

El reciente descubrimiento de que miembros de la subfamilia ABCG participan en el transporte de ABA indica que quizás la translocación de otras hormonas aparte de ABA y auxina podrían estar relacionados con mecanismos dependientes de transportadores ABC. Otros posibles compuestos que podrían ser transportados por miembros de ABCG son la

estrigolactona, un apocarotenoide estructuralmente relacionado al ABA, y los brasinoesteroides (Umehara y cols., 2011; Gómez-Roldan y cols., 2008).

## **1.4. Melón**

### **1.4.1. Generalidades**

#### **1.4.1.1. Taxonomía**

El melón (*Cucumis melo* L.) es una especie clasificada dentro de la familia *Cucurbitaceae* (orden *Violales*), que agrupa a 118 géneros y 825 especies en total (Singh, 2007). Dentro de esta familia también se encuentran otras especies de importancia para el ser humano como son la calabaza, el calabacín, la sandía y el pepino. El género *Cucumis* comprende a 32 especies reconocidas y se divide en dos subgéneros: *Cucumis*, que posee solo dos especies, el pepino doméstico (*Cucumis sativus* L.) y el pepino silvestre (*C.hystrix Chakravarty*), ambos de origen asiático, y el subgénero *Melo* con 30 especies, entre las que se incluye el melón cultivado (*C. melo* L.) de origen africano (Pech y cols., 2007).

#### **1.4.1.2. Caracterización botánica**

El melón es una planta herbácea anual, presenta un tallo rastrero ramificado, de varios metros de longitud. Las hojas son alternas, reniformes o cordiformes, anchas y provistas de un largo peciolo. Las flores, unisexuales y situadas en la axila de las hojas. Primero, aparecen las de sexo masculino y al cabo de unos diez días, las de sexo femenino, alternándose a medida que crece la planta. El fruto es de tipo pepónide, provisto de abundantes semillas, con características morfológicas que difieren de una a otra variedad. El color de su piel es muy variado, siendo en algunos casos amarillo y en otros, verde o blanco; a su vez, la superficie de esta piel o cáscara puede ser lisa, reticulada, surcada o rugosa. Su forma puede ser redonda, oval o aplanada por los polos (Leñano, 1980).

#### **1.4.1.3. Origen, distribución y diversidad**

El origen de las especies del subgénero *Melo* se sitúa en África, mientras que el de las especies del subgénero *Cucumis* es Asia. La historia y lugar de domesticación no están claros actualmente, algunas hipótesis apuntan a una única domesticación en África (Whitaker y Davis, 1962), mientras que otras apoyan varias domesticaciones

independientes (Esquinas-Alcázar y Gullick, 1983). El lugar de diversificación primaria fue el subcontinente índico, desde donde se difundió hacia el este y oeste. Hay indicios de que el melón ya se cultivaba hacia el 2000 A.C. en Egipto, Mesopotamia y China y en el 1000 A.C. en la India.

La diversificación llevada a cabo por el ser humano ha dado lugar a que el melón sea una especie muy polimórfica con una gran variabilidad de tipos de frutos. Una clasificación de los tipos de melón puede realizarse en base a su tipo de maduración, que influye directamente en la calidad postcosecha de los frutos:

- Frutos climatéricos. La maduración está sujeta a la producción de una gran cantidad de etileno, conocido como “pico de etileno”, este regulador del desarrollo provoca importantes cambios fisiológicos que dan lugar a cambios de coloración, producción de aromas intensos y ablandamiento de los frutos. Estos melones tienen una vida postcosecha corta.
- Frutos no climatéricos, no presentan pico de etileno, aunque dicha molécula puede ser sintetizada en cantidades menores. Los cambios propios de la maduración están regulados mediante otras vías. Los frutos no son tan aromáticos y presentan una vida postcosecha más larga.

Otro carácter diferencial entre variedades de melón es la expresión del sexo. Hay formas monoicas, andromonoicas, ginomonoicas y hermafroditas. Desde hace mucho tiempo los botánicos han intentado clasificar toda la variabilidad y actualmente hay un consenso según el cual la especie *C. melo* puede dividirse en dos subespecies atendiendo a la pilosidad del ovario (Jeffrey, 1980): subespecie *agrestis* y subespecie *melo*. Una de las clasificaciones más completas es la elaborada por Pitrat y cols. (2000) que divide la especie en 16 grupos de los cuales 5 se agrupan en la subespecie *agrestis* y 11 en la subespecie *melo* (Llácer y cols., 2006)

- Subespecie *agrestis*
  - a) Var. conomon. Plantas andromonoicas que producen frutos alargados de piel lisa, blanca o verde claro y carne firme y blanca, no son dulces, ni aromáticos ni climatéricos. Se consumen en ensaladas o encurtidos.
  - b) Var. makuwa. Plantas andromonoicas de frutos achatados, redondos, ovales, o con forma de pera. Piel lisa blanca, amarilla o verde claro, a veces escriturada. La carne es blanca, dulce y con poco aroma. Frutos climatéricos.

## Introducción

- c) Var. *chinensis*. Plantas andromonoicas con frutos en forma de pera, de color verde con manchas, carne verde o naranja, sin aroma y con un contenido medio en azúcares. Hay formas climatéricas y no climatéricas.
- d) Var. *momordica*. Son monoicas. Con frutos que varían desde achatados a alargados, de piel lisa o ligeramente acostillada que estalla en madurez, no son dulces y tienen carne blanca y sin aroma, son climatéricos. Se recolectan antes de la maduración y se consumen cocidos.
- e) Var. *acidulus*. Formas monoicas de frutos ovales o elípticos, de piel lisa de color naranja y a veces con manchas, la carne es blanca muy firme y crujiente, no es dulce ni tiene aroma. Se consume principalmente cocido.
- Subespecie *melo*
  - f) Var. *cantalupensis*. Normalmente se trata de plantas andromonoicas, pero también hay algunas formas monoicas. La forma de los frutos varía de achatados a ligeramente ovales, son acostillados y lisos, de carne dulce y color salmón, aromáticos y climatéricos.
  - g) Var. *reticulatus*. Se trata de formas andromonoicas que producen frutos achatados o ligeramente ovales, de piel muy reticulada o sin costillas, y carne dulce y de color salmón. Aromáticos y climatéricos.
  - h) Var. *adana*. Plantas monoicas de frutos redondeados a alargados, con o sin costillas, ligeramente reticulados de piel fina y de color anaranjado o crema, la carne es salmón (a veces blanca) de bajo contenido en azúcar y climatéricos.
  - i) Var. *chandalak*. Se trata de un grupo muy polimórfico, andromonoico con frutos aplastados o redondeados, con o sin costillas, de piel verde o amarilla con o sin manchas y en ocasiones ligeramente escriturada, la carne es blanca o verde con poco aroma y alto contenido en azúcares, son climatéricos.
  - j) Var. *ameri*. Plantas andromonoicas con frutos ovales de color amarillo o verde claro, a veces con manchas y ligeramente escriturados. La carne es blanca (en ocasiones salmón), con poco aroma y alto contenido en azúcares. Climatéricos.
  - k) Var. *inodorus*. Son plantas andromonoicas con frutos que van de redondeados a elípticos, de un color que varía del blanco al verde oscuro uniforme o con manchas, con frecuencia la piel es rugosa con o sin costillas, la carne es blanca y jugosa, sin aroma y no climatéricos. Son tardíos y se caracterizan por una buena conservación.
  - l) Var. *flexuosus*. Son formas monoicas que producen frutos muy largos (más de 6 veces más largos que anchos) de piel verde claro, o con bandas verde claro /

verde oscuro, acostillados o rugosos. El fruto maduro no es dulce, la carne es blanca y son climatéricos. Se suelen consumir los frutos inmaduros como pepino.

- m) Var. chate. Son monoicos, aunque hay también algunas formas andromonoicas. Los frutos son muy similares a los de la variedad flexuosus pero más cortos. También se consumen como pepinos los frutos jóvenes. La carne es blanca o anaranjada y son climatéricos.
- n) Var. tibish. Son andromonoicos con frutos ovales, pequeños de piel verde claro y franjas verde oscuro, la carne es blanca y firme, no son dulces ni tienen aroma. Se colectan antes de la madurez y se consumen crudos como pepino.
- o) Var. dudaim. Plantas andromonoicas con frutos pequeños de forma ligeramente oval, de piel amarilla con bandas oscuras, aroma fuerte y típico, poco carnosos y de carne blanca, no son dulces, climatéricos. Se cultivan como ornamentales o aromáticos.
- p) Var. chito. Pueden ser monoicos o andromonoicos, con frutos esféricos y muy pequeños de piel amarilla, poca carne y blanca. No son dulces ni tienen aroma. No se cultivan.

#### **1.4.1.4. Importancia económica**

En los países occidentales, los tipos de melón más comerciales se encuentran dentro de las variedades inodorus, reticulatus y cantalupensis. Los más importantes en cuanto a producción mundial son los tipos Cantaloup (cantalupensis y reticulatus) y Honeydew (inodorus). En Europa son especialmente importantes los Galia y los Charentais (cantalupensis y reticulatus). En España los más populares son los melones inodorus como los tipos Piel de Sapo, Rochet, Tendral o Amarillo.

En general, la familia Cucurbitaceae es de gran importancia económica debido al cultivo de muchos de sus miembros, siendo los más cultivados la sandía [*Citrullus lanatus* (Thunb. Matsum. & Nakai)] el pepino (*Cucumis sativus* var. *sativus* L.) y el melón (*Cucumis melo* L.) (FAO, 2014).

El melón es un importante cultivo con una producción anual mundial de 29,5 millones de toneladas métricas. Los mayores productores son China, Irán, Turquía, Egipto y Estados Unidos, que producen el 68% del total, (FAO, 2013). En España, el área destinada a su

cultivo fue de 27.500 ha lo que llevó a la producción de 857 mil toneladas en 2013 (FAO, 2013).

#### 1.4.1.5. Características y propiedades nutricionales

El compuesto mayoritario de la pulpa de melón es el agua, que llega a alcanzar más del 90% del peso total. El segundo tipo de compuesto más importante son los carbohidratos que pueden suponer un 9% del peso total. También se encuentran en cantidades apreciables ácidos grasos como el ácido mirístico, además de pequeñas cantidades de vitaminas, minerales y otros compuestos (Tabla 1).

**Tabla 1.** Composición media en 100g de materia fresca de pulpa de melón en variedades “Cantaloupe” y “Honey Dew” (Adaptado de Gómez-Guillamón y Álvarez, 2001)

Componente	Cantaloupe	Honey Dew
Agua	91%	91%
Proteínas	0,9g	0,8g
Lípidos	0,1g	0,3g
Glúcidos	7,2g	7,7g
Fibra	0,4g	0,6g
Ca	14mg	14mg
P	16mg	16mg
Na	12mg	12mg
Mg	7,7mg	6,7mg
K	251mg	251mg
Fe	0,3mg	0,1mg
Vitamina A	3000IU	40IU
Vitamina C	23mg	23mg
Vitamina B <sub>6</sub>	0,07mg	0,09mg
Tiamina	0,03mg	0,04mg
Riboflavina	0,03mg	0,03mg
Niacina	0,5mg	0,6mg
Ac. Pantoténico	0,23mg	0,21mg
Ac. Fólico	3mg	-

#### 1.4.1.6. Calidad poscosecha

La mayoría de los melones consumidos en nuestro país pertenecen a las variedades botánicas *cantalupensis* (Galia, Charentais) e *inodorus* (Piel de Sapo, Tendral). Estas

variedades difieren en su proceso de maduración. Los frutos del primer grupo muestran una maduración climatérica, con un aumento de la respiración asociada a un rápido incremento de la producción de etileno. Por el contrario, los frutos de la variedad inodorus se comportan como no climatéricos, no se produce el aumento de la respiración ni el pico de etileno. Esta diferencia en el tipo de maduración da lugar a diferencias entre los cultivares climatéricos y no climatéricos. Así, cuando los frutos climatéricos alcanzan la etapa de maduración se produce cambio de color, producción de aromas, ablandamiento y se modifica la textura. Como consecuencia, aumenta la susceptibilidad a patógenos siendo su vida poscosecha corta. En los frutos no climatéricos estos cambios no se producen de manera tan rápida por lo que presentan una vida poscosecha más larga. Estas diferencias en el proceso de maduración influyen en la aceptación de las variedades en el mercado: los melones inodorus no son tan bien aceptados debido a su falta de aroma y color, por otro lado, las variedades climatéricas presentan el problema de su corta vida postcosecha (Llácer y cols., 2006).

#### **1.4.2. Maduración y abscisión del fruto en melón**

La mayoría de los estudios recientes en maduración de frutos climatéricos han sido llevados a cabo usando el tomate como fruto modelo debido a su relativo pequeño genoma, la existencia de mutantes del desarrollo bien caracterizados, disponibilidad de herramientas genómicas, simplicidad de transformación genética y un ciclo de vida relativamente corto. El melón, aunque posee algunas características menos favorables, tiene algunas ventajas sobre el tomate en lo que comprende a genotipos climatéricos y no climatéricos. Además, se han generados melones en los cuales la producción de etileno ha sido casi totalmente eliminada a través de la inhibición de genes de su biosíntesis (Ayub y cols., 1996). En estas condiciones, el melón ha demostrado ser útil para realizar estudios genéticos dedicados a entender la herencia de los caracteres climatéricos y a discriminar entre la regulación dependiente e independiente de etileno (Pech y cols., 2008).

##### **1.4.2.1. Etileno y tasa de maduración**

Los fenotipos típicos de melones climatéricos, como *Cucumis melo* var *cantalupensis*, tienen una rápida tasa de maduración y una corta vida útil. Por otra parte, los melones no climatéricos, como *Cucumis melo* var *inodorus*, incapaces de producir etileno autocatalítico, generalmente tienen una lenta tasa de maduración asociada con una larga vida útil. Los híbridos del tipo *Charentais cantalupensis* con un genotipo no caracterizado

de *Charentais* que no madura han llevado a la generación de melones con una vida útil media o larga (Pech y cols., 2008). Las características de las líneas parentales que no maduran y sus híbridos no han sido estudiadas en términos de biosíntesis de etileno o sensibilidad existiendo solo datos sobre la producción de volátiles aromáticos, los cuales se reducen en las variedades de larga vida útil (Aubert y Bourger, 2004). Sin embargo, por cribado de diferentes melones cantaloupes, Zheng y Wolff (2000) se encontró correlación entre la producción de etileno y el deterioro post-cosecha.

Además, usando sondas de cDNA de ACO, fueron capaces de demostrar que una baja producción de etileno estaba asociada con la presencia de un alelo ACO: *Ao* RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), mientras que la producción elevada de etileno estaba asociada con el alelo *Bo* en condiciones de homocigosis (Zheng y Wolff, 2002). En otras especies de frutos, tales como la manzana, también se ha establecido que la baja producción de etileno estaba correlacionada con una larga vida útil (Gussman *et al.*, 2003). Han sido descritos dos sistemas de producción de etileno: el primero produce bajos niveles de etileno, está presente durante la maduración de frutos no climatéricos y también precede al aumento de respiración en frutos climatéricos. Por el contrario, el sistema 2 es responsable de la producción autocatalítica de etileno y opera, por tanto, en frutos climatéricos (Pech y cols., 2012). Cada sistema es regulado de manera diferente, mientras que el primero presenta una regulación auto inhibitoria por etileno, el sistema 2 se caracteriza por un feedback positivo, lo que concuerda con la producción autocatalítica de etileno (Pech y cols., 2012).

#### **1.4.2.2. Control biotecnológico de la producción de etileno en melón**

Aunque la transformación genética de melón no es tan sencilla como la de tomate, muchos artículos informan sobre el control exitoso de la producción de etileno en melón a través de la biotecnología. Por ejemplo, ha sido posible transformar melones Cantaloupe *Charentais* (cv *Védrantais*) con un constructo antisentido de cDNA de una ACC oxidasa controlado por el promotor S35 (Ayub y cols., 1996). Una de las líneas antisentido generadas mostró una reducción de la producción de etileno de más del 99,5% lo cual resultó en un gran efecto sobre el proceso de maduración (Guis y cols., 1997). Posteriormente se observó que aplicando bajas cantidades de etileno (2,5 – 5 µL/L) a melones ACO antisentido se restauraba el fenotipo de maduración original (Flores y cols., 2001).



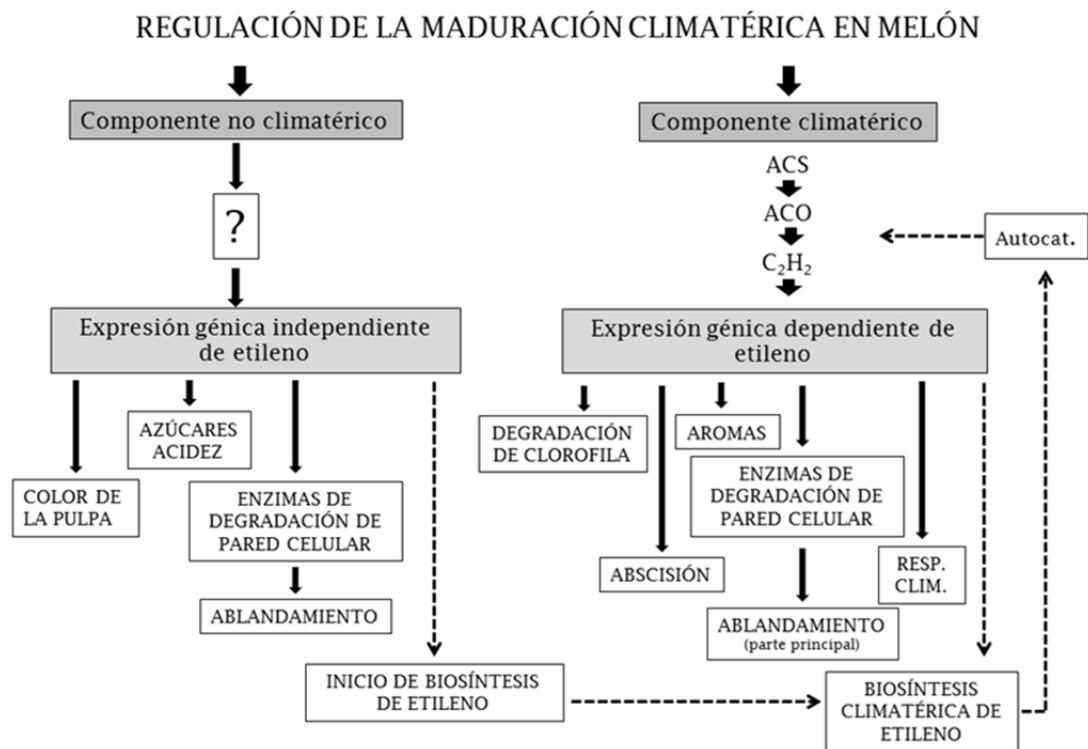
Un trabajo similar en la misma variedad de melón Cantaloupe Charentais, *Védraçais*, ha sido llevado a cabo usando un constructo antisentido de un gen de ACC oxidasa de manzana. Esto provocó una gran reducción de la producción de etileno y un gran efecto en la maduración del fruto (Silva y cols., 2004). Reducir la producción de etileno ha sido logrado también por expresión de la enzima SAMasa (T3 bacteriophage S-adenosylmethionine hydrolase) bajo el control de un promotor quimera específico del fruto en cantaloupes de tipo americano (Clendennen, 1997). Mediante la catalización de la degradación de SAM, un precursor de la síntesis de etileno, los melones que expresaban SAMasa producían un 75% menos de etileno que los frutos control. Sin embargo, la inhibición de la producción de etileno no era suficiente para cambiar significativamente la maduración y el comportamiento post-cosecha. Uno de los pocos efectos del transgen fue un retraso en la formación de la zona de abscisión. La transformación de la línea parental Krimka del melón tipo Galia con un gen antisentido de ACO resultó en una fuerte reducción de la actividad ACC oxidasa y producción de etileno provocando un retraso en el ablandamiento de la pulpa y en el amarilleamiento de la piel (Nunez-Palenius, 2007).

#### **1.4.2.3. Evidencias de rutas de maduración dependiente e independiente de etileno y expresión génica**

La generación de frutos transgénicos con producción reducida de etileno ha aportado una útil herramienta para estudiar los aspectos de la maduración que son dependientes o independientes de etileno (Pech y cols., 2008). Algunas rutas de maduración, como las responsables de la coloración de la pulpa y la acumulación de azúcares y ácidos orgánicos, no fueron afectadas por una supresión de etileno (Pech y cols., 2012). El contenido en azúcar incluso podría ser mayor ya que los frutos ACO antisentido podrían seguir unidos a la planta mayor tiempo sin abscisión o riesgo de sobremaduración. El ablandamiento de la pulpa no se inhibió totalmente por la supresión de etileno, lo que indica que es parcialmente independiente de etileno (Guis y cols., 1997) Observaciones similares fueron realizadas en melones Charentais transformados con ACO antisentido de manzana (Silva y cols. 2004). Además, los eventos dependientes de etileno del proceso de maduración mostraron diferentes sensibilidades al etileno (Flores y cols., 2001). El nivel umbral para el desverdecimiento de la corteza es 1 ppm, mientras que 2,5 ppm son requeridas para activar el componente dependiente de etileno del proceso de ablandamiento. El nivel de saturación de etileno para todos estos procesos es menor que 5 ppm, lo cual es mucho más bajo que las concentraciones internas de etileno encontradas en los frutos en el pico climático (alrededor de 100 ppm) (Pech y cols., 2012). Los melones etileno suprimidos

no producen compuestos aromáticos debido a la inhibición de la mayoría de los pasos de la ruta de biosíntesis que lleva a la producción de ésteres volátiles (Flores y cols., 2002).

La separación del fruto influye en el desarrollo del climaterio respiratorio (Bower y cols., 2002). Los frutos que quedan unidos a la planta, aunque producen mayores niveles de etileno, exhiben un aumento climatérico reducido en respiración al compararlos con los frutos sueltos. La respuesta de los frutos ACO al etileno exógeno, en relación a la respiración, es mayor en los frutos unidos que en los sueltos. Se ha observado que los melones ACO antisentido muestran una tolerancia aumentada a bajas temperaturas durante y tras el almacenamiento a 2°C, al compararlos con los de tipo silvestre (Ben Amor y cols., 1999). La existencia de rutas dependientes e independientes de etileno fue confirmada posteriormente a nivel molecular mediante análisis comparativos de expresión génica entre melones silvestre y ACO antisentido (Hadfield y cols., 2000). Este estudio identificó un conjunto de genes cuya expresión no cambiaba y otras dos categorías de genes cuya expresión aumentaba o disminuía mediante la supresión de etileno, indicando claramente que tanto rutas dependientes como independientes de etileno pueden coexistir en frutos climatéricos (Fig. 5).



**Figura 5.** Esquema general que muestra la presencia de procesos dependientes e independientes de etileno en la maduración del fruto de melón. (RESP: respiración; CLIM: climatérica; Autocat: regulación autocatalítica) (Adaptado de Pech *et al.*, 2008).

## *Introducción*

Una conclusión importante que emerge de estas aproximaciones experimentales es que solo la drástica inhibición de la síntesis de etileno (>99%) consigue producir alteraciones significantes en el proceso de maduración (Pech y cols., 2012). Estos frutos fuertemente inhibidos en su producción de etileno podrían ser el origen de nuevas técnicas poscosecha, ya que podrían ser cosechados a un desarrollo completo sin riesgo de sobremaduración, almacenados, y provocar u maduración usando etileno exógeno (Pech y cols., 2012).

Sobre la expresión génica, Hadfield y cols. (2000) han aislado 16 cDNAs cuya abundancia está regulada durante la maduración de melones Charentais, la mayoría de ellos siendo específicos del fruto. Al examinar los frutos antisentido ACO, tres patrones diferentes de acumulación de mRNA fueron observados. Un grupo de cDNA correspondía a mRNAs cuya abundancia fue reducida en frutos transgénicos pero inducible en tratamientos de etileno. Un segundo grupo no fue significativamente alterado en los frutos transgénicos y no fue afectado por el tratamiento con etileno, lo que indicaba que estos genes están regulados por señales de desarrollo independientes de etileno. El tercer y mayor grupo mostró un patrón de expresión inesperado, con mRNAs reducidos en el fruto transgénico y permaneciendo bajo tras la exposición a etileno. La regulación de este tercer grupo de genes parece, por tanto, ser independiente de etileno pero podría estar regulado por otros factores que requieren etileno en una etapa concreta del desarrollo. Estos datos demostraron que ambas rutas existen para la regulación de genes relacionados con maduración en frutos climatéricos (Pech y cols., 2008).

## *Introducción*

## **Objetivos**

## *Introducción*

## Objetivos

---

El objetivo general de esta tesis ha sido obtener información sobre el proceso de abscisión del fruto maduro en *Cucumis melo* L. Para ello, se trazaron los siguientes objetivos específicos:

1. Secuenciación masiva del transcriptoma de la zona de abscisión tras la activación del proceso de abscisión del fruto maduro.
2. Analizar la expresión génica de la zona de abscisión tras la activación del proceso de abscisión del fruto maduro.
3. Identificar, clonar y caracterizar las proteínas ABC de melón.

## *Introducción*



# **Material y métodos**

## *Introducción*

# Material y métodos

---

## 3.1. MATERIAL

### 3.1.1. Material vegetal

Flores de melón Charentais (*C. melo* var. *Cantalupensis* Naud, “Vedrantais”) fueron etiquetadas el día de su polinización y, posteriormente, se recolectaron las muestras de la ZA del fruto en diferentes etapas de la inducción de la abscisión de fruto maduro, concretamente, a 36 días post-antesis (DPA), ZA del fruto en fase de pre-separación celular; a 38 DPA, ZA del fruto en fase de separación celular parcial; y a 40 DPA, ZA del fruto con una separación celular casi completa y colapso celular. La abscisión de frutos “Vedrantais” se observó a 42 DPA. Las ZAs del fruto, localizadas entre el pedicelo y el fruto, fueron aisladas a partir de secciones longitudinales, mediante cortes a 1 mm sobre los lados proximal y distal del plano de fractura de la abscisión. Los cortes de la ZA del fruto que contenían tejidos del mesocarpo o pedicelo/caliz fueron descartados. Así, la posible contaminación fue reducida al nivel mínimo y, por tanto, los datos obtenidos corresponden a la ZA y no al fruto. Las ZAs recién aisladas fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C para el aislamiento de ARN.

Se recolectaron muestras de pulpa de frutos de melón silvestre así como muestras de pulpa de frutos de melón que poseen un constructo antisentido de la enzima ACC oxidasa (Ayub et al., 1996). Ambas muestras se recogieron en diferentes momentos de la inducción de abscisión, concretamente a 35, 37 y 40 DPA. También se recogieron muestras de tallo, hojas, y flores masculinas. Todas las muestras fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C.

Para el estudio poscosecha, los frutos de melón silvestre se recolectaron a 40 DPA. Posteriormente, un grupo de frutos se mantuvo otros 20 días a temperatura ambiente y un segundo grupo se mantuvo 20 días a 4°C, transcurrido ese tiempo, las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

## **3.2. MÉTODOS**

### **3.2.1. Caracterización morfológica**

#### **3.2.1.1. Microscopía óptica**

Mediante microscopía óptica se observaron secciones longitudinales de la ZA del fruto de melón Védrantais a 36 y 38 DPA. Para ello, el material fue cortado en secciones de unos 10  $\mu\text{m}$  de espesor y fueron teñidas con azul de toluidina para observar las estructuras celulares y con fluoroglucinol para observar la deposición de lignina en la ZA.

#### **3.2.1.2. Tinción con azul de toluidina**

Previamente a la tinción, el material fue desparafinado e hidratado. Para ello, se realizaron los siguientes tratamientos: primero, un cambio a xilol durante un minuto, y posteriormente, para hidratar las muestras, se utilizaron series decrecientes de etanol (100%, 90%, 70% y 50%) y finalmente agua destilada durante 3 minutos.

Para realizar la tinción, a las muestras se les aplicó una solución de azul de toluidina al 1% durante 30 segundos. Posteriormente, se realizó un lavado con agua destilada y, a continuación, las muestras se deshidrataron utilizando series crecientes de etanol (50%, 70%, 90% y 100%), durante 15 segundos cada una. Una vez deshidratadas, se añadió xilol durante 20 segundos y se colocó el cubreobjetos con Eukitt.

#### **3.2.1.3. Tinción con fluoroglucinol**

Primero, los tejidos fueron desparafinados e hidratados. Para ello, se realizó primero un cambio a xilol durante un minuto, a continuación, para hidratar las muestras se utilizaron series decrecientes de etanol (100%, 90%, 70% y 50%) y para finalizar, agua destilada durante 3 minutos.

Una vez el hidratado el tejido, se añadieron gotas de la solución de fluoroglucinol al 1% (p/v) en etanol al 70% (v/v), sobre los tejidos y se mantuvieron en contacto durante 5 minutos. Inmediatamente después se añadieron tres gotas de ácido clorhídrico al 35% y se cubrieron los portaobjetos con cubreobjetos. Una vez realizada la tinción, los tejidos se visualizaron inmediatamente en el microscopio, antes de transcurrir 30 minutos.

#### **3.2.1.4. Microscopía electrónica de barrido**

Con el objetivo de examinar los planos de fractura proximal y distal de la ZA del fruto se utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM). Se observaron secciones longitudinales de la ZA de muestras a diferentes días post-antesis (DPA): 36, 38 y 40, así como la superficie de la base del pedúnculo y la superficie de la zona de abscisión en el fruto en muestras cuya separación había finalizado (42 DPA).

Tras un secado a punto crítico, los tejidos fueron montados sobre baños de acero, cubiertos con una capa de oro-paladio y observados mediante un microscopio electrónico de barrido LEO 1430 VP (Gomez-Jimenez et al., 2010).

#### **3.2.2. Aislamiento de ARN**

El ARN total fue extraído de los tejidos de la ZA usando Trizol (Invitrogen Life Technologies) y posteriormente, su calidad fue verificada en gel y cuantificada espectrofotométricamente (NanoDrop, ThermoScientific, <http://www.thermofisher.com/>). El ARN mensajero fue aislado dos veces con Dynabeads Oligo (dT) 25 (DynaL Biotech ASA, Dynal Invitrogen, <http://www.invitrogen.com>), para minimizar la contaminación por ARNr. Posteriormente, se utilizó un microgramo de ARNm por muestra como plantilla para la síntesis de la primera cadena de ADNc usando tecnología SMART (Clontech Laboratories Inc, <http://www.clontech.com/>) con el objetivo de favorecer la síntesis longitudinal total. La doble cadena de ADNc fue producida mediante 13 ciclos de PCR de larga distancia. A continuación, el ADN fue purificado mediante columnas QIAquick (Qiagen, <http://www.qiagen.com/>) para eliminar los oligo-dT y las enzimas. La calidad del ADNc fue verificada con un Agilent 2100 Bioanalyzer (Nimblegen, <http://www.nimblegen.com/>).

Para extraer y purificar el ARN de las muestras de pulpa de frutos de melón, primero el material fue pulverizado. A continuación, a cada dos gramos de muestra, se le añadieron 4 ml de tampón LETS, y se agitó durante 2 minutos. Posteriormente se añadieron 2 ml de fenol y otros 2 ml de cloroformo se agitó durante un minuto y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5-10 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante, al que se añadieron 4 ml de cloroformo, se agitó durante un minuto y se realizó otra centrifugación similar a la anterior. El sobrenadante fue separado en alícuotas de 900 µl a las que se les añadió 300 µl de LiCl 8M dejando la mezcla a -20°C durante toda la noche. Al día siguiente, fueron

centrifugadas a 12.000 rpm 5-10 min a 4°C, y se desechó el sobrenadante. El pellet se lavó con etanol al 70%, para ello, se añadió 1 ml de etanol y se centrifugó durante 5 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar. El precipitado fue resuspendido en 40 µl de agua estéril. A continuación se unieron todas las alícuotas en un solo tubo y se precipitaron de nuevo con 1/10V de NaAc 3M a pH 5,2, y 2,5V de etanol. Se mantuvo toda la noche a -20°C, posteriormente, se centrifugó a 12.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se eliminó y el pellet se lavó con etanol 70%. Por último el pellet se resuspendió con TE. La cantidad de ARN fue cuantificada espectofotométricamente (NanoDrop, ThermoScientific, <http://www.thermofisher.com/>). El ARN de tallo, hojas y flores fue obtenido utilizando Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich). Su cantidad y calidad fue determinada también espectofotométricamente (NanoDrop, ThermoScientific, <http://www.thermofisher.com/>).

### **3.2.3. 454 Pirosecuenciación**

#### **3.2.3.1. Preparación de la librería para pirosecuenciación**

Se nebulizaron tres microgramos de cada muestra de ADNc para producir fragmentos de un tamaño medio entre 400 y 800 pb. La preparación de las librerías de los fragmentos de ADNc y las condiciones de emulsion de la PCR se realizó como se describe en el manual de Roche GS FLX. La pirosecuenciación fue realizada en un Roche Genome Sequencer FLX (454 Life Science Roche Diagnostics, <http://www.454.com/>) en Lifesequencing S.L. (Valencia, España).

#### **3.2.3.2 Recorte y montaje de lecturas**

La calidad de las lecturas fue evaluada por scripts PERL desarrollados por Lifesequencing para recorte y validación de secuencias de alta calidad. Las secuencias de los adaptadores utilizados para la preparación de las librerías fueron introducidas en una base de datos del programa de recorte de adaptadores en PERL. Se generaron nuevos archivos SFF (*Standard flowgram format*) mediante sfftools (454 Life Science/Roche), manteniendo el mayor punto de ajuste de partida y el punto de ajuste más pequeño al final. Las lecturas ajustadas se ensamblaron con la versión 2.3 de NEWBLER (454 Life Science/Roche) con los parámetros por defecto. Siguiendo los parámetros de calidad, al realizar el ensamblaje, algunas lecturas fueron eliminadas debido a su baja calidad para ser utilizadas.

### **3.2.3.3 Anotación**

Se seleccionó un amplio conjunto de proteínas de referencia de organismos relacionados taxonómicamente. Además, se incluyeron todas las proteínas de eudicotiledoneas con anotaciones para los siguientes términos: proceso del metabolismo de carbohidratos, proceso del metabolismo secundario, pared celular, organización de la pared celular y fitohormonas, con el fin de tener una representación completa de proteínas de referencia para estos aspectos específicos relacionados probablemente con el proceso de abscisión. El número total de proteínas de referencia fue 125,428.

La inclusión de proteínas de organismos taxonómicamente distantes con elevadas anotaciones funcionales como *Vitis vinifera* o *Ricinus communis*, permitió anotar nuevas proteínas que podrían haberse perdido si se hubiesen incluido solo proteínas de organismos cercanos. Para obtener una anotación de alta calidad se eligió un nivel de similitud muy restrictivo entre el isotig y la proteína de referencia del anotador. La similitud requerida debe ser lo suficientemente elevada para apoyar la inferencia de la función en la proteína de referencia. En este trabajo, se requirió un valor E de BLAST más bajo de 10.220 para inferir la función. Es importante recordar que cuanto más pequeño es el valor E, más elevada es la similitud entre secuencias, y así, mayor la confianza de la asignación de función. El gran BLASTX de todos los isotigs contra las 125,428 proteínas de referencia fue realizado usando un entorno de computación en nube (Amazon web services).

### **3.2.3.4 Cuantificación de los niveles de expresión**

Las proteínas de referencia fueron proteínas representativas de grupos UniRef90. Esta estrategia fijó una mínima distancia de similitud entre las proteínas de referencia y fue la base del agrupamiento de isotigs para obtener unigenes y cuantificar sus niveles de expresión. El nombre de cada unigen fue inferido del nombre de las proteínas representativas de UniRef90 que anotó cada unigen. Se cuantificó la expresión para estos unigenes, aquí definidos como clusters de isotigs, anotados por la misma proteína de referencia. El número de lecturas asignadas a cada isotig fue calculado tomando en cuenta que las lecturas de cada contig fueron contadas solo una vez. Dado que los isotigs representan isoformas transcritas, podría ser posible que diferentes isotigs que compartieran algunos contigs fueran agrupados dentro del mismo unigen. En aquellos casos, las lecturas de cada contig fueron contadas una sola vez. La normalización de los

valores absolutos del número de lecturas se realizó basada en (Mortazavi et al., 2008). Se obtuvo el RPKM (Lecturas por Kilobase de modelo de exón por millón de lecturas mapeadas). En este caso, se utilizó la longitud de la proteína de referencia en nucleótidos ya que el trabajo se realizó sin un genoma de referencia y por tanto sin modelos de exón. Esta normalización permite la comparación de los valores de expresión entre unigenes de la misma o de diferentes muestras (Mortazavi et al., 2008).

### **3.2.3.5 Análisis de expresión diferencial**

El método usado para el análisis de expresión diferencial en este trabajo fue edgeR (Robinson et al., 2010), un paquete de Bioconductor para análisis de expresión diferencial de datos digitales de expresión génica, teniendo en cuenta la variabilidad biológica. Los modelos edgeR cuentan datos usando un modelo de sobredispersión de Poisson y utilizan un procedimiento empírico de Bayes para moderar el grado de sobredispersión entre genes. Para el análisis de expresión diferencial con EdgeR, la entrada fue una tabla de conteos, con filas correspondiendo a genes/proteínas y columnas a muestras. EdgeR modela los datos como una binomial negativa (NB) distribuida,  $Y_{gi} \sim \text{NB}(M_i p_{gj}, \Phi_g)$  para gen  $g$  y muestra  $i$ . Aquí,  $M_i$  es el tamaño de librería (número total de lecturas),  $\Phi_g$  es la dispersión y  $p_{gj}$  es la abundancia relativa de gen  $g$  en el grupo experimental  $j$  para cual la muestra  $i$  pertenece. La distribución NB reduce a Poisson cuando  $\Phi_g=0$ . Este es un método especialmente apropiado para ser usado en proyectos de secuenciación de ARN (Garber et al., 2011; Vijay et al., 2012). En este trabajo, un isotig fue considerado como expresado diferencialmente durante abscisión cuando en una etapa de transición exhibió una diferencia altamente significativa en la abundancia de lectura a  $P < 0,01$ .

### **3.2.3.6 Anotaciones GO**

Las anotaciones GO (Gene Ontology Consortium, 2010) fueron obtenidas desde Uniprot e inferidas desde las anotaciones GO de las proteínas representativas de cada unigen. Se analizaron por separado los términos GO provenientes de 3 ontologías GO diferentes (proceso biológico, función molecular y componente celular) y se encontró el número de proteínas anotadas con cada término. En el análisis GOSlim, cada término GO fue traducido a un GO Term tomado desde un conjunto general de términos GO seleccionados con el fin de proveer una perspectiva más general y homogénea de los términos GO encontrados en una muestra. Para realizar el análisis GOSlim, se seleccionaron los términos GOSlim propuestos por el Instituto Europeo de Bioinformática (EBI) como términos GO



seleccionados para estudios en plantas. Los estudios GO-slim fueron desarrollados utilizando Bio4j (<http://www.bio4j.com/>), una base de datos gráfica que integra elementos de Uniprot, GO, taxonomía, RefSeq y una base de datos enzimática en nodos conectados por aristas que representan su relación. Se seleccionó un subconjunto de términos para obtener una visión de conjunto más amplia y, mediante la utilización de bio4j, se obtuvieron los resultados GO-slim. A este nivel seleccionado de granularidad, se obtuvo el perfil funcional de los términos de GO-slim que permitió resaltar características generales. Jerárquicamente, el análisis de agrupamiento fue usado para agrupar contigs en acorde a su perfil de transcripción usando la herramienta utilizada por [(Eisen et al., 1998), <http://rana.lbl.gov/eisen/>].

### **3.2.3.7 Análisis filogenético**

Los árboles filogenéticos fueron construidos a partir de búsquedas de similitudes realizadas con el programa BLASTp utilizando los parámetros por defecto en las bases de datos proteína-secuencia provistas por el servidor del Centro Nacional para Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Las secuencias de aminoácidos fueron alineadas con ClustalW (versión 2.0.3) (Thompson et al., 1994).

### **3.2.3.8. qRT-PCR**

Se realizó una transcripción reversa utilizando 2 mg de ARN, hexámeros aleatorios y Superscript III (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante. El ADNc purificado (2 ng) se usó como plantilla para qRT-PCR. Los ensayos qRT-PCR se realizaron con primers específicos de genes (Tabla 2). El ADNc fue amplificado usando SYBRGreen-PCR Master kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU), que contenía una polimerasa Gold AmpliTaq en un iCycler (BioRad Munich, Alemania), siguiendo el protocolo provisto por el suministrador. Las muestras fueron sometidas a las condiciones de ciclo termal de la activación de DNA polimerasa a 94°C 45 segundos a 55°C, 45 segundos a 72 °C y 45 segundos a 80°C; se realizó un paso final de elongación de 7 minutos a 72 °C. La curva de fusión se diseñó para incrementar 0,5 °C cada 10 segundos desde 62 °C. El amplicón fue analizado por electroforesis y secuenciado una vez para confirmar la identidad. La eficiencia de qRT-PCR se estimó mediante una curva de calibración de dilución y el cálculo de la pendiente. Los niveles de expresión fueron determinados como número de ciclos necesarios de amplificación para alcanzar un umbral fijado en la fase exponencial de la PCR (CT). Los datos fueron normalizados con la cantidad de gen de ubiquitina en melón. Se usaron duplicados de tres réplicas biológicas en dos experimentos independientes.

**Tabla 2.** Relación de primers utilizados.

Primer	Secuencia	Gen (Uniprot ID)
EXT1-F	5'-CCTTATTATGTATACAAATCACCT-3'	EXT1-EXT4 (Q38913)
EXT1-R	5'-AGGAGAGTGATAAAATTTGGTGGAGG-3'	
EXT3-F	5'-GTGGCGACTCTAAGTTTGCCATCT-3'	EXT3-EXT5 (Q9FS16)
EXT3-R	5'-AGGAGGTGGTGGAGAGTGGTAAAC-3'	
PG2-F	5'-GCTACCATTTATGTGCCTAAG-3'	PG2 (ATIYVPK)
PG2-R	5'-GGAAATGCAGTCATCACCAGT-3'	
EXP1-F	5'-GCGGTTGAGCAACCGCCATT-3'	$\beta$ -EXP1 (A1X8W4)
EXP1-R	5'-AGCTGCAAAATAGTTCGAGTT-3'	
EXP7-F	5'-GGATCAAGAACTGGTTGGCAAG-3'	$\alpha$ -EXP7
EXP7-R	5'-GAATTGGGCACCACTATAAGT-3'	
EXP5-F	5'-CCATGCCGTAAGCAAGGAGGA-3'	EXP5
EXP5-R	5'-GACACGGAAGTTCTTGCCGGTG-3'	
PE3-F	5'-GTTCTTCAGGACTTGCAAAC-3'	PE3 (Q43111)
PE3-R	5'-ATACATCATAACATTCCACTT-3'	
PL-F	5'-TTGCAGAGCTTCAATTCTTCG-3'	PL
PL-R	5'-ATTACGACCGAACCAATGCC-3'	
RABA2B-F	5'-ATGGCTCATAAGGTAGACCAC-3'	RABA2B
RABA2B-R	5'-CCTTCTGTTTGAGTCACCAGA-3'	
RABB1B-F	5'-ATCATCATTGGTGATACTGGA-3'	RABB1B (P92963)
RABB1B-R	5'-AGCCCTTCGGTGTGCAAGATC-3'	
ARA5-F	5'-CTGCTTATTGGAGATTCTGGT-3'	RABD2A/ARA5 (B9MUT7)
ARA5-R	5'-ACCAGACTTTTGGTTCACAGG-3'	
RABE1C-F	5'-TATCTCATTAAGCTTTTGCTT-3'	RABE1C/ARA3 (P28186)
RABE1C-R	5'-ATCCATATCAGCCTTGTTTCC-3'	
ARA6-F	5'-GTCCCAGACAGGGCTTCTGGG-3'	RABF1/ARA6 (B9HUI6)
ARA6-R	5'-CAACCGCTTCGCAATCTCCTC-3'	
RABH1B-F	5'-GCAAGCCGGCAAACCTTCTCTA-3'	RABH1B (O80501)
RABH1B-R	5'-TGTGGACTTCAAGTTAACATC-3'	
ACSa-F	5'-GGATGGCGACTTGGGTGGTTTGT-3'	ACS (B95BC0)
ACSa-R	5'-TCAATATCATCATCACTGATATCTTC-3'	
ACsb-F	5'-CCTTACTATCTTGATGAAGCATC-3'	ACS (Q9LN15)

<b>ACSb-R</b>	5'-CCCTCTTGCTTGCAGAACTTCAC-3'	
<b>AC0a-F</b>	5'-GGGGAGTGGGTGGACGTGCCTCC-3'	ACO (C7U1K1)
<b>AC0a-R</b>	5'-CGCCACCAGACTCGGGCGCCGGAA-3'	
<b>AC0b-F</b>	5'-CCCAACCTCATCACTCTTCTC-3'	ACO (B9RYX6)
<b>AC0b-R</b>	5'-ACAGCCGATGAAGCACACTCTT-3'	
<b>AC0c-F</b>	5'-GATCAAGTCCCCGGCCTGGAGTT-3'	ACO (B9RKA0)
<b>AC0c-R</b>	5'-ATAAAACGTAGCAATGGACAGCCT-3'	
<b>ERF11-F</b>	5'-GGAGTCCGCCGGCGCGTGGG-3'	ERF11 (D8VD38)
<b>ERF11-R</b>	5'-ATTCAAAATGGCTTTACTTCCCCT-3'	
<b>IAA2-F</b>	5'-ATGTCTCCACCATTACTTGATGTTG-3'	IAA2 (Q9SSY2)
<b>IAA2-R</b>	5'-TGTGTAGTTGGCTTTTCACTTTC-3'	
<b>PR-1F</b>	5'-CAAGACTCACCTCGAGACTTCGTC-3'	PR-1 (B9S7U9)
<b>PR-1R</b>	5'-GGGTTCATAGTTGCAAATGATAAA-3'	
<b>BRI-F</b>	5'-TTCAGCTTTGTCTACACAATCCTTA-3'	BRI (B9RLU0)
<b>BRI-R</b>	5'-CGCAAAAGAGGATTGCCGAGATACGA-3'	
<b>SAP5-F</b>	5'-AATCCAGCGACGAACAATATG-3'	SAP5 (Q9LHJ8)
<b>SAP5-R</b>	5'-TACATCCAGAACAACGATTCA-3'	
<b>ETR2-F</b>	5'-GTTGCTGACCAGGTGGCTGTTGCTCT-3'	ETR2 (A8QYK9)
<b>ETR2-R</b>	5'-ACCCACCTTTGGTCATTCCGTCCTG-3'	
<b>ETR1-F</b>	5'-GTTGCTGACCAGGTGGCTGTTGCTCT-3'	ETR1 (Q9SSY6)
<b>ETR1-R</b>	5'-CATGAATTTTTGATGTATAGGAAGCTT-3'	
<b>ERS1-F</b>	5'-CAAATGAACAATTGGCCTGATGGCT-3'	ERS1 (Q7GC82)
<b>ERS1-R</b>	5'-TCGGCGTCTCATTTTCATGGTTCAT-3'	
<b>ADC-F</b>	5'-TTGGCGCTTATAGCTAGGAAGCTTG-3'	ADC (B3Y023)
<b>ADC-R</b>	5'-CCAAGCATGTTTTATACTCACCCAT-3'	
<b>NCED-F</b>	5'-CCACTCCCTAAAACCGCCGACCCA-3'	NCED (B9S0Z6)
<b>NCED-R</b>	5'-GTCTTCTGACATCGCCAAAAGCCG-3'	
<b>SNRK2-F</b>	5'-AAGGGATACGACGGTGCGAAGGTTG-3'	SNRK2 (B9RVE0)
<b>SNRK2-R</b>	5'-ATTTTCATCTCGTAATCATCGTAGA-3'	
<b>ABF3-F</b>	5'-ATGGGAAAGCCATTAGGCAGCATG-3'	ABF3 (B9RPF8)
<b>ABF3-R</b>	5'-AGCAGCAGACTCCCTATTCTTGAT-3'	
<b>GH3-F</b>	5'-GGTCGCCCTCTCCTGATACCT-3'	GH3 (081829)
<b>GH3-R</b>	5'-GACCTGGTTAAGAATTCAGAGAT-3'	
<b>TIR1-F</b>	5'-CAGATGACAAATGCTGCCCTTGTA-3'	TIR1 (B8Y9B4)

<b>TIR1-R</b>	5'-ATCATTCTCTCGTTGATGATCTCCAC-3'	
<b>KAT-F</b>	5-GGACTACCCATTCTTGGTGTCTTTA-3	KAT (B9RWL7)
<b>KAT-R</b>	5-GCCCATTCCTCCGTCCTATGCACT-3'	
<b>JAZ-F</b>	5'-TTGTTTCTCTCAAGAGCGGGATT-3'	JAZ (D8V3L7)
<b>JAZ-R</b>	5-CTATCTTTTCTCTTCTCCAAGAA-3	
<b>MYC2-F</b>	5-AACGAGCTGAAATCGAAGCTCCA-3	MYC2 (B9S1E9)
<b>MYC2-R</b>	5'-CATCAAATCATTCACTACAGAAAC-3	
<b>PAL-F</b>	5'-ACGGCAAAGAAATTGCATGAAATG-3'	PAL (B9S0K2)
<b>PAL-R</b>	5-TGGCAATTTTCAAGCCTTTAAAGCC-3	
<b>NPR1-F</b>	5'-GCATTAGATTTCAGACGATGTTGAA-3'	NPR1 (B9S3I0)
<b>NPR1-R</b>	5'-ATAATCCTTTGGCCTTGTTAACCT-3'	
<b>BAK1-F</b>	5'- CGGCTCAATACTTGCAAGCTTGGT-3'	BAK1 (B9RUI5)
<b>BAK1-R</b>	5'-ATCCCCTTTCAGAGAAGCAACCAT-3'	
<b>BZRI-F</b>	5'-TCTCCAACCTTCAGCCTTGTAGCA-3'	BZRI (Q9ZV88)
<b>BZRI-R</b>	5'-CCCAAGTGTAAGTTCAAGATCATC-3'	
<b>ARRB-F</b>	5'-GCATTGTCAGCCATTTTCGAGCAAA-3'	ARRB (D7TTG7)
<b>ARRB-R</b>	5'-ATGAACAACATGTTGCCAAATATT-3'	
<b>DELLA GAI-F</b>	5'-TTATATCGGATGCCAGACGAGAGC-3'	DELLA GAI (B9RIU5)
<b>DELLA GAI-R</b>	5'-TCCCATCTGGCAGCCACTTCCC-3'	
<b>GAL1-F</b>	5'-GGAGGAACTAACTTTGGCCGA-3'	GAL (B9HL7)
<b>GAL1-R</b>	5'-AGTCCTCAAAATGCAGGCCAAC-3'	
<b>GAL2-F</b>	5'-GGCAACGAACCATTGGCTTTAGAC-3'	GAL (D7TB77)
<b>GAL2-R</b>	5'-CTTAACCAAAGAAATCCCTCCGGG-3'	
<b>GAL3-F</b>	5'-CCTCGGTCTTGGCTAAGGCCA-3'	GAL (Q5CCP8)
<b>GAL3-R</b>	5'-AGTTCCAATGGCGTTCCAAA-3'	
<b>GAL4-F</b>	5'-TGTGAAGAAGCATTAGTCAGC-3'	GAL (B9SWC7)
<b>GAL4-R</b>	5'-TCTTCGAGATACCTACTGGTTC-3'	
<b>MYBR3-F</b>	5'-GGACGGAGGAAGAACAAGCTTT-3	MYBR3
<b>MYBR3-R</b>	5'-GTGGTGATATCGAAGAGGCTGGA-3'	
<b>ABCB25-F</b>	5'-GGT GTT GTG CCA CAA GAT CTG GTC-3'	ABCB25 (B9T3V9)
<b>ABCB25-R</b>	5'-AAG AAT GCT CGA GCT AGA GCC ACT-3'	
<b>ABCC2-F</b>	5'-GAG AAT AGT ATC CTT AAG ACC AA-3'	ABCC2 (B9SKU0)
<b>ABCC2-R</b>	5'-CCC AAT CGA ACT TCG TGT CTT-3'	
<b>ABCC4-F</b>	5'-ATG GAT GAA GCA ACT GCA TCA G-3'	ABCC4 (B9SAP4)

<b>ABCC4-R</b>	5'-AGG GCC TAT CAA ATT CTC TTG C-3'	
<b>ABCD1-F</b>	5'-CTA CAG CAT GTT CGG TTA AAT TAT CT-3'	ABCD1 (B9RQ07)
<b>ABCD1-R</b>	5'-AAC CTT GTA TAA GTG TTC TTC AAC GTC-3'	
<b>ABCD2-F</b>	5'-ACA ACG GAT GAC CTA ATC CAA G-3'	ABCD2 (D7T0Z3)
<b>ABCD2-R</b>	5'-GTT GAT TGT CAT CGG ACA ACT T-3'	
<b>ABCE2-F</b>	5'-AAG CTT CGT GTG ATA GAA GGT GAA-3'	ABCE2 (Q8LPJ4)
<b>ABCE2-R</b>	5'-TCA CAA CTT CCT GGT CCA TTA A-3'	
<b>ABCF1-F</b>	5'-AAG ATG AGA GGA GCA ATT GGG A-3'	ABCF1 (B9N856)
<b>ABCF1-R</b>	5'-CCA GCC TTC ATC TTC AAA TGT GC-3'	
<b>ABCF3-F</b>	5'-CTA TCT GGT GGT CAG AAA AGC A-3'	ABCF3 (D7TVM3)
<b>ABCF3-R</b>	5'-GAC TGC AAT ATC TTC TTG TAA TCT TGG-3'	
<b>ABCF4-F</b>	5'-ACA ATG GAG GAA ACA CCA GTT C-3'	ABCF4 (B9RUV8)
<b>ABCF4-R</b>	5'-CTA ACC AGA ACA ACT CCG CCG GT-3'	
<b>ABCF5-F</b>	5'-ATA TGA GGG AAA TTA TTC ACA ATA TG-3'	ABCF5 (D7SW65)
<b>ABCF5-R</b>	5'-CTC AGG GAA CCT AAT CTT CAT CTG-3'	
<b>ABCG23-F</b>	5'-GAA AGA AGG GTT CTG ATG AAA GA-3'	ABCG23 (B9SY40)
<b>ABCG23-R</b>	5'-CAC TAA CGA ACT AGC CAT CAT CAC-3'	
<b>ABCI6-F</b>	5'-GAG GTT ACA GGC GGT AGT ATT GTG TT-3'	ABCI6 (B9SCB8)
<b>ABCI6-R</b>	5'-AGC CAT CTC TGC ACC CAA AAC A-3'	
<b>ABCI17-F</b>	5'-CGT CCT TCT TTA GCA AGA TCG GC-3'	ABCI17 (B9S7S7)
<b>ABCI17-R</b>	5'-AGG AAC TTG AGA GCC ATC GGG TG-3'	

### 3.2.4.1. Alineamiento múltiple de secuencias y construcción de árbol filogenético

Con el objetivo de comparar las secuencias de proteínas ABC obtenidas tras la secuenciación de transcriptoma de melón se realizó un alineamiento múltiple con las secuencias de todas las proteínas ABC conocidas de *Arabidopsis thaliana*. Para ello se reunieron 130 secuencias pertenecientes a miembros de familias ABC utilizando la información disponible en NCBI (National Center for Biotechnology Information - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). El alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos se realizó utilizando para ello el software MEGA 6.06. El alineamiento se realizó con el método MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation; Edgar, 2004). Para el análisis filogenético se utilizaron los siguientes parámetros: neighbor-joining tree method, pairwise deletion y bootstrap con 500 réplicas (Tamura et al., 2011)



## **Resultados y discusión**



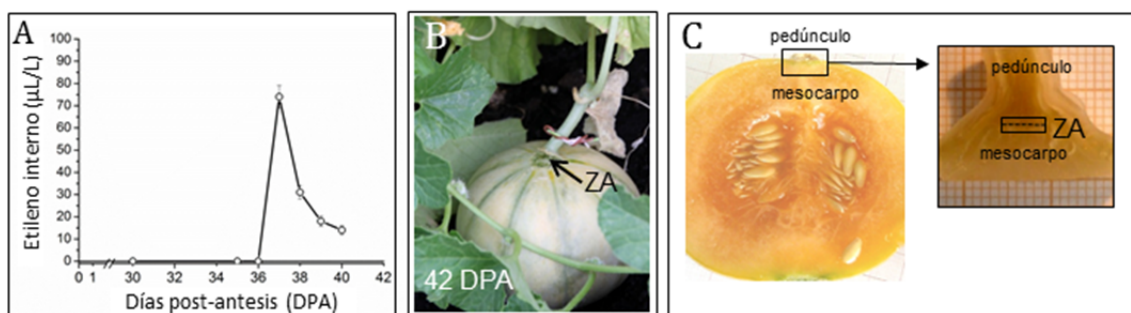


## CAPÍTULO 1: CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LA ZA DEL FRUTO

Durante la abscisión de fruto maduro de melón tienen lugar procesos de separación y colapso celular (Webster, 1975) siendo esta separación celular crítica para que la abscisión se desarrolle de manera correcta. La naturaleza y magnitud de ésta determinan la forma y medida en la cual el fruto y el pedúnculo finalmente se separan (Webster, 1975).

En frutos de melón Védrañtais, como el cantaloupe, el incremento climatérico de producción de etileno sincroniza la maduración y los procesos de la abscisión (Pech y cols., 2008; Perin y cols., 2002). Como ha sido demostrado previamente (Guis y cols., 1997; Perin y cols., 2002), los frutos de Védrañtais sufren un pico característico de producción de etileno (Fig. 6A) a los 37 DPA, y maduran en la planta hasta aproximadamente 42 DPA, momento en el que se separan (Fig. 6B).

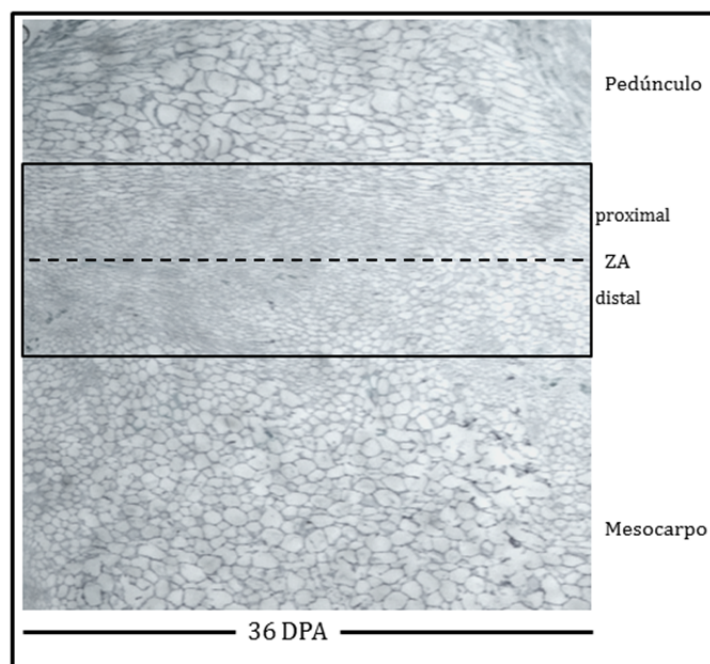
El estudio anatómico del proceso de abscisión se realizó a distintas etapas, observándose la ZA y tejidos circundantes en la zona de unión entre el pedúnculo y mesocarpo de frutos Védrañtais como se muestra en las figuras 6B y 6C. Para ello, se realizaron tinciones de cortes histológicos utilizando azul de toluidina y se observaron mediante lupa. También se realizaron observaciones utilizando microscopía electrónica de barrido.



**Figura 6.** Producción de etileno y observación de la posición de la ZA en el fruto de melón Charentais (C. melo var. cantalupensis Naud, "Védrañtais"). (A), concentración de etileno interno en frutos de melón de 30 a 40 DPA. (B), fruto de melón en el momento en el que la abscisión es completa (42 DPA), la ZA del fruto madura se observa localizada entre el pedúnculo y el fruto, tras la abscisión del fruto a 42 DPA. La flecha señala a la ZA. (C), fotografías de una sección longitudinal del fruto Védrañtais, mostrando la posición de la ZA (cuadro negro) utilizada para la extracción de ARN y la observación de los cambios anatómicos.

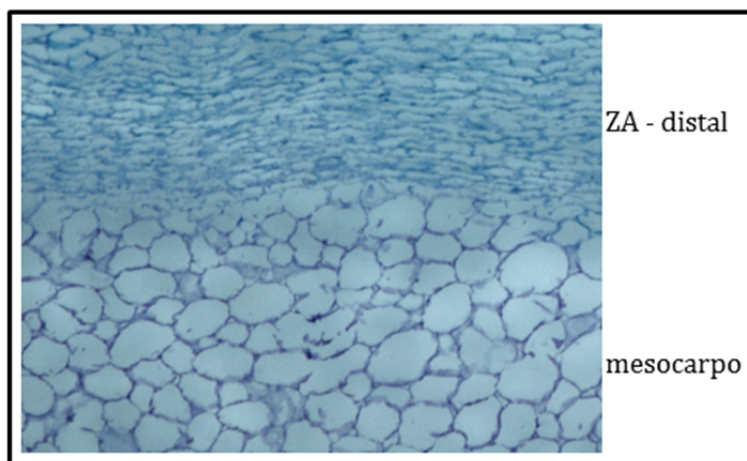
#### 4.1.1. Caracterización anatómica de la ZA mediante microscopía óptica

Se realizaron tinciones de cortes histológicos de alrededor de 10  $\mu\text{m}$  de espesor, de la zona de unión entre el pedúnculo y el fruto, para observar la evolución de la zona de abscisión y sus tejidos circundantes a través del proceso de abscisión de fruto maduro. En la figura 7 se muestra una tinción con azul de toluidina donde se observa el tejido de la zona de abscisión así como los tejidos pertenecientes al pedúnculo y al fruto. La ZA está formada por varias capas de células con una morfología característica que las diferencia de las células de tejidos circundantes. Además, son más pequeñas y presentan una forma más cuadrada. Esta morfología es característica de las células pertenecientes a ZAs y ha sido descrita en otras especies (Addicott y cols., 1982; Osborne y Morgan., 1989; Sexton y Roberts, 1982). Las células de la ZA también muestran un citoplasma más denso y están muy interconectadas a través de plasmodesmos.



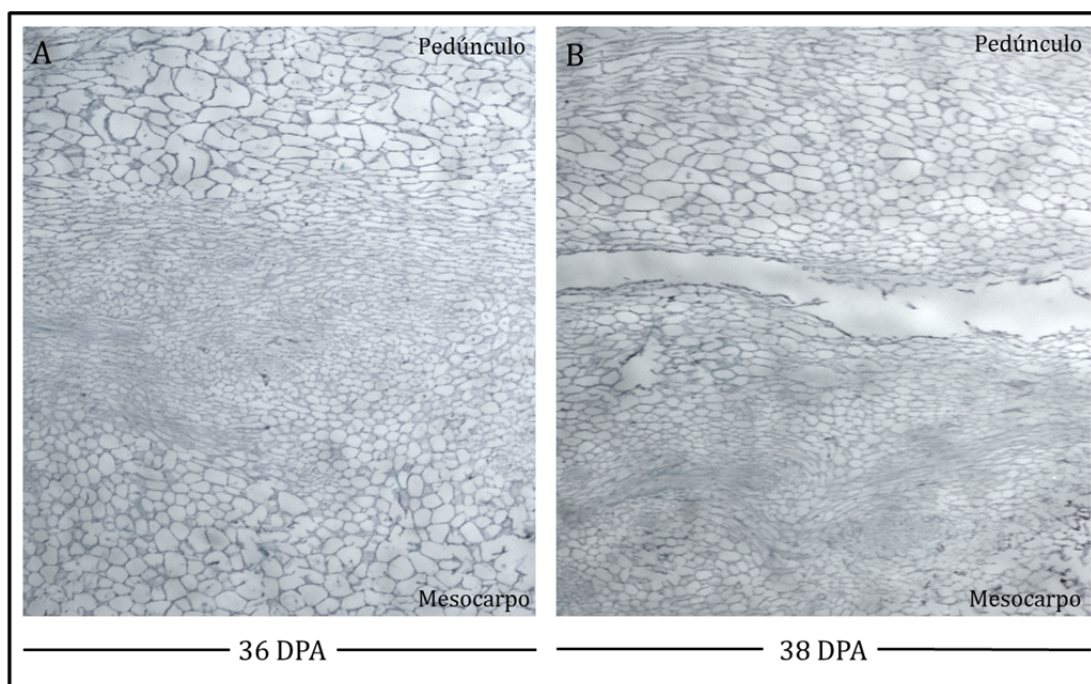
**Figura 7.** Tinción con azul de toluidina de cortes histológicos longitudinales de la zona de unión entre pedúnculo y fruto de melón Védraçais previa a la abscisión de fruto maduro. La imagen se obtuvo mediante lupa con un aumento de 3X.

En la figura 8 se muestra a mayor aumento la diferencia entre las células del mesocarpo y las que configuran la ZA. Puede apreciarse la diferencia de tamaño y morfología entre ambos tejidos.



**Figura 8.** Tinción con azul de toluidina de corte histológico longitudinal de la zona de unión entre pedúnculo y fruto de melón Védrañtais previa a la abscisión de fruto maduro. La imagen se obtuvo mediante lupa con un aumento de 8X.

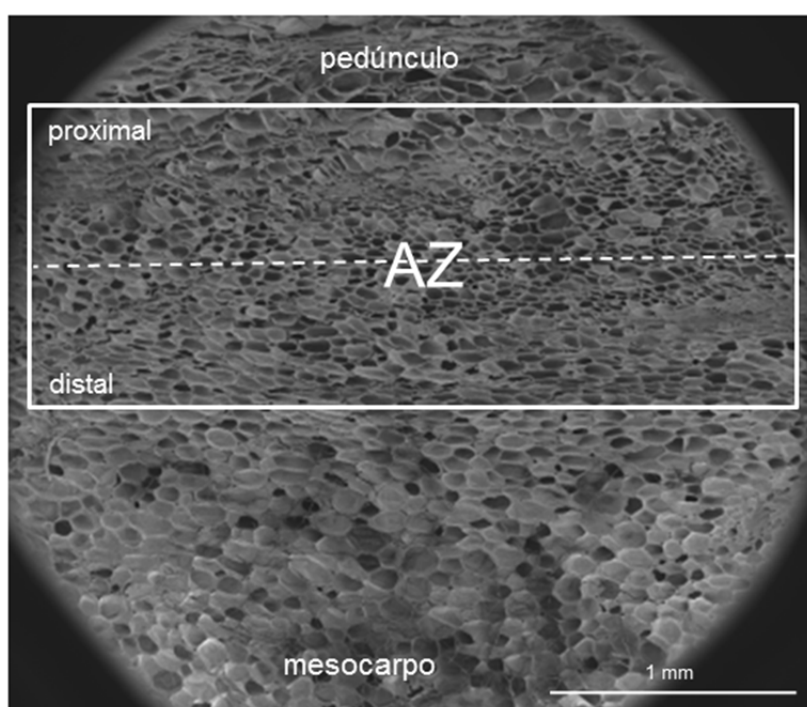
En la figura 9 se muestran cortes histológicos de muestras a 36 DPA (A), antes de producirse separación celular y a 38 DPA (B), una vez la separación celular se ha iniciado. En la imagen A se observa la ZA entre los tejidos pertenecientes al pedúnculo (parte superior) y los tejidos del fruto (parte inferior). En la imagen B puede observarse la fractura producida entre tejidos una vez la abscisión ha sido iniciada.



**Figura 9.** Tinción con azul de toluidina de cortes histológicos longitudinales de la zona de unión entre pedúnculo y fruto de melón Védrañtais a 36 y 38 DPA. Las imágenes se obtuvieron mediante lupa con un aumento de 3X.

#### 4.1.2. Caracterización anatómica de la ZA mediante microscopía electrónica de barrido

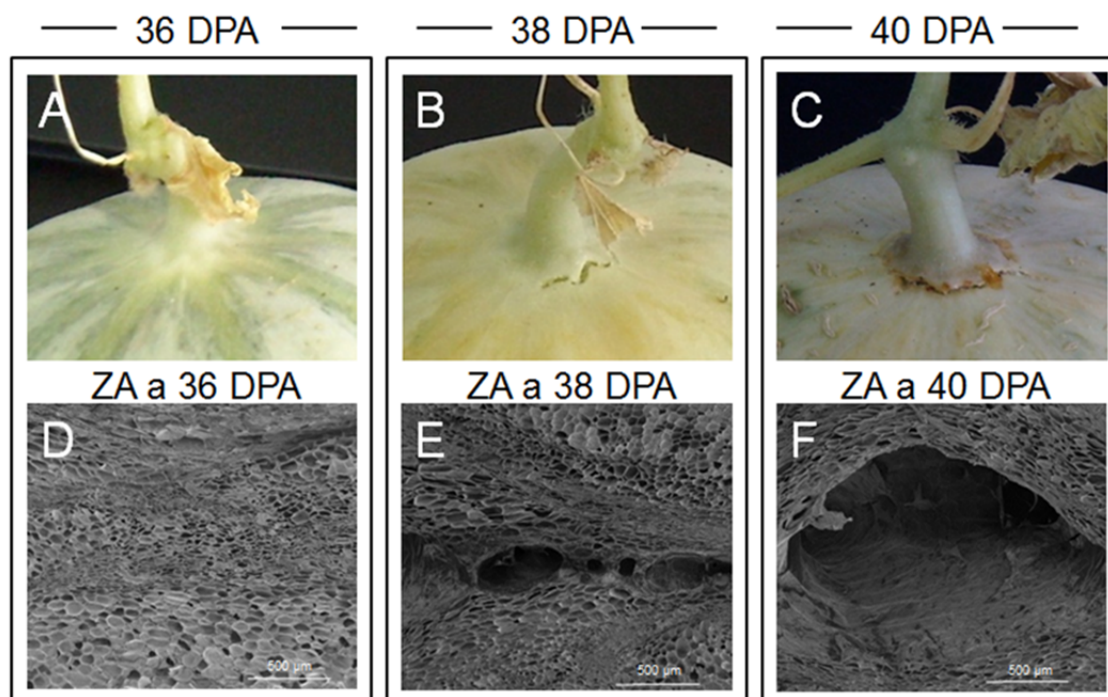
Se realizaron observaciones mediante microscopía electrónica de barrido de secciones longitudinales de la ZA y tejidos circundantes a 30, 36, 38 y 40 DPA, antes y durante la abscisión de fruto maduro, con el objetivo de observar los cambios de morfología celular y tisular producidos en dicho proceso. En la figura 10 se observa la situación y estructura de las células de la ZA a 30 DPA antes de iniciarse la abscisión. Puede observarse como la ZA está formada por 30 - 35 capas celulares, que presentan un tamaño menor y forma distinta de las células pertenecientes tanto al pedúnculo como al mesocarpo, como ha sido señalado anteriormente.



**Figura 10.** Microfotografía de una sección longitudinal mostrando la ZA del fruto de Védrañtais a 30 DPA. La línea discontinua indica la posición del plano de fractura de abscisión

En la figura 11 se presentan varias fotografías de la zona de unión entre pedúnculo y fruto a diferentes momentos de la abscisión, desde 36 DPA, momento en el que el proceso está siendo iniciado, hasta 40 DPA cuando es visible la fractura entre tejidos y la separación entre fruto y pedúnculo. La primera referencia en la literatura sobre los aspectos anatómicos de la abscisión en frutos cantaloupe trata sobre el melón cv. Powdery Mildew Resistant no.45 (Webster, 1975). En este melón, las modificaciones estructurales en las paredes celulares de la ZA están acompañadas por cambios histoquímicos que ocurren durante un periodo de 10 días y culminan con la abscisión del fruto del pedúnculo (de 32 a

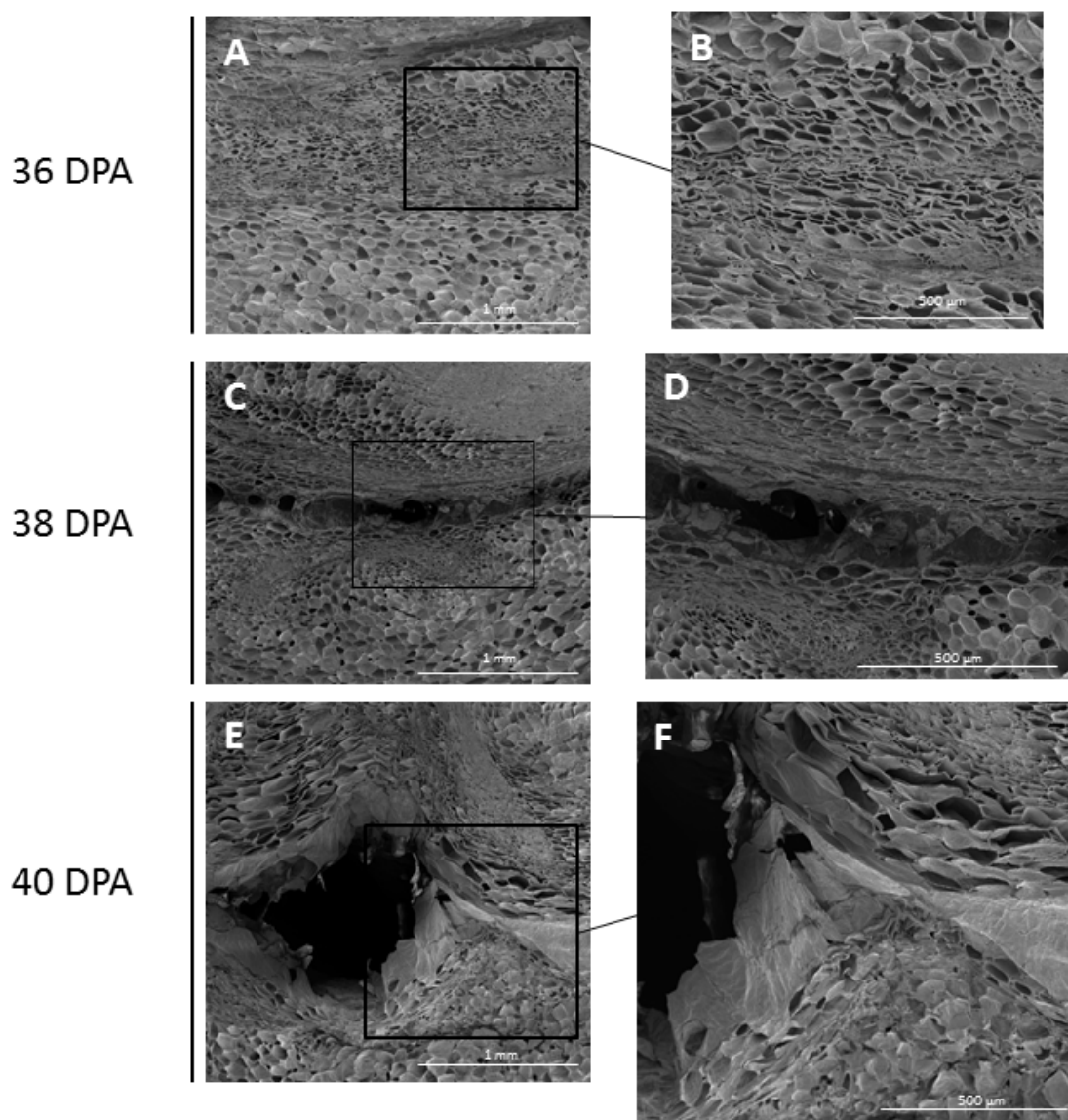
42 DPA); Sin embargo, en el melón Védrantais, los cambios histoquímicos, incluyendo aumentos de lignina, se producen durante un período de 6 días antes de la abscisión (de 37 a 42 DPA), dependiendo la extensión de este periodo del cultivar. Por lo tanto, en melones Védrantais, la activación de la ZA y el comienzo del proceso de maduración toma lugar a los 37 DPA, y la inducción de la abscisión ocurre durante un periodo de 37 a 42 DPA. Es interesante observar que la evidencia externa de la separación es una rotura que se produce entre pedúnculo y fruto, haciéndose patente a los 38 DPA (Fig. 11B). Durante este periodo de inducción de la abscisión, la separación celular seguida del colapso es característica de células del parénquima cortical de la ZA (Webster, 1975). Inicialmente, la ZA de Védrantais a los 38 DPA revela una pequeña cavidad dentro de la zona (Fig. 11E), y posteriormente, a los 40 DPA, muestra una separación celular y un colapso celular extensos (Fig. 11F).



**Figura 11.** (A, B, C) Macro-fotografías a 36, 38 y 40 DPA en las que se observa el aspecto de la zona del fruto donde se produce la abscisión. La evidencia externa de separación es una rotura entre el pedúnculo y el fruto, siendo evidente por primera vez a 38 DPA. (H, I, J), imágenes de microscopía electrónica de barrido en las que se observa la ZA de frutos de Védrantais a 36 DPA (ZA del fruto en pre-separación celular), 38 DPA (ZA del fruto con separación celular parcial), y 40 DPA (separación celular de la ZA casi completa y colapso celular). Escala: 500 µm en figuras D, E y F.

En la figura 12 se muestra otra serie de microfotografías tomadas de la zona de unión entre fruto y pedúnculo a los mismos momentos del proceso de abscisión de fruto maduro. A 36 DPA (Fig. 12A, 12B) puede observarse la ZA, formada por capas de células con su característica morfología: células más pequeñas con citoplasma más denso. A 38 DPA (Fig.

12C, 12D) comienza a producirse la separación efectiva y colapso de las células centrales de la ZA, provocando el inicio de la formación de una fisura. A 40 DPA (Fig 12E, 12F) puede observarse como la fisura en la ZA ha aumentado considerablemente de tamaño y la separación celular se extiende a lo largo de la zona. También se aprecia, con mayor claridad en la imagen más aumentada, la presencia de la capa protectora, que recubrirá la zona de abscisión una vez finalizado el proceso de separación entre el pedúnculo y el fruto.

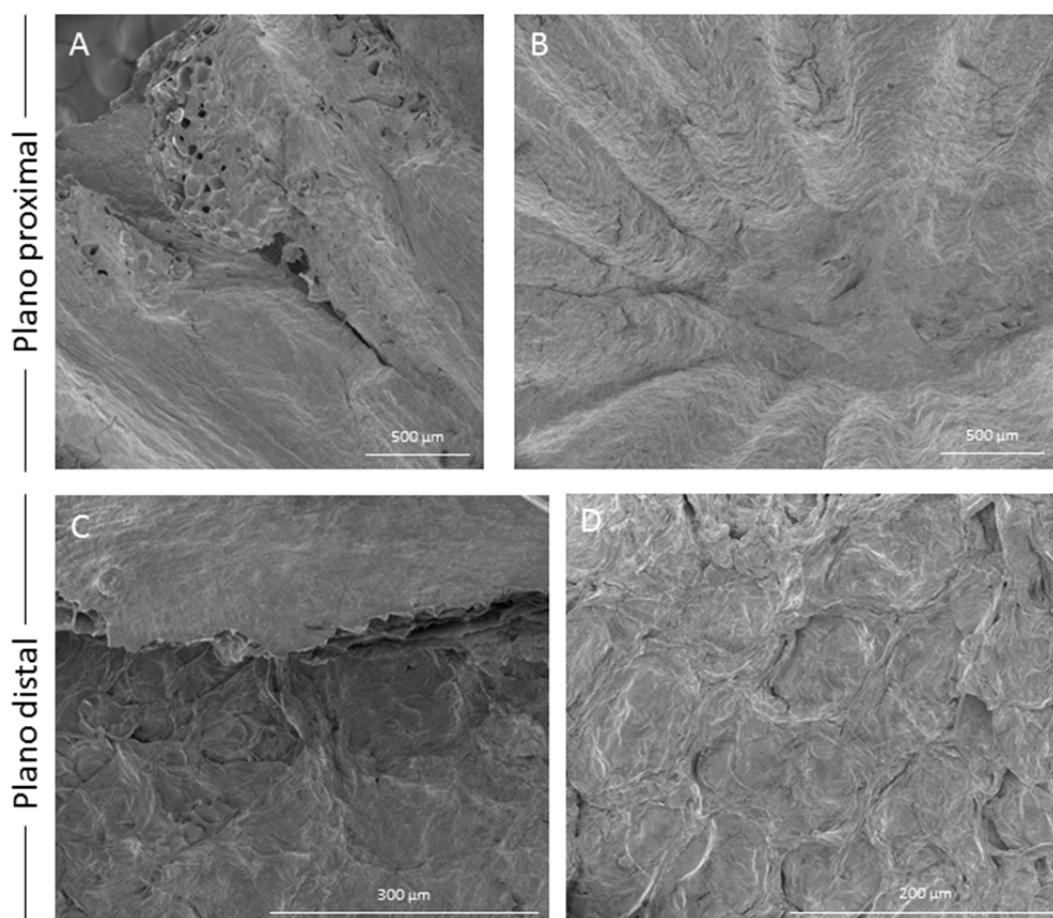


**Figura 12.** Morfología celular de la zona de abscisión del fruto. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de cortes longitudinales de la ZA de fruto maduro de melón Védrantais a 36 DPA (ZA en pre-separación celular), 38 DPA (separación celular parcial) y 40 DPA (separación celular y colapso celular completos). Las imágenes con mayor aumento muestran las células de la zona de separación. Escalas: 1 mm y 500  $\mu\text{m}$ .

A 42 DPA el proceso de abscisión finaliza, la separación celular se completa y el fruto queda totalmente separado del pedúnculo. Tanto en el plano distal (Fig. 13A, 13B) como

en el plano proximal (Fig. 13C, 13D) queda formada una capa de carácter suberoso con la finalidad de proteger el tejido subyacente.

En la imagen 13A se observa un extremo de la superficie del pedúnculo, mientras que la 13B corresponde al centro de la superficie. En la superficie de la ZA del fruto puede apreciarse la zona de la que se separó el pedúnculo debido a la diferencia de tejidos, el epidérmico del epicarpo del fruto y el tejido suberoso de la capa protectora que se forma tras la abscisión (Fig. 13C). En la imagen con más aumento (Fig. 13D) se observa con más detalle la estructura de la capa protectora.



**Figura 13.** Morfología de la superficie del plano proximal (A y B), y del plano distal (C y D) a 42 DPA (separación celular completa). Escalas: 500 µm, 300 µm y 200 µm.

## **CAPÍTULO 2:**

# **SECUENCIACIÓN MASIVA DEL TRANSCRIPTOMA DE LA ZA DEL FRUTO DE MELÓN**

### **4.2.1. Análisis del transcriptoma de la ZA del fruto de melón**

Con el objetivo de identificar diferencias en abundancia de transcritos relacionadas con aspectos de la inducción de la abscisión del fruto maduro, los transcriptomas de la ZA de melón durante la separación celular fueron comparados a diferentes momentos del proceso. En un primer experimento se comparó el transcriptoma a 36 DPA, fase de pre-separación celular, con el transcriptoma a 38 DPA, fase de inducción de abscisión temprana, donde se observan las primeras evidencias externas de separación celular total o parcial. En un segundo experimento, fueron comparados de manera similar los transcriptomas de la ZA a 38 DPA, inducción de abscisión temprana con el transcriptoma a 40 DPA, inducción de abscisión tardía, donde se observa una separación celular casi completa y colapso celular (Fig. 11). Estas tres muestras (ZA a 36, 38 y 40 DPA) representan cambios anatómicos y fisiológicos críticos durante el periodo anterior a la abscisión, que culmina a 42 DPA, momento en el que la abscisión está completa (Fig. 11). Esto pone en relieve el valor de la caracterización específica de transcriptomas a diferentes momentos de la abscisión.

Tras la preparación de las librerías de ADNc y su pirosecuenciación, se obtuvieron de las tres muestras un total de 134 Mb de secuencias (483,704 lecturas de buena calidad). Estas secuencias se unieron en 14,162 contigs, y tras el modelado de genes mediante Newbler, en 12,871 isotigs, (2.792 para 36 DPA, 7.315 para 38 DPA, y 2.764 para 40 DPA, respectivamente) (Tabla 3, Fig. 14), de los cuales 10,513 fueron isotigs con una anotación funcional. Alrededor de un tercio de los isotigs no se asignaron a identidades UniProt y por tanto, representan una fuente para el descubrimiento de nuevos genes.

La mayor parte de las lecturas obtenidas presentaban una longitud entre 150 y 350 pares de bases, aunque también existía cierta abundancia de lecturas tanto con una longitud mayor como menor (Fig. 14A). Sin embargo, al unir las secuencias en contigs, la gran mayoría de ellos pasó a contener al menos 500 pares de bases de longitud (Fig. 14B), estando la mayor parte de estos contigs formados con menos de 10 lecturas (Fig. 14C).



Una vez obtenidos los isotigs, se observó que la mayor parte de ellos contenía una longitud a partir de los 500 pares de bases también (Fig. 14D)

Tabla 3. Resultados de la pirosecuenciación 454

Datos	ZA fruto, 36 DPA	ZA fruto, 38 DPA	ZA fruto, 40 DPA
Lecturas brutas	115,760	273,169	95,228
Nucleótidos brutos	35,885,600	87,414,080	29,520,680
Longitud media bruta	310	320	310
Lecturas limpias y procesadas	115,643	272,830	95,131
Nucleótidos limpios	31,196,184	77,108,803	25,853,453
Longitud media limpia y procesada	270	282	272
Número total de contigs	3,067	8,154	2,941
Tamaño medio de contig	611	653	607
Número total de isotigs	2,792	7,315	2,764
Proteínas detectadas	2,014	5,009	2,050
Proteínas con anotaciones GO	1,387	3,558	1,486
Proteínas con anotación numérica EC	272	767	352

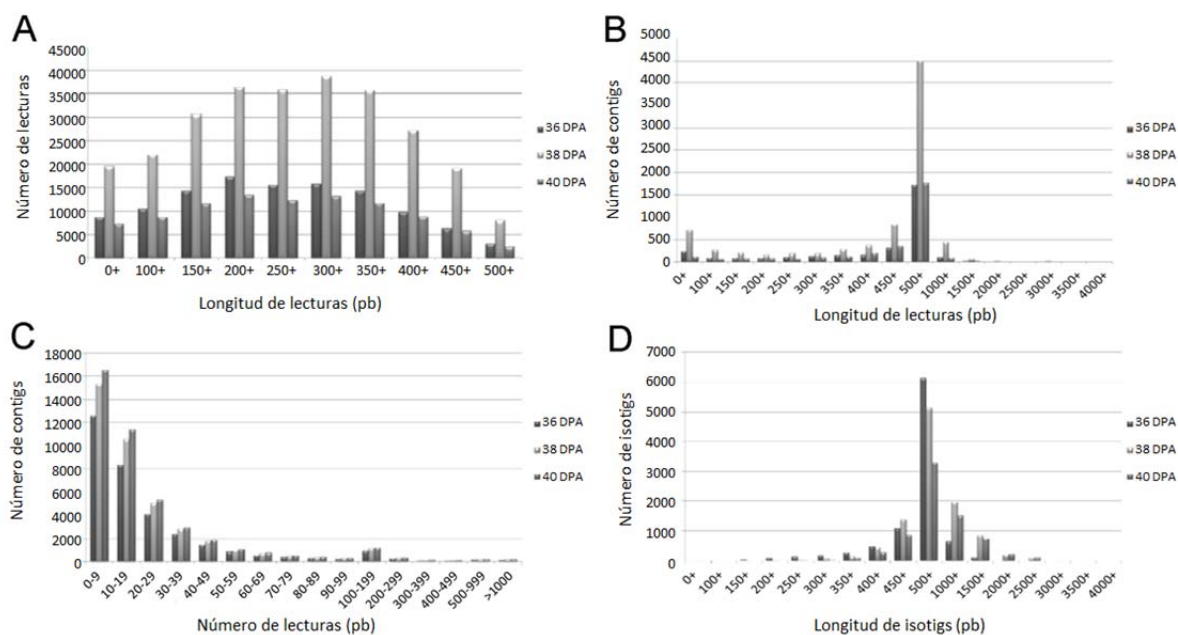


Figura 14. Resumen de diferentes parámetros durante la secuenciación y el ensamblaje de datos de los estudios del transcriptoma de la ZA de melón a 36, 38 y 40 DPA para obtener una visión sobre los eventos transcripcionales que tienen lugar en la ZA del fruto durante la abscisión de fruto maduro. (A), Distribución de la longitud de lectura. Un total de 483.704 lecturas de secuencias de buena calidad (134.158.280 bp) fueron obtenidas de 3 muestras (ZA de frutos a 36, 38 y 40 DPA). (B), distribución de longitud de contigs. Un total de 14.162 contigs fueron obtenidos del montaje Newbler de las 483.704 lecturas redundantes. La longitud media de los contigs es alrededor de 500 bases. (C), distribución de contigs total leídos a partir de datos de secuenciación 454 de la ZA de frutos. La mayoría de contigs consistían en menos de 10 lecturas. (D), distribución de longitud de isotigs. 12.871 isotigs fueron obtenidos tras la modelización génica Newbler.

#### **4.2.1.1. Detección de genes**

La detección de genes se basó en la utilización de BLASTX frente al conjunto de proteínas de referencia Uniprot (ver 3.2.3.3 Material y Métodos). El número de diferentes genes detectados considerando las tres muestras como un conjunto fue 5.953. Los análisis de los niveles de expresión de los 10,513 isotigs anotados llevó a la identificación de 4,801 genes expresados diferencialmente (45%) en nuestros experimentos ( $P < 0.01$ ), los cuales se refieren en lo sucesivo como grupo I, mientras que los resultantes 5,712 genes sin representación diferencial o una baja lectura de abundancia están referidos como grupo II. Entre los 4.801 genes expresados diferencialmente ( $P < 0,01$ ), 2689 genes fueron de respuesta a abscisión en el primer experimento (ZA del fruto a 36 DPA y 38 DPA, inducción temprana de la abscisión) y 2112 fueron de respuesta a la abscisión en el segundo experimento (ZA de fruto a 38 DPA y 40 DPA, inducción tardía de la abscisión). Por tanto, se encontró un mayor número de genes con expresión diferencial en el primer experimento. De estos, 1,790 genes fueron aumentados y 899 fueron disminuidos en la ZA de fruto a 38 DPA, mientras que en el segundo experimento, 802 genes aumentaron y 1310 disminuyeron en la ZA del fruto a 40 DPA.

A continuación, en las tablas 4 y 5 se muestran los transcritos que más aumentaron y más disminuyeron respectivamente en la etapa de inducción temprana de la abscisión. En la tabla 4 se muestran los IDs de UniProt de los genes más abundantes en la inducción temprana de la abscisión. Estos genes podrían tener funciones importantes relacionadas con el proceso de abscisión. Entre ellos se encuentran genes de remodelación de pared celular, genes relacionados con el metabolismo y fitohormonas y otros cuya función es desconocida.

## Resultados y discusión

**Tabla 4.** Tránscrios con mayor abundancia en la fase de inducción temprana de abscisión. La tabla muestra el conteo total de lecturas para cada gen tras la normalización (RPKMx1000) en dos muestras: separación pre-celular de la ZA (36 DPA) y en la muestra de separación celular parcial de la ZA (38 DPA).

Uniprot ID	36 DPA	38 DPA	Descripción
<b>B9S7U9</b>	37,26	18935,81	STS14 protein, putative
<b>D7TAI4</b>	2917,74	10095,23	Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_10.assembly12x (Fragment)
<b>A5C4I3</b>	802,91	9694,44	Putative uncharacterized protein
<b>O80432</b>	0	6584,12	Mitochondrial small heat shock protein
<b>Q41321</b>	1411,56	4690,47	Protein induced upon tuberization
<b>B9NAX4</b>	0	4587,30	Predicted protein (Fragment)
<b>Q8H159</b>	680,52	4270,60	Polyubiquitin 10 [Cleaved into: Ubiquitin]
<b>A5BKB8</b>	74,92	4173,87	Putative uncharacterized protein
<b>O81245</b>	0	3309,69	Polygalacturonase
<b>O82089</b>	826,44	3195,59	AT3g56240/F18021_200 (Copper homeostasis factor)
<b>Q0WLP3</b>	0	2976,04	Putative uncharacterized protein
<b>D7SHE0</b>	0	2655,91	Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_0.assembly12x (Fragment)
<b>B9SIQ2</b>	0	2618,55	Alpha-amylase/subtilisin inhibitor, putative
<b>D7TQ86</b>	719,57	2440,91	Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_40.assembly12x (Fragment)
<b>B2ZP02</b>	30,91	2218,35	Beta-1,3-glucanase
<b>B9RMD4</b>	0	2175,88	Putative uncharacterized protein
<b>E0CU96</b>	3,02	2083,44	Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_36.assembly12x (Fragment)
<b>P08474</b>	201,05	2010,58	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain, chloroplastic (RuBisCO small subunit) (EC 4.1.1.39)
<b>P27492</b>	88,97	1728,07	Chlorophyll a-b binding protein 16, chloroplastic (LHCII type I CAB-16) (LHCP)
<b>P35132</b>	509,00	1725,22	SUMO-conjugating enzyme UBC9 (EC 6.3.2.-) (UBCAT4B) (Ubiquitin carrier protein 9) (Ubiquitin-conjugating enzyme E2 9) (Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa) (Ubiquitin-protein ligase 9)
<b>D8VD38</b>	0	1680	Ethylene response factor 11

En la tabla 5, por el contrario, se muestran los IDs de UniProt de los genes cuya expresión se ve más reducida en la fase de inducción temprana de la abscisión. La represión de estos genes podría estar relacionada con la regulación de los procesos comprendidos en dicha fase. Entre ellos pueden encontrarse genes relacionados con la traducción de proteínas, como subunidades de ribosomas o factores de traducción, también algunos relacionados con la señalización y otros cuya función es desconocida.

## Resultados y discusión

**Tabla 5.** Tránscritos con mayor descenso de expresión en la fase de inducción temprana de abscisión. La tabla muestra el conteo total de lecturas para cada gen tras la normalización (RPKMx1000) en dos muestras: separación pre-celular de la ZA (36 DPA) y en la muestra de separación celular parcial de la ZA (38 DPA).

Uniprot ID	36 DPA	38DPA	Descripción
P49690	18061,90	752,38	60S ribosomal protein L23 (Protein EMBRYO DEFECTIVE 2171)
P59220	8328,85	1331,09	Calmodulin-7 (CaM-7)
B9R7X8	6497,89	2590,71	Low-molecular-weight cysteine-rich protein LCR78, putative
D7UB79	4033,15	2129,14	Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_24.assembly12x (Fragment)
D7TQG9	3844,79	1044,09	Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_40.assembly12x (Fragment)
D7TD89	3705,62	216,45	Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_57.assembly12x (Fragment)
D7SQM1	3337,12	316,28	Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_141.assembly12x (Fragment)
Q850K6	3140,05	0	Non-specific lipid-transfer protein
D7UBL2	3090,90	126,72	Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_103.assembly12x (Fragment)
A9PAH1	2972,60	385,84	Predicted protein (Putative uncharacterized protein)
A5C9I9	2504,27	777,77	Putative uncharacterized protein (Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_1.assembly12x)
D7U865	2274,85	508,77	40S ribosomal protein S12 (Fragment)
D7T8C6	1797,61	767,85	Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_90.assembly12x (Fragment)
Q01902	1547,29	2162,16	Ribosomal protein S7, mitochondrial
D7T0X0	1426,99	90,90	Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_85.assembly12x (Fragment)
P06353	1412,5	3129,16	Histone H3.3 (Fragment)
B9SA38	1330,91	789,85	Translation factor sui1, putative
Q8LAD0	1275,81	137,25	Pyridoxal biosynthesis protein PDX2 (EC 2.6.-.-) (Probable glutamine amidotransferase) (AtPDX2) (Protein EMBRYO DEFECTIVE 2407)
D7TBM3	1240,60	67,66	Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_16.assembly12x (Fragment)
B9ILN4	1229,79	0	Predicted protein
P59232	1154,98	414,0	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a-2 [Cleaved into: Ubiquitin; 40S ribosomal protein S27a-2]

De la misma manera, los IDs de UniProt de los genes con mayor aumento o descenso de expresión se muestran en las tablas 6 y 7 respectivamente. Entre los genes con mayor aumento de expresión en la fase de inducción tardía se encuentran genes relacionados con la transcripción y traducción de proteínas y genes relacionados con procesos diversos como metabolismo de ROS o transporte de agua.

## Resultados y discusión

**Tabla 6.** Tránscrios con mayor abundancia en la fase de inducción tardía de abscisión. La tabla muestra el conteo total de lecturas para cada gen tras la normalización (RPKMx1000) en dos muestras: separación celular parcial de la ZA (38 DPA) y en la muestra de separación celular casi completa de la ZA (40 DPA).

Uniprot ID	38 DPA	40 DPA	Descripcion
<b>B9SZV0</b>	234,74	5032,86	Histone h1/h5, putative
<b>B9NAX4</b>	4587,30	4402,11	Predicted protein (Fragment)
<b>D7STB3</b>	206,57	3089,20	Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_55.assembly12x (Fragment)
<b>P49690</b>	752,38	1897,61	60S ribosomal protein L23 (Protein EMBRYO DEFECTIVE 2171)
<b>Q41360</b>	823,80	1223,80	Pathogenesis-related protein PR-4 type (Fragment)
<b>O65773</b>	648,20	1020,51	Peroxidase (EC 1.11.1.7)
<b>D0ESA0</b>	1159,94	922,04	Thaumatococcus-like protein (Fragment)
<b>B9SEN5</b>	0	814,81	Early nodulin, putative
<b>P27492</b>	1728,07	736,84	Chlorophyll a-b binding protein 16, chloroplastic (LHCII type I CAB-16) (LHCP)
<b>A9P822</b>	900,51	663,26	S-adenosylmethionine synthase 1 (AdoMet synthase 1) (EC 2.5.1.6) (Methionine adenosyltransferase 1) (MAT 1)
<b>A5C9I9</b>	777,77	653,84	Putative uncharacterized protein (Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_1.assembly12x)
<b>B9RWF3</b>	1024,85	589,83	Elongation factor 1-alpha, putative (EC 2.7.7.4)
<b>Q9FGZ9</b>	1009,13	538,81	Ubiquitin-like protein 5
<b>D7TQG9</b>	1044,09	534,39	Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_40.assembly12x (Fragment)
<b>A9PFE8</b>	142,85	515,67	Aquaporin, MIP family, PIP subfamily (Putative uncharacterized protein)
<b>P59259</b>	200,64	511,32	Histone H4
<b>D7SN28</b>	455,17	482,75	Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_61.assembly12x (Fragment)
<b>D7UCZ6</b>	178,21	458,74	Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_112.assembly12x (Fragment)
<b>Q9M5M6</b>	500	428,57	60S ribosomal protein L30
<b>A9PCX2</b>	441,05	404,47	Predicted protein (Putative uncharacterized protein)
<b>Q38913</b>	115,28	403,93	Extensin-1 (AtExt1) (AtExt4)

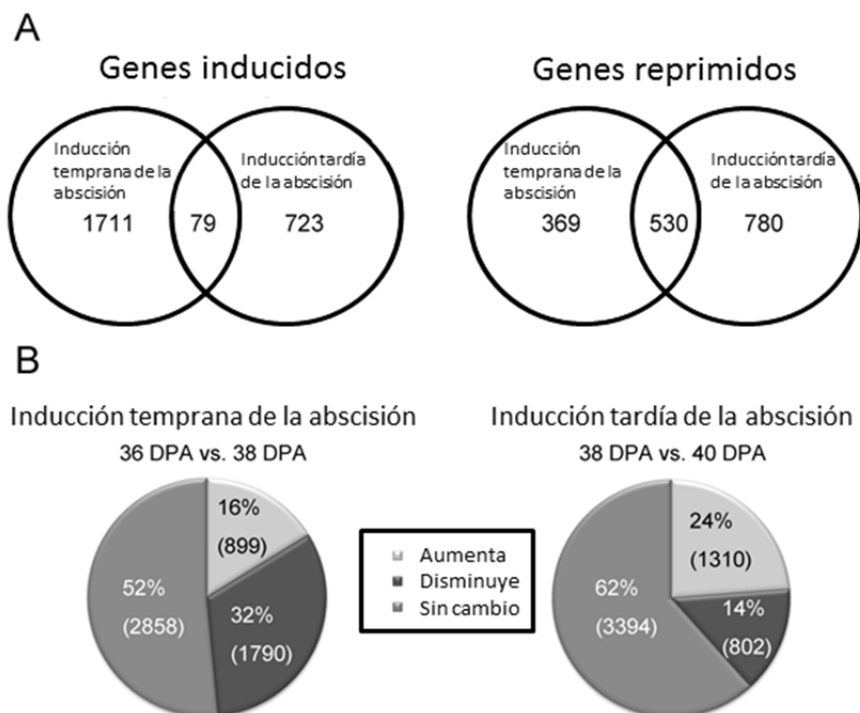
Entre los genes con un mayor descenso de expresión en la etapa de inducción tardía de la abscisión se encuentran genes relacionados con funciones como remodelación de la pared celular, metabolismo o fitohormonas. Es interesante observar que algunos genes que sufrieron un fuerte aumento en la etapa de inducción temprana de la abscisión, también sufren un fuerte descenso en la etapa de inducción tardía. Esto sugiere que las funciones de estos genes podrían ser requeridas en una fase temprana del proceso. Las funciones de la mayoría de ellos no son conocidas actualmente, por lo que un mayor conocimiento sobre ellas sería interesante para comprender mejor los procesos que tienen lugar en el proceso de abscisión.

## Resultados y discusión

**Tabla 7.** Tránscrios con mayor descenso de expresión en la fase de inducción tardía de abscisión. La tabla muestra el conteo total de lecturas para cada gen tras la normalización (RPKMx1000) en dos muestras: separación celular parcial de la ZA (38 DPA) y en la muestra de separación celular casi completa de la ZA (40 DPA).

Uniprot ID	38 DPA	40 DPA	Descripción
<b>B9S7U9</b>	18935,81	548,65	STS14 protein, putative
<b>D7TAI4</b>	10095,23	515,15	Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_10.assembly12x (Fragment)
<b>A5C4I3</b>	9694,44	678,57	Putative uncharacterized protein
<b>O80432</b>	6584,12	0	Mitochondrial small heat shock protein
<b>Q41321</b>	4690,47	659,86	Protein induced upon tuberization
<b>Q8H159</b>	4270,60	942,37	Polyubiquitin 10 [Cleaved into: Ubiquitin]
<b>A5BKB8</b>	4173,87	278,57	Putative uncharacterized protein
<b>O81245</b>	3309,69	0	Polygalacturonase
<b>O82089</b>	3195,59	393,93	AT3g56240/F18021_200 (Copper homeostasis factor)
<b>Q0WLP3</b>	2976,04	0	Putative uncharacterized protein
<b>D7SHE0</b>	2655,91	0	Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_0.assembly12x (Fragment)
<b>B9SIQ2</b>	2618,55	470,79	Alpha-amylase/subtilisin inhibitor, putative
<b>B9R7X8</b>	2590,71	232,06	Low-molecular-weight cysteine-rich protein LCR78, putative
<b>D7TQ86</b>	2440,91	225,74	Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_40.assembly12x (Fragment)
<b>B2ZP02</b>	2218,35	114,97	Beta-1,3-glucanase
<b>B9RMD4</b>	2175,88	0	Putative uncharacterized protein
<b>D7UB79</b>	2129,14	376,96	Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_24.assembly12x (Fragment)
<b>E0CU96</b>	2083,44	2,59	Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold_36.assembly12x (Fragment)
<b>P35132</b>	1725,22	204,95	SUMO-conjugating enzyme UBC9 (EC 6.3.2.-) (UBCAT4B) (Ubiquitin carrier protein 9) (Ubiquitin-conjugating enzyme E2 9) (Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa) (Ubiquitin-protein ligase 9)
<b>D8VD38</b>	1680	0	Ethylene response factor 11
<b>Q40345</b>	1466,51	15,39	Isocitrate dehydrogenase [NADP], chloroplastic (IDH) (EC 1.1.1.42) (IDP) (NADP(+)-specific ICDH) (Oxalosuccinate decarboxylase) (Fragment)

Una comparación de los genes que respondieron a abscisión durante los experimentos de inducción temprana y tardía indicó que 79 fueron inducidos en ambos experimentos, y que 530 fueron silenciados en ambos experimentos (Fig. 15A), la mayoría de los genes expresados diferencialmente durante la inducción temprana de la abscisión en la ZA del fruto aumentaron (1790 vs 899 disminuidos) (Fig. 15B), mientras que la mayoría de los genes que se expresaron diferencialmente durante la inducción tardía de la abscisión en la ZA del fruto disminuyeron (1310 vs 802 aumentados) (Fig 15B).

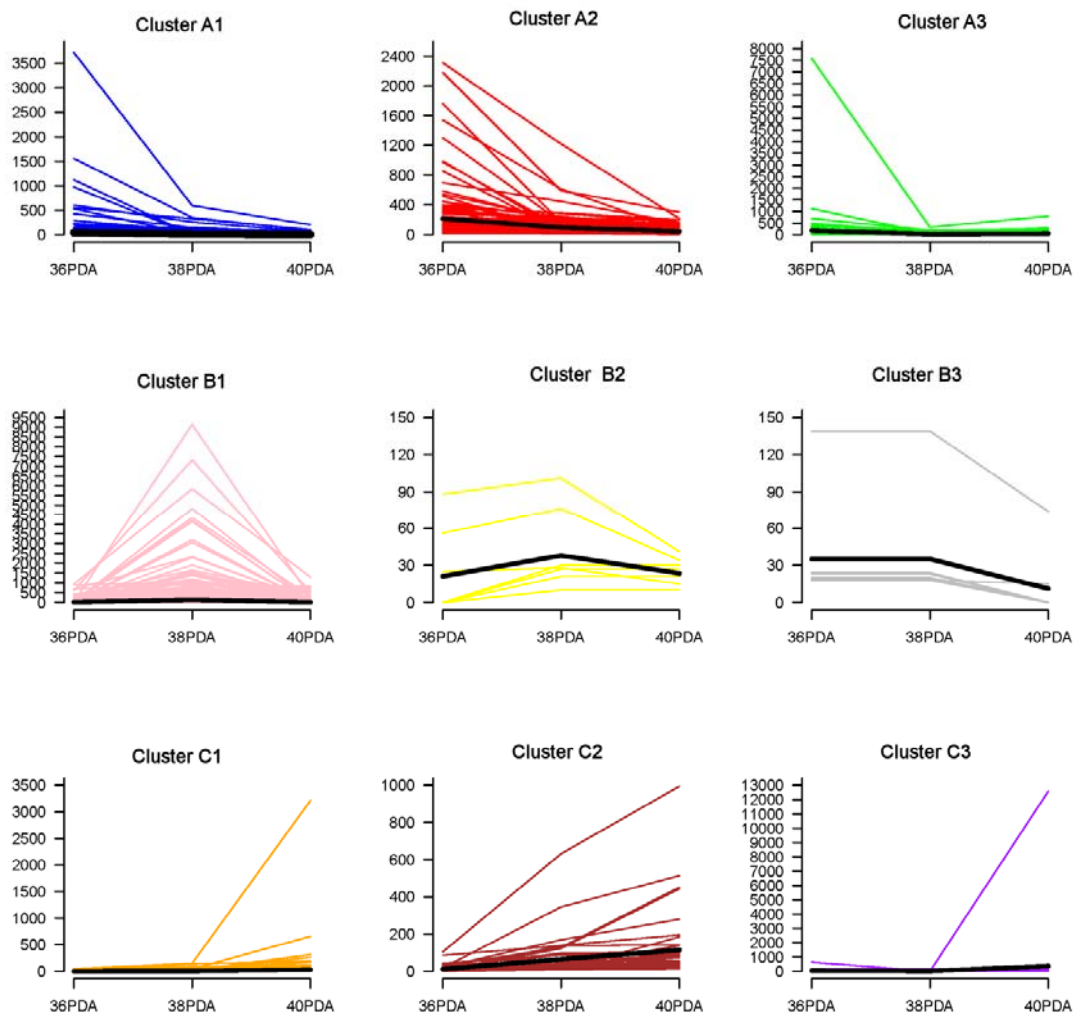


**Figura 15.** Genes de la ZA de melón durante MFA. (A), genes inducidos y reprimidos en la ZA del fruto durante la inducción temprana (comparación de ZA a 36 DPA y a 38 DPA), inducción tardía (comparación de la ZA a 38 DPA y a 40 DPA) y en ambas etapas en la abscisión de fruto maduro de melón. (B), porcentajes de los genes inducidos y silenciados durante la inducción temprana y tardía de la MFA de melón.

Para el análisis sobre que procesos celulares son críticos durante la abscisión de fruto maduro, los transcritos se agruparon en base a sus patrones de expresión a través de las tres muestras. El análisis de clusters jerárquicos de los genes del grupo I permitió la identificación de los tres clusters principales, denominados, A, B y C, los cuales contenían 795, 1.228 y 537 genes, respectivamente. Estos clusters de genes fueron subsecuentemente divididos en 3 subgrupos (A1, A2, A3); (B1, B2, B3) y (C1, C2 y C3), respectivamente (Fig. 16).

De manera general, los transcritos que mostraron un pico de abundancia a 36, 38 o 40 DPA se agruparon en los clusters A, B o C respectivamente. Los transcritos más abundantes para cada cluster se encuentran en la tabla 7. Los clusters de expresión A1-A3 así como el cluster C3 comprenden transcritos que disminuyen durante la inducción temprana de la abscisión mientras que los clusters B1 y B2 así como el cluster C2 comprenden transcritos que aumentan durante la inducción temprana de la abscisión (36 DPA - 38 DPA). Por otro lado, los clusters de expresión A2 y B3 comprenden transcritos que disminuyen durante la inducción tardía de la abscisión y los clusters A3, C1 y C3

comprenden transcritos que aumentan durante la inducción tardía de la abscisión (38 DPA - 40 DPA).



**Figura 16.** Nueve clusters según las firmas de expresión en las tres etapas de la ZA de melón (36, 38 y 40 DPA). Los grupos A1, A2 y A3 contenían los 524, 182 y 89 transcritos más abundantes en las muestras de separación pre celular (36 DPA), respectivamente. El cluster B1 incluye los 1.219 transcritos más abundantes en la muestra de separación celular parcial (38 DPA, inducción temprana de la abscisión). El cluster B2, más pequeño, incluyó los transcritos más abundantes en ambas muestras, inducción temprana y tardía de la abscisión (38 y 40 DPA). El cluster B3 contenía 7 transcritos más abundantes en las muestras pre-separación celular y separación celular parcial (36 y 38 DPA), y los transcritos con menores niveles de expresión en la muestra de separación celular casi completa (40 DPA, inducción tardía de abscisión). El cluster C1 incluyó los 407 transcritos más abundantes en la muestra de separación celular casi completa (40 DPA, inducción de abscisión tardía) exclusivamente. Los cluster C2 y C3 contenían los 93 y 37 transcritos más abundantes en la muestra de separación celular casi completa, respectivamente, pero en C2 los niveles de transcritos también aumentaban en la muestra de separación celular parcial respecto a la muestra de pre-separación celular, mientras que en C3 los niveles en la separación celular parcial eran menores respecto a la muestra de pre-separación celular.



El cambio en los patrones de expresión génica que ocurre durante la abscisión se refleja en el incremento sustancial de abundancia de transcritos de supuestos genes reguladores. Los transcritos más abundantes para cada grupo están listados en la tabla 8. Es notable el hecho de que la mayoría de los genes regulados diferencialmente (55%) en nuestros experimentos no tenían una función asignada previamente.

**Tabla 8.** Transcritos más abundantes en la ZA del fruto durante la abscisión de fruto maduro de melón. Las secuencias fueron seleccionadas tras establecer  $P < 0.01$ . La tabla muestra el conteo total de lecturas para cada gen tras la normalización (RPKMx1000) en las 3 muestras: (a) separación pre-celular de la AZ (36 DPA), (b) separación celular parcial de la AZ (38 DPA, inducción temprana de abscisión), (c) separación celular casi completa (40 DPA, inducción de abscisión tardía).

Cluster	UniProt ID	36 DPA	38 DPA	40 DPA	Descripción del gen
A1	B9ILN4	1229.79	0	0	Uncharacterized protein, POPTRDRAFT_669317 = <i>Populus trichocarpa</i>
	Q850K6	3140.05	0	0	Non-specific lipid-transfer protein = <i>Vitis vinifera</i>
	B9ILN4	1229.79	0	0	Uncharacterized protein, POPTRDRAFT_669317 = <i>Populus trichocarpa</i>
	D7U9D2	552.44	0	0	Uncharacterized protein, VIT_00026088001 = <i>Vitis vinifera</i>
	B9S715	312.03	0	0	ATP-dependent peptidase, RCOM_1331450 = <i>Ricinus communis</i>
	D7SZQ9	215.05	0	0	Uncharacterized protein, VIT_00027946001 = <i>Vitis vinifera</i>
	D7SIJ6	251.24	0	0	Serine/threonine-protein phosphatase, VIT_00008096001 = <i>Vitis vinifera</i>
	P12333	137.32	0	0	Chlorophyll a-b binding protein. chloroplastic (LHCII type I CAB) (LHCP) = <i>Spinacia oleracea</i>
	A5YWM1	168.20	0	0	Glutathione S-transferase (Glutathione transferase Tau1), GSTU1 = <i>Citrus sinensis</i>
	A8D009	119.59	0	0	Ferritin, Fer3 = <i>Pyrus pyrifolia</i>
	A5AWP0	242.18	0	0	Uncharacterized protein, VITISV_004511 = <i>Vitis vinifera</i>
	B9RMM2	147.94	0	0	Uncharacterized protein, RCOM_1081740 = <i>Ricinus communis</i>
	Q56Z40	82.03	0	0	RSH3, At1g54130
	D7SLU5	99.23	0	0	Uncharacterized protein, VIT_00018215001 = <i>Vitis vinifera</i>
	B9R7F5	112.57	0	0	Uncharacterized protein, RCOM_1591260 = <i>Ricinus communis</i>
	A5AYZ1	38.55	0	0	Malic enzyme, VITISV_024155 = <i>Vitis vinifera</i>
	P57106	74.29	0	0	Malate dehydrogenase. cytoplasmic 2, At5g43330 MWF20.2
	P26569	89.13	0	0	Histone H1.2, At2g30620 T06B20.3
	B9S552	117.44	0	0	Uncharacterized protein, RCOM_1721330 = <i>Ricinus communis</i>
	B9SWT3	54.18	0	0	3-isopropylmalate dehydrogenase = <i>Ricinus communis</i>
A2	A9PAH1	2972.60	385.84	59.36	Uncharacterized protein, POPTRDRAFT_830079 = <i>Populus trichocarpa</i>
	B9R7X8	6497.89	2590.71	232.06	Low-molecular-weight cysteine-rich protein LCR78. RCOM_1595110 = <i>Ricinus communis</i>
	D7SQM1	3337.12	316.28	268.93	Uncharacterized protein, VIT_00000754001 = <i>Vitis vinifera</i>
	D7TD89	3705.62	216.45	142.85	Uncharacterized protein, VIT_00030113001 = <i>Vitis vinifera</i>
	D7TQG9	3844.79	1044.09	534.39	Uncharacterized protein, VIT_00025626001 = <i>Vitis vinifera</i>
	D7UB79	4033.14	2129.1	376.96	Uncharacterized protein, VIT_00019304001 = <i>Vitis</i>

Resultados y discusión

		4		<i>vinifera</i>	
	Q8LAD0	1275.81	137.25	67.97	Pyridoxal biosynthesis protein PDX2 (Probable glutamine amidotransferase) (AtPDX2) (Protein EMBRYO DEFECTIVE 2407). PDX2 EMB2407 At5g60540 muf9.190
	D7T0X0	1426.99	90.90	63.36	Uncharacterized protein, VIT_00036785001 = <i>Vitis vinifera</i>
	A5C9I9	2504.27	777.77	653.84	Uncharacterized protein, VITISV_021844 VIT_00009367001 = <i>Vitis vinifera</i>
	Q8LEH3	488.44	112.21	0	Cinnamoyl-CoA reductase-like protein = <i>Arabidopsis thaliana</i>
	B9SZD6	284.18	50.56	4.27	Anthocyanin 5-aromatic acyltransferase = <i>Ricinus communis</i>
	P59232	1154.98	414.01	312.10	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a-2, RPS27AB UBQ6 At2g47110 F14M4.6
	A5B3D4	361.65	18.51	0	Uncharacterized protein, VITISV_028922 = <i>Vitis vinifera</i>
	B9R8J3	1011.59	646.37	236.23	Phosphoprotein ECPP44 = <i>Ricinus communis</i>
	D7TK38	215.77	102.56	63.86	Uncharacterized protein, VIT_00021436001 = <i>Vitis vinifera</i>
	D7SMR3	865.24	340.42	271.86	Uncharacterized protein, VIT_00036450001 = <i>Vitis vinifera</i>
	B9S940	815.04	500.00	235.77	28 kDa heat-and acid-stable phosphoprotein = <i>Ricinus communis</i>
	Q93VF1	751.72	427.58	234.48	At2g04520/T103.7
	A9PBT2	555.55	176.15	116.53	Uncharacterized protein, POPTRDRAFT_548036 = <i>Populus trichocarpa</i>
	A9PDV6	741.72	476.82	331.12	Uncharacterized protein, POPTRDRAFT_666912 = <i>Populus trichocarpa</i>
<b>A3</b>	D7UBL2	3090.90	126.72	253.44	Uncharacterized protein, VIT_00010910001 = <i>Vitis vinifera</i>
	P49690	18061.90	752.38	1897.61	60S ribosomal protein L23 (Protein EMBRYO DEFECTIVE 2171), RPL23A At1g04480 F19P19.5
	A5B6Y9	462.15	119.52	169.32	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein = <i>Vitis vinifera</i>
	D7U796	248.21	0	10.43	Uncharacterized protein, VIT_00013934001 = <i>Vitis vinifera</i>
	D7UCZ6	792.07	178.21	458.74	Uncharacterized protein, VIT_00012395001 = <i>Vitis vinifera</i>
	D7T502	566.10	0	139.66	Uncharacterized protein, VIT_00012876001 = <i>Vitis vinifera</i>
	D7SN28	864.36	455.17	482.75	Uncharacterized protein, VIT_00031366001 = <i>Vitis vinifera</i>
	Q6L3T8	759.25	301.58	306.87	60S ribosomal protein L34, putative = <i>Solanum demissum</i>
	Q08682	185.68	0	128.63	40S ribosomal protein Sa-1 (Laminin receptor homolog) (p40), RPSaA At1g72370 T10D10.16
	D7T9H6	246.28	91.29	94.47	Uncharacterized protein, VIT_00012054001 = <i>Vitis vinifera</i>
	B9SCC9	247.03	0	81.21	Steroid binding protein = <i>Ricinus communis</i>
	A5AKT0	117.41	19.70	111.89	Uncharacterized protein, VITISV_021574 = <i>Vitis vinifera</i>
	P59259	631.07	200.64	511.32	Histone H4. At1g07660 F24B9.25
	Q8VZB9	194.44	0	114.19	60S ribosomal protein L10a-1, RPL10AA At1g08360 T27G7.6
	B9RKC5	393.51	134.25	145.83	60S ribosomal protein L28 = <i>Ricinus communis</i>
	Q8GY66	614.45	184.73	377.51	Uncharacterized protein, At4g10262
	O23940	210.40	0	28.36	Acyl carrier protein = <i>Fragaria vesca</i>
	B6VC54	312.78	123.28	143.83	60S ribosomal protein L27A = <i>Vernicia fordii</i>
	B9RDU1	71.36	0	15.02	Cysteine synthase = <i>Ricinus communis</i>
	D7U1A2	124.29	0	52.73	40S ribosomal protein S12 = <i>Vitis vinifera</i>
<b>B1</b>	A5BKB8	74.92	4173.87	278.57	Uncharacterized protein, VITISV_001840 = <i>Vitis vinifera</i>
	A5C4I3	802.91	9694.44	678.57	Uncharacterized protein, VITISV_012740 = <i>Vitis vinifera</i>

Resultados y discusión

	B9RMD4	0	2175.88	0	Uncharacterized protein, RCOM_1079860 = <i>Ricinus communis</i>
	B9S7U9	37.26	18935.81	548.65	STS14 protein = <i>Ricinus communis</i>
	D7SHE0	0	2655.91	0	Uncharacterized protein, VIT_00007582001 = <i>Vitis vinifera</i>
	E0CU96	3.02	2083.44	2.59	Uncharacterized protein, VIT_00023471001 = <i>Vitis vinifera</i>
	O80432	0	6584.12	0	Mitochondrial small heat shock protein = <i>Solanum lycopersicum</i>
	O81245	0	3309.69	0	Polygalacturonase,MPG2 = <i>Cucumis melo</i>
	B2ZP02	30.91	2218.35	114.97	Beta-1.3-glucanase = <i>Vitis vinifera</i>
	D7TIT4	0	1210.85	0	Uncharacterized protein, VIT_00033671001 = <i>Vitis vinifera</i>
	B9SIQ2	0	2618.55	470.79	Alpha-amylase/subtilisin inhibitor = <i>Ricinus communis</i>
	Q0WLP3	0	2976.04	0	Uncharacterized protein = <i>Arabidopsis thaliana</i>
	B9T5B7	0	917.44	0	Glycosyltransferase = <i>Ricinus communis</i>
	Q40345	31.56	1466.51	15.39	Isocitrate dehydrogenase [NADP]. chloroplastic (IDH) (EC 1.1.1.42) (IDP) (NADP(+)-specific ICDH) (Oxalosuccinate decarboxylase) = <i>Medicago sativa</i>
	D8VD38	0	1680.00	0	Ethylene response factor 11, ERF11 = <i>Actinidia deliciosa</i>
	P22503	0	806.45	0	Endoglucanase (Abscission cellulase) (Endo-1.4-beta-glucanase) = <i>Phaseolus vulgaris</i>
	P52408	0	1133.33	0	Glucan endo-1.3-beta-glucosidase. basic isoform ((1->3)-beta-glucan endohydrolase) ((1->3)-beta-glucanase) (Beta-1.3-endoglucanase) (PpGns1) = <i>Prunus persica</i>
	B9S561	0	827.66	0	Pectate lyase = <i>Ricinus communis</i>
	Q8H159	680.52	4270.60	942.37	Polyubiquitin 10 [Cleaved into: Ubiquitin], UBQ10 At4g05320 C17L7.240
	B9SOK2	0	485.52	111.11	Phenylalanine ammonia-lyase = <i>Ricinus communis</i>
<b>B2</b>	D7U403	0	12.67	12.67	Uncharacterized protein, VIT_00022810001 = <i>Vitis vinifera</i>
	B9T5V3	0	19.60	19.60	Auxin-induced protein 5NG4 = <i>Ricinus communis</i>
<b>B3</b>	B9RQ45	313.06	313.06	166.66	Uncharacterized protein, RCOM_0954650 = <i>Ricinus communis</i>
	A5AIY9	46.51	46.51	0	Uncharacterized protein, VITISV_013093 = <i>Vitis vinifera</i>
	B9SX19	38.38	38.38	0	Transporter, RCOM_1259420 = <i>Ricinus communis</i>
	D7SH16	47.28	47.28	0	Uncharacterized protein, VIT_00008576001 = <i>Vitis vinifera</i>
	E0CQ54	33.68	33.68	0	Uncharacterized protein, VIT_00009900001 = <i>Vitis vinifera</i>
	B9SXB7	20.90	20.90	17.42	Prolyl 4-hydroxylase alpha subunit, RCOM_0782750 = <i>Ricinus communis</i>
	D7U851	16.52	16.52	0	Uncharacterized protein, VIT_00027465001 = <i>Vitis vinifera</i>
<b>C1</b>	A5AWY8	0	0	79.01	Uncharacterized protein, VITISV_008680 = <i>Vitis vinifera</i>
	A5C6A5	0	0	70.55	Uncharacterized protein, VITISV_042891 = <i>Vitis vinifera</i>
	B9SEN5	0	0	814.81	Early nodulin = <i>Ricinus communis</i>
	A2ICD0	0	0	94.36	Phenylalanine ammonia-lyase = <i>Vitis vinifera</i>
	D7TIQ9	0	0	92.94	Uncharacterized protein, VIT_00033642001 = <i>Vitis vinifera</i>
	B9STU5	0	0	57.26	Phenylalanine ammonia-lyase = <i>Ricinus communis</i>
	D7TBY0	0	0	364.48	Uncharacterized protein, VIT_00015498001 = <i>Vitis vinifera</i>
	Q2V4A1	0	0	222.22	Uncharacterized protein, At2g05440
	Q3L0Q9	0	0	106.87	Ethylene-responsive element binding protein ERF6

Resultados y discusión

				<b>= <i>Gossypium mexicanum</i></b>
B9S693	0	0	78.54	<b>Peroxidase 72 = <i>Ricinus communis</i></b>
Q93V19	0	0	107.80	<b>Uncharacterized protein M4I22.200, M4I22.200 At4g27390</b>
Q41963	0	0	88.27	<b>Aquaporin TIP1-2 (Gamma-tonoplast intrinsic protein 2) (Gamma-TIP2) (Tonoplast intrinsic protein 1-2) (AtTIP1;2). TIP1-2 SITIP TIP2 At3g26520 MFE16.17</b>
D7T4J5	0	0	77.98	<b>Ferritin (Fragment) = <i>Vitis vinifera</i></b>
Q93ZH5	0	0	54.82	<b>At1g21080/T22I11_9</b>
D7U4W1	0	0	63.06	<b>Uncharacterized protein, VIT_00023919001 = <i>Vitis vinifera</i></b>
Q8GVF5	28.57	28.57	80.27	<b>D07. full insert sequence) (cDNA clone:006-308-B01. full insert sequence) OJ1340_C08.131 Os07g0639800 Osj_25302 = <i>Oryza sativa</i></b>
B9S1P5	0	0	70.01	<b>Uncharacterized protein, RCOM_0867050 = <i>Ricinus communis</i></b>
C8CMH6	0	0	97.04	<b>Non-symbiotic haemoglobin = <i>Malus hupehensis</i></b>
A5C200	0	0	76.14	<b>Uncharacterized protein, VITISV_009604 = <i>Vitis vinifera</i></b>
B9DHJ1	0	0	38.56	<b>AT1G11910 protein</b>
D7TAM5	129.03	129.03	243.72	<b>Uncharacterized protein, VIT_00010327001 = <i>Vitis vinifera</i></b>
A5BDB9	0	0	25.59	<b>Uncharacterized protein, VITISV_027249 = <i>Vitis vinifera</i></b>
<b>C2</b>				
B9SZV0	75.11	234.74	5032.86	<b>Histone h1/h5 = <i>Ricinus communis</i></b>
D7STB3	84.50	206.57	3089.20	<b>Uncharacterized protein, VIT_00029731001 = <i>Vitis vinifera</i></b>
O65773	106.66	648.20	1020.51	<b>Peroxidase, aprx = <i>Cucurbita pepo</i></b>
A9PFE8	0	142.85	515.67	<b>Aquaporin. MIP family, PIP subfamily (Putative uncharacterized protein) = <i>Populus trichocarpa</i></b>
B9R9G7	12.08	16.11	318.22	<b>Arginine/serine-rich splicing factor = <i>Ricinus communis</i></b>
B9SWM8	0	6.95	128.74	<b>UDP-glucuronosyltransferase = <i>Ricinus communis</i></b>
Q9LX1	14.12	108.54	179.83	<b>Cinnamate 4-hydroxylase CYP73, C4H2 = <i>Citrus sinensis</i></b>
P25819	0	18.29	94.17	<b>Catalase-2, CAT2 CAT At4g35090 M4E13.140</b>
A7Y7M7	0	33.57	244.60	<b>Putative wound-induced protein = <i>Prunus dulcis</i></b>
C4P7Y8	0	217.52	305.16	<b>Calcineurin B-like protein 01 = <i>Vitis vinifera</i></b>
B9SCY3	25.64	102.56	284.38	<b>Uncharacterized protein, RCOM_1282260 = <i>Ricinus communis</i></b>
D7UAU0	63.57	242.26	324.74	<b>Uncharacterized protein, VIT_00014842001 = <i>Vitis vinifera</i></b>
B9RNW5	0	15.11	68.02	<b>CBL-interacting serine/threonine-protein kinase = <i>Ricinus communis</i></b>
B9T0K9	13.73	43.04	107.14	<b>Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein = <i>Ricinus communis</i></b>
B9SFD0	0	3.86	31.50	<b>ATATH13 = <i>Ricinus communis</i></b>
D7TPA7	21.89	26.76	133.81	<b>Uncharacterized protein, VIT_00011077001 = <i>Vitis vinifera</i></b>
A5BTC0	100.87	140.35	333.33	<b>Uncharacterized protein, VITISV_039385 = <i>Vitis vinifera</i></b>
B9VQ34	15.93	31.86	84.55	<b>Class IV chitinase = <i>Pyrus pyrifolia</i></b>
B9RUV8	4.12	13.75	32.55	<b>ATP-dependent transporter = <i>Ricinus communis</i></b>
B9T4J2	0	35.02	82.48	<b>Casein kinase II. alpha chain = <i>Ricinus communis</i></b>
<b>C3</b>				
Q9AVA8	638.81	0	13496.24	<b>Endochitinase MCHT-2 = <i>Cucumis melo</i></b>
B9SWY1	64.79	17.02	144.97	<b>Pyruvate decarboxylase = <i>Ricinus communis</i></b>
D7TL61	13.45	0	78.72	<b>Uncharacterized protein, VIT_00029971001 = <i>Vitis vinifera</i></b>
D7TV58	36.50	33.33	238.09	<b>Uncharacterized protein, VIT_00019409001 = <i>Vitis vinifera</i></b>
B9MZ79	69.29	0	100.87	<b>Uncharacterized protein, POPTRDRAFT_827290 = <i>Populus trichocarpa</i></b>

## Resultados y discusión

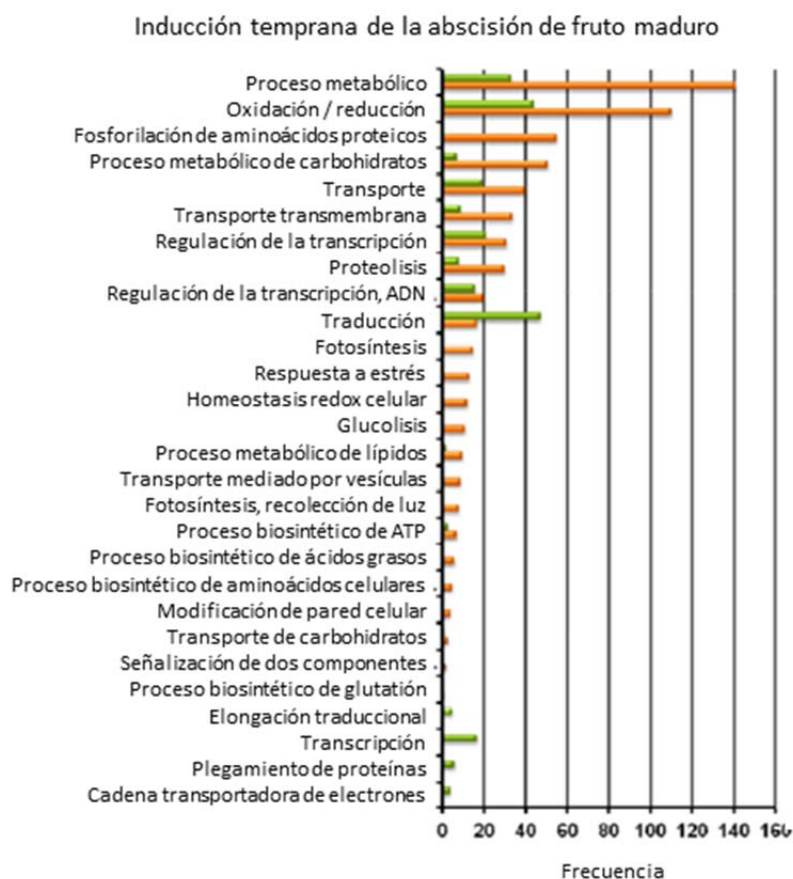
D7TT82	14.15	9.43	57.38	Uncharacterized protein, VIT_00000132001 = <i>Vitis vinifera</i>
B9R7W4	65.21	43.47	17.14	Uncharacterized protein, RCOM_1594870= <i>Ricinus communis</i>
A5BVF4	11.75	0	66.23	Uncharacterized protein, VITISV_027630 = <i>Vitis vinifera</i>
B9SI15	19.20	10.97	79.56	Ubiquitin-protein ligase = <i>Ricinus communis</i>
A5AX15	156.66	136.66	290.00	Ribosomal protein L36 = <i>Vitis vinifera</i>
Q03666	78.43	42.23	95.02	Glutathione S-transferase (Auxin-induced protein PCNT107) = <i>Nicotiana tabacum</i>
B9SLQ3	96.38	38.15	108.43	Glycine-rich RNA-binding protein = <i>Ricinus communis</i>
D7SJ03	27.43	0	39.63	Uncharacterized protein, VIT_00008303001 = <i>Vitis vinifera</i>
C0LQ98	25.34	0	29.18	Monodehydroascorbate reductase = <i>Malus domestica</i>
A9PA00	53.25	48.32	67.06	Uncharacterized protein, POPTRDRAFT_728998 = <i>Populus trichocarpa</i>
Q111D9	22.63	20.93	32.25	Pyruvate decarboxylase = <i>Citrus sinensis</i>
D7SIY8	24.96	14.68	52.86	Uncharacterized protein, VIT_00008284001 = <i>Vitis vinifera</i>
A9P745	7.49	0	19.76	Enolase, ENO1 = <i>Helianthus annuus</i>
B9RJ15	20.00	0	30.66	J domain-containing protein spf31 = <i>Ricinus communis</i>
D7TRX1	46.46	38.38	68.68	Uncharacterized protein, VIT_00007329001 = <i>Vitis vinifera</i>

### 4.2.2. Anotaciones GO

Para una mejor visión global de los procesos y funciones alteradas durante la inducción temprana y tardía de la abscisión del fruto maduro, se realizó una clasificación de los genes expresados diferencialmente usando la base de datos *Gene Ontology* (GO). Las entradas de GO fueron asignadas a los genes que se expresaban diferencialmente en base a la similitud de las secuencias con proteínas conocidas en la base de datos UniProt anotadas con entradas de GO así como los dominios InterPro y Pfam que contenían.

De los 10.513 isotigs anotados, a 6.431 se les asignó al menos un término GO (Tabla 2). Varias clasificaciones GO se encontraron sobrerrepresentadas en genes que habían incrementado o descendido la acumulación de su transcrito durante la inducción temprana o tardía de la abscisión. Los términos GO: “proceso metabólico”, “actividad catalítica” y “membrana” fueron los más representados entre las categorías: procesos biológicos (Figs. 17 y 18), función molecular (Figs 19 y 29), y componente celular (Fig. 21) respectivamente. La mayoría de los términos mostró un mayor número de genes inducidos que de silenciados durante la inducción temprana de la abscisión, lo que indica una fuerte tendencia hacia la inducción de genes distribuida a lo largo de las diferentes categorías. El grupo inducido durante la etapa temprana de la abscisión con el mayor número de genes expresados diferencialmente era “Proceso metabólico”, “oxidación-

reducción”, “fosforilación de aminoácidos de proteínas”, “proceso metabólico de carbohidratos”, “Transporte transmembrana” y “regulación de la transcripción” (Fig. 17). A su vez, en la etapa tardía de la abscisión, se observaron los mismos grupos conteniendo los mayores números de genes expresados diferencialmente, aunque esta vez reprimidos. Esta diferencia ilustra el cambio fisiológico producido entre ambas etapas de la inducción de la abscisión. Remarcablemente, la inducción temprana de la abscisión mostró una representación significativa de transcritos disminuidos relacionados con “traducción”, mientras que la predominancia de este término caracterizó la inducción tardía (Fig. 18), lo que sugiere que es improbable que la síntesis de proteínas actúe durante la inducción temprana de la abscisión, pero es requerida para la separación celular completa durante la abscisión de fruto maduro de melón.



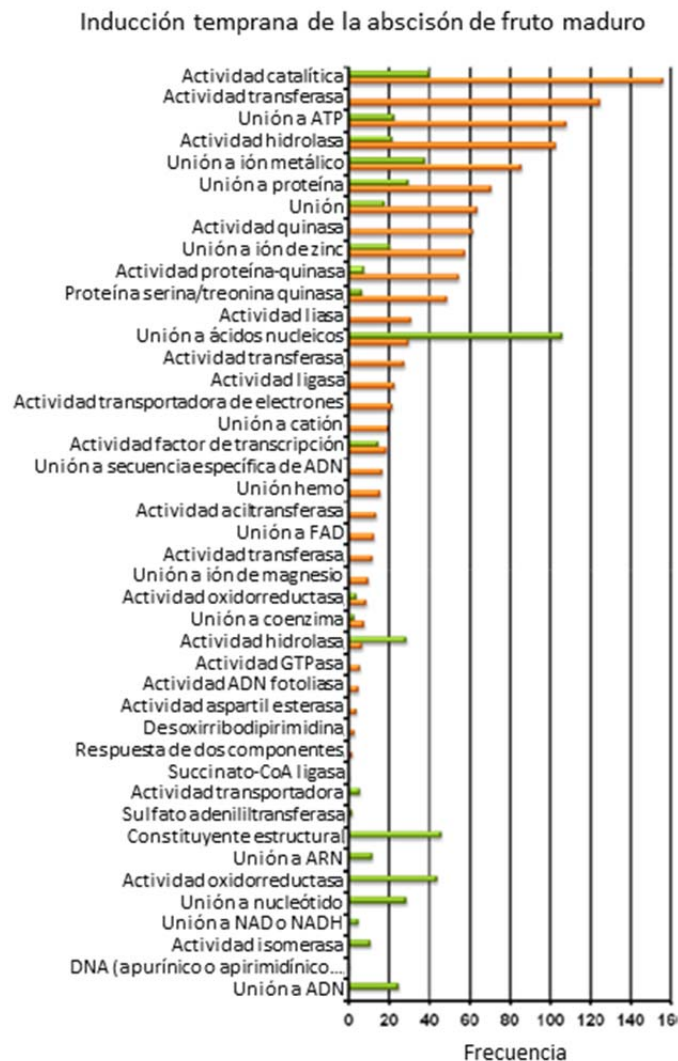
**Figura 17.** Términos de ontología de genes GO más abundantes durante la inducción temprana de la abscisión de fruto maduro de melón para las IDs de UniProt bajo procesos biológicos. El análisis de abundancia incluyó 1.790 transcritos con una acumulación aumentada de transcritos (barras naranjas), y 899 transcritos con una menor acumulación de transcritos (barras verdes).



**Figura 18.** Términos de ontología de genes GO más abundantes durante la inducción tardía de la abscisión de melón para las IDs de UniProt bajo procesos biológicos. El análisis de abundancia incluyó 802 transcritos con una acumulación incrementada de transcritos (barras naranjas) y 1.310 transcritos con menor acumulación de transcritos (barras verdes).

Al analizar los términos GO sobre funciones metabólicas más abundantes durante la inducción temprana (Fig. 19) y tardía (Fig. 20) de la abscisión se observó una gran coincidencia entre ambos procesos. Los mismos términos eran más abundantes en ambas etapas: “actividad catalítica”, “actividad transferasa”, “unión a ATP”, “actividad hidrolasa” y “unión a ión metálico”. Mientras que en la fase de inducción temprana estos términos eran otorgados a transcritos que principalmente presentaban un aumento de expresión, en la fase de inducción tardía sucedía al contrario, ya que estos términos eran asignados principalmente a transcritos que disminuían durante esta etapa, exceptuando el caso del término “unión a ATP” en el que la mayoría de los transcritos aumentaban, aunque en un nivel visiblemente menor que en la etapa de inducción temprana de la abscisión.

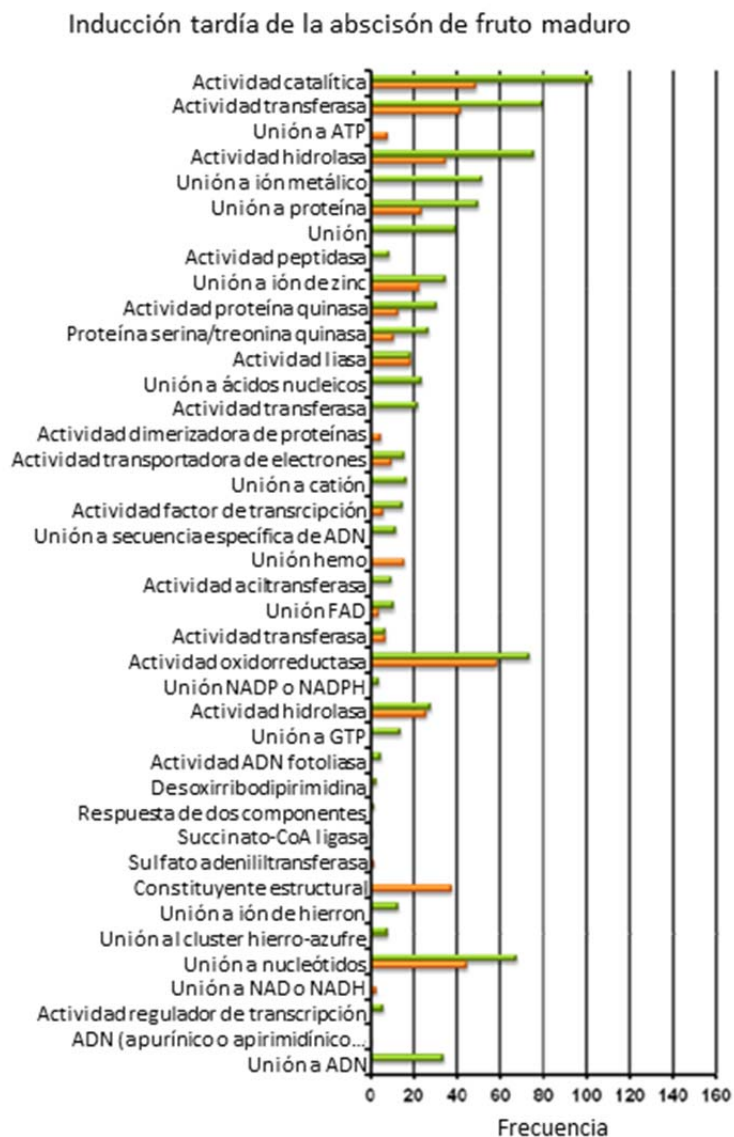
## Resultados y discusión



**Figura 19.** Términos de ontología de genes GO más abundantes durante la inducción temprana de la abscisión de fruto maduro de melón para las IDs de UniProt bajo funciones metabólicas. El análisis de abundancia incluyó: 1.790 transcritos con acumulación incrementada (barras naranjas) y 899 transcritos con menor acumulación de transcritos (barras verdes).

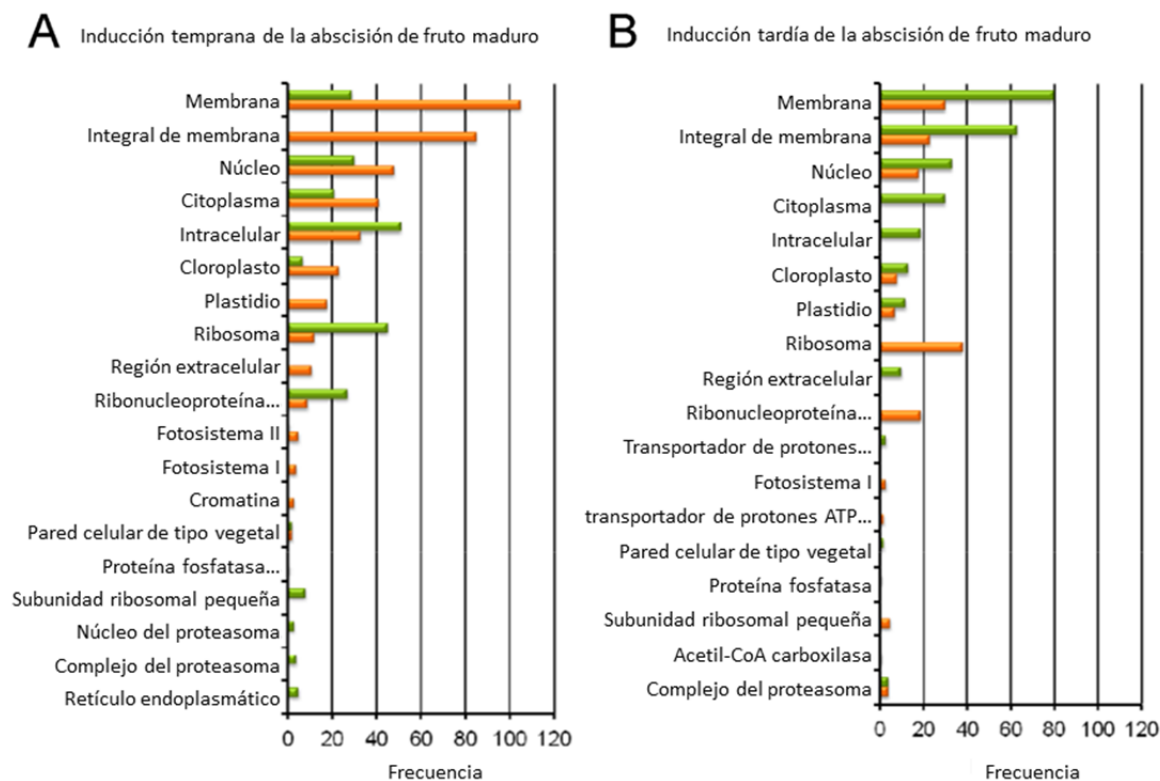
Al analizar los términos GO de localización celular asignados a los transcritos con expresión diferencial en las etapas de inducción temprana y tardía de la abscisión de fruto maduro (Fig. 21), se observó que los más representados coincidían en ambas etapas, siendo: “membrana”, “integral de membrana”, “núcleo”, “citoplasma” e “intracelular”. Al igual que ocurría en las otras categorías descritas anteriormente, la mayoría de los transcritos anotados con estos términos en la fase de inducción temprana presentaban un aumento de expresión, mientras que la mayoría de transcritos anotados con los mismos términos en la fase de inducción tardía presentaban un descenso de expresión.





**Figura 20.** Términos de ontología de genes GO más abundantes durante la inducción temprana tardía de la abscisión de fruto maduro de melón para las IDs de UniProt bajo funciones metabólicas. El análisis de abundancia incluyó 802 transcritos con acumulación incrementada (barras naranjas) y 1.310 transcritos con menor acumulación de transcritos (barras verdes).

Es interesante observar como en el caso del término “ribosoma” sucede al contrario y hay un mayor número de transcritos con expresión aumentada en la fase tardía mientras que existe una mayoría de transcritos con expresión disminuida en la fase temprana. Esto concuerda con la descripción realizada de las figuras 17 y 18, sobre el proceso “traducción” y apoya la idea de que una mayor síntesis proteica es requerida durante la inducción tardía de la abscisión.

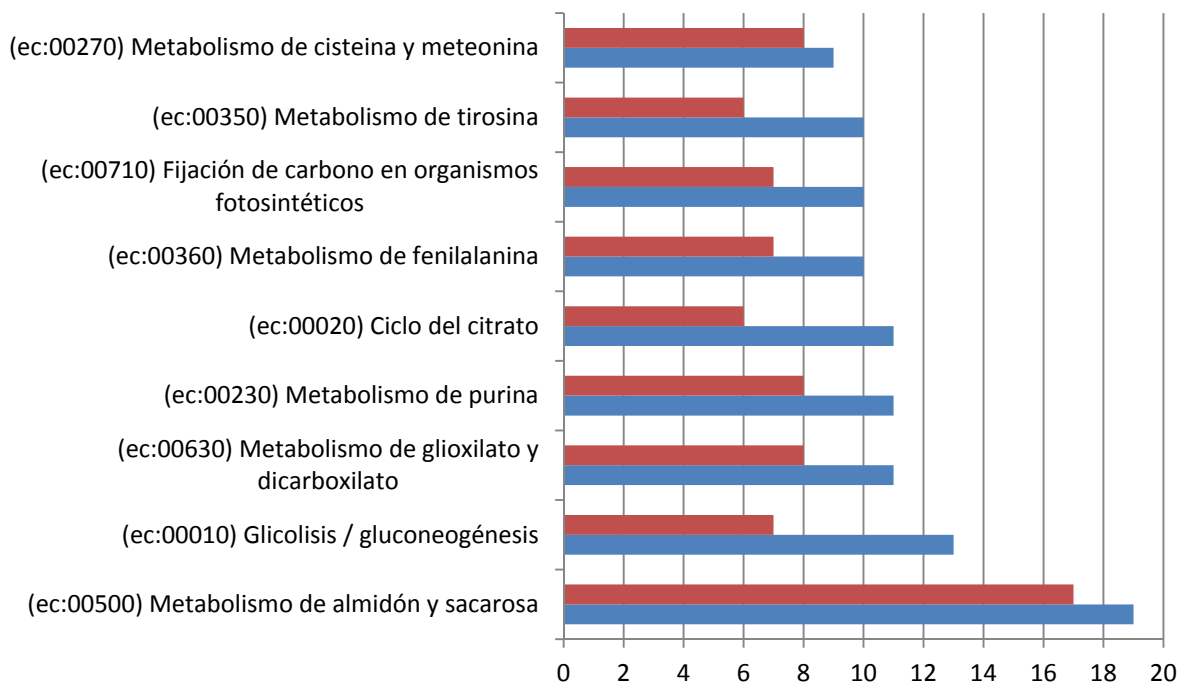


**Figura 21.** Términos de ontología de genes enriquecidos (GO) durante la inducción temprana (A) y tardía (B) de la abscisión de fruto maduro en melón para IDs UniProt bajo compartimentos celulares. Análisis de enriquecimiento incluido: 1.709 transcritos con acumulación incrementada de transcritos (barras naranjas), y 899 transcritos con acumulación descendida de transcritos (barras verdes) durante la inducción temprana de la abscisión; y 802 transcritos con acumulación incrementada de transcritos (barras naranjas) y 1.310 transcritos con acumulación descendida de transcritos (barras verdes) durante la inducción tardía de la abscisión.

#### 4.2.3 Rutas metabólicas en la abscisión de fruto maduro

El análisis del transcriptoma a diferentes momentos de la abscisión de fruto maduro es de gran utilidad para analizar si se producen cambios en la expresión de genes que participan en rutas metabólicas y poder conocer si algunas rutas se encuentran inducidas o reprimidas tanto en la inducción temprana (36 a 38 DPA) como en la inducción tardía (38 a 40 DPA) de la abscisión. De las 9073 proteínas detectadas en total en el experimento, 1391 fueron anotadas con códigos EC. Para identificar y definir las rutas metabólicas se realizó una búsqueda de las anotaciones EC obtenidas en la base de datos Enciclopedia de Kyoto de genes y genomas (KEGG; *the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database*; <http://www.genome.jp/kegg>; Ogata *et al.*, 1999). Se encontraron 109 rutas metabólicas con miembros diferencialmente expresados en la inducción temprana de la abscisión (tabla 9) y 104 rutas con miembros diferencialmente expresados en la inducción tardía de la abscisión (tabla 10). Algunas de las rutas encontradas contenían un gran número de

tránscritos con expresión diferencial. En la figura 22 se indican las 9 rutas que presentan mayor número de tránscritos con expresión diferencial en ambas etapas, inducción temprana y tardía de la abscisión de fruto maduro.



**Figura 22.** Rutas metabólicas con mayor representación en la búsqueda de tránscritos con expresión diferencial en la base de datos KEGG. En azul, número de tránscritos con expresión diferencial en la fase de inducción temprana de la abscisión (36 – 38 DPA). En rojo, número de tránscritos con expresión diferencial en la fase de inducción tardía de la abscisión (38 – 40 DPA).

Entre estas rutas se encuentran: “metabolismo de almidón y glucosa” (Fig. 23), “glicólisis y gluconeogénesis” (Fig. 24), “metabolismo de glioxilato y dicarboxilato” (Fig. 25), “metabolismo de purina” (Fig. 26), “metabolismo del citrato” (Fig. 27) “metabolismo de fenilalanina” (Fig. 28) “fijación de carbono en organismos fotosintéticos” (Fig. 29), “metabolismo de tirosina” (Fig. 30) “metabolismo de cisteína y metionina” (Fig. 31).

#### 4.2.3.1. Ruta del almidón y sacarosa

En la ruta metabólica del almidón y sacarosa (Fig. 23) se observó un mayor número de tránscritos expresados diferencialmente durante la inducción temprana de la abscisión que en la inducción tardía. Además, la mayor parte de dichos tránscritos que presentan una expresión diferencial se encuentran inducidos en la fase de inducción temprana de la abscisión y reprimidos en la fase de inducción tardía.

## Resultados y discusión

**Tabla 9.** Rutas metabólicas con mayor número de genes diferencialmente expresados en la fase de inducción temprana de la abscisión de fruto maduro. En la primera columna, códigos EC (*Enzyme Commission numbers*), en la segunda columna se nombra cada ruta asignada a cada código EC. Entre paréntesis, número de genes expresados diferencialmente encontrados en dicha ruta.

<b>Código EC</b>	<b>Ruta metabólica</b>
ec01100	Metabolic pathways (161)
ec01110	Biosynthesis of secondary metabolites (94)
ec01120	Microbial metabolism in diverse environments (47)
ec00500	Starch and sucrose metabolism (19)
ec00010	Glycolysis / Gluconeogenesis (13)
ec00630	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism (11)
ec00230	Purine metabolism (11)
ec00020	Citrate cycle (TCA cycle) (11)
ec00360	Phenylalanine metabolism (10)
ec00710	Carbon fixation in photosynthetic organisms (10)
ec00350	Tyrosine metabolism (10)
ec00270	Cysteine and methionine metabolism (9)
ec00620	Pyruvate metabolism (9)
ec00260	Glycine, serine and threonine metabolism (9)
ec00520	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism (9)
ec00480	Glutathione metabolism (9)
ec00330	Arginine and proline metabolism (9)
ec00040	Pentose and glucuronate interconversions (8)
ec00860	Porphyrin and chlorophyll metabolism (8)
ec00030	Pentose phosphate pathway (7)
ec00720	Carbon fixation pathways in prokaryotes (7)
ec00071	Fatty acid degradation (7)
ec00900	Terpenoid backbone biosynthesis (7)
ec00280	Valine, leucine and isoleucine degradation (7)
ec00051	Fructose and mannose metabolism (7)
ec00190	Oxidative phosphorylation (7)
ec00950	Isoquinoline alkaloid biosynthesis (7)
ec00052	Galactose metabolism (6)
ec00982	Drug metabolism - cytochrome P450 (6)
ec00680	Methane metabolism (6)
ec00592	alpha-Linolenic acid metabolism (6)
ec00380	Tryptophan metabolism (6)
ec00250	Alanine, aspartate and glutamate metabolism (5)
ec00564	Glycerophospholipid metabolism (5)
ec00240	Pyrimidine metabolism (5)
ec00053	Ascorbate and aldarate metabolism (5)
ec00941	Flavonoid biosynthesis (5)
ec00310	Lysine degradation (5)
ec00640	Propanoate metabolism (5)
ec00400	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis (5)
ec00980	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 (5)
ec01040	Biosynthesis of unsaturated fatty acids (5)
ec00562	Inositol phosphate metabolism (4)
ec00940	Phenylpropanoid biosynthesis (4)
ec00590	Arachidonic acid metabolism (4)
ec00460	Cyanoamino acid metabolism (4)
ec00960	Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis (4)
ec00061	Fatty acid biosynthesis (4)
ec00130	Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis (4)
ec00627	Aminobenzoate degradation (3)
ec00670	One carbon pool by folate (3)
ec00561	Glycerolipid metabolism (3)
ec00910	Nitrogen metabolism (3)
ec00780	Biotin metabolism (3)
ec00290	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis (3)
ec00565	Ether lipid metabolism (3)
ec00362	Benzoate degradation (3)
ec00920	Sulfur metabolism (3)
ec00600	Sphingolipid metabolism (3)

## Resultados y discusión

<b>ec00650</b>	Butanoate metabolism (3)
<b>ec00643</b>	Styrene degradation (2)
<b>ec00740</b>	Riboflavin metabolism (2)
<b>ec01053</b>	Biosynthesis of siderophore group nonribosomal peptides (2)
<b>ec00232</b>	Caffeine metabolism (2)
<b>ec00591</b>	Linoleic acid metabolism (2)
<b>ec00062</b>	Fatty acid elongation (2)
<b>ec00550</b>	Peptidoglycan biosynthesis (2)
<b>ec00830</b>	Retinol metabolism (2)
<b>ec00410</b>	beta-Alanine metabolism (2)
<b>ec00760</b>	Nicotinate and nicotinamide metabolism (2)
<b>ec00450</b>	Selenocompound metabolism (2)
<b>ec00942</b>	Anthocyanin biosynthesis (2)
<b>ec00906</b>	Carotenoid biosynthesis (2)
<b>ec00511</b>	Other glycan degradation (2)
<b>ec00281</b>	Geraniol degradation (2)
<b>ec00401</b>	Novobiocin biosynthesis (2)
<b>ec00770</b>	Pantothenate and CoA biosynthesis (2)
<b>ec00340</b>	Histidine metabolism (2)
<b>ec00604</b>	Glycosphingolipid biosynthesis - ganglio series (1)
<b>ec00633</b>	Nitrotoluene degradation (1)
<b>ec00140</b>	Steroid hormone biosynthesis (1)
<b>ec00254</b>	Aflatoxin biosynthesis (1)
<b>ec00510</b>	N-Glycan biosynthesis (1)
<b>ec00642</b>	Ethylbenzene degradation (1)
<b>ec00983</b>	Drug metabolism - other enzymes (1)
<b>ec00625</b>	Chloroalkane and chloroalkene degradation (1)
<b>ec00903</b>	Limonene and pinene degradation (1)
<b>ec01057</b>	Biosynthesis of type II polyketide products (1)
<b>ec00904</b>	Diterpenoid biosynthesis (1)
<b>ec00253</b>	Tetracycline biosynthesis (1)
<b>ec00945</b>	Stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis (1)
<b>ec00944</b>	Flavone and flavonol biosynthesis (1)
<b>ec00072</b>	Synthesis and degradation of ketone bodies (1)
<b>ec00943</b>	Isoflavonoid biosynthesis (1)
<b>ec00981</b>	Insect hormone biosynthesis (1)
<b>ec00626</b>	Naphthalene degradation (1)
<b>ec00531</b>	Glycosaminoglycan degradation (1)
<b>ec00901</b>	Indole alkaloid biosynthesis (1)
<b>ec00231</b>	Puromycin biosynthesis (1)
<b>ec00930</b>	Caprolactam degradation (1)
<b>ec00430</b>	Taurine and hypotaurine metabolism (1)
<b>ec00908</b>	Zeatin biosynthesis (1)
<b>ec00195</b>	Photosynthesis (1)
<b>ec00966</b>	Glucosinolate biosynthesis (1)
<b>ec00563</b>	Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchor biosynthesis (1)
<b>ec00660</b>	C5-Branched dibasic acid metabolism (1)
<b>ec00750</b>	Vitamin B6 metabolism (1)
<b>ec00521</b>	Streptomycin biosynthesis (1)
<b>ec00300</b>	Lysine biosynthesis (1)

## Resultados y discusión

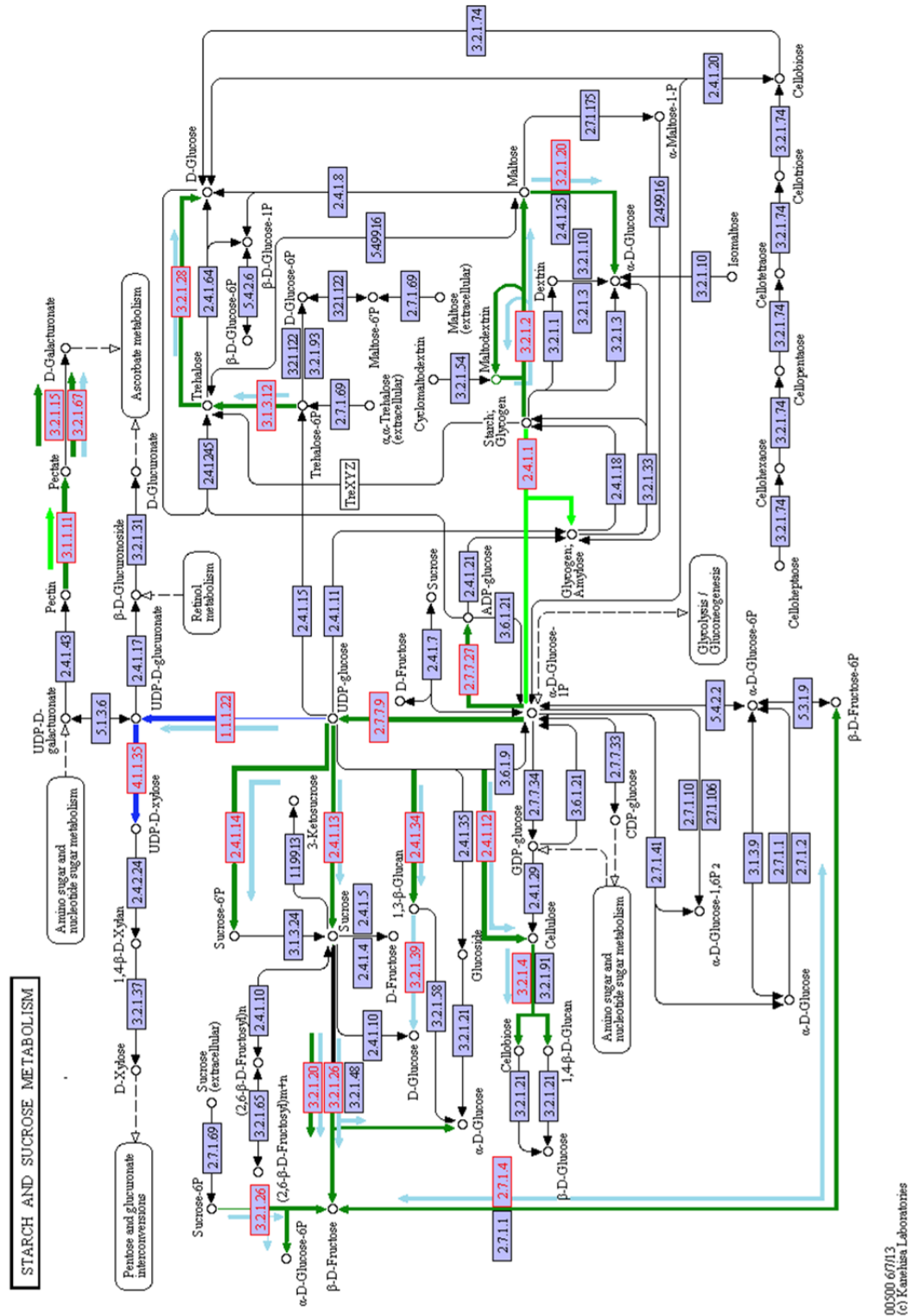
**Tabla 10.** Rutas metabólicas con mayor número de genes diferencialmente expresados en la fase de inducción tardía de la abscisión de fruto maduro. En la primera columna, códigos EC (*Enzyme Commission numbers*), en la segunda columna se nombra cada ruta asignada a cada código EC. Entre paréntesis, número de genes expresados diferencialmente encontrados en dicha ruta.

<b>Código EC</b>	<b>Ruta metabólica</b>
ec01100	Metabolic pathways (133)
ec01110	Biosynthesis of secondary metabolites (77)
ec01120	Microbial metabolism in diverse environments (40)
ec00500	Starch and sucrose metabolism (17)
ec00230	Purine metabolism (8)
ec00270	Cysteine and methionine metabolism (8)
ec00630	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism (8)
ec00710	Carbon fixation in photosynthetic organisms (7)
ec00360	Phenylalanine metabolism (7)
ec00720	Carbon fixation pathways in prokaryotes (7)
ec00040	Pentose and glucuronate interconversions (7)
ec00900	Terpenoid backbone biosynthesis (7)
ec00350	Tyrosine metabolism (7)
ec00010	Glycolysis / Gluconeogenesis (7)
ec00240	Pyrimidine metabolism (6)
ec00030	Pentose phosphate pathway (6)
ec00940	Phenylpropanoid biosynthesis (6)
ec00860	Porphyrin and chlorophyll metabolism (6)
ec00480	Glutathione metabolism (6)
ec00051	Fructose and mannose metabolism (6)
ec00190	Oxidative phosphorylation (6)
ec00330	Arginine and proline metabolism (6)
ec00620	Pyruvate metabolism (5)
ec00020	Citrate cycle (TCA cycle) (5)
ec00260	Glycine, serine and threonine metabolism (5)
ec00520	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism (5)
ec00053	Ascorbate and aldarate metabolism (5)
ec00052	Galactose metabolism (5)
ec00941	Flavonoid biosynthesis (5)
ec00400	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis (5)
ec00680	Methane metabolism (5)
ec00380	Tryptophan metabolism (5)
ec00950	Isoquinoline alkaloid biosynthesis (5)
ec00250	Alanine, aspartate and glutamate metabolism (4)
ec00564	Glycerophospholipid metabolism (4)
ec00982	Drug metabolism - cytochrome P450 (4)
ec00071	Fatty acid degradation (4)
ec00310	Lysine degradation (4)
ec00640	Propanoate metabolism (4)
ec00980	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 (4)
ec00362	Benzoate degradation (4)
ec00410	beta-Alanine metabolism (4)
ec00280	Valine, leucine and isoleucine degradation (4)
ec00130	Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis (4)
ec00592	alpha-Linolenic acid metabolism (4)
ec00920	Sulfur metabolism (4)
ec01040	Biosynthesis of unsaturated fatty acids (4)
ec00650	Butanoate metabolism (4)
ec00627	Aminobenzoate degradation (3)
ec00562	Inositol phosphate metabolism (3)
ec00561	Glycerolipid metabolism (3)
ec00983	Drug metabolism - other enzymes (3)
ec00232	Caffeine metabolism (3)
ec00460	Cyanoamino acid metabolism (3)
ec00960	Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis (3)
ec00450	Selenocompound metabolism (3)
ec00061	Fatty acid biosynthesis (3)
ec00643	Styrene degradation (2)
ec00670	One carbon pool by folate (2)

## Resultados y discusión

<b>ec00140</b>	Steroid hormone biosynthesis (2)
<b>ec00590</b>	Arachidonic acid metabolism (2)
<b>ec00290</b>	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis (2)
<b>ec00944</b>	Flavone and flavonol biosynthesis (2)
<b>ec00591</b>	Linoleic acid metabolism (2)
<b>ec00062</b>	Fatty acid elongation (2)
<b>ec00565</b>	Ether lipid metabolism (2)
<b>ec00901</b>	Indole alkaloid biosynthesis (2)
<b>ec00195</b>	Photosynthesis (2)
<b>ec00906</b>	Carotenoid biosynthesis (2)
<b>ec00281</b>	Geraniol degradation (2)
<b>ec00401</b>	Novobiocin biosynthesis (2)
<b>ec00750</b>	Vitamin B6 metabolism (2)
<b>ec00600</b>	Sphingolipid metabolism (2)
<b>ec00604</b>	Glycosphingolipid biosynthesis - ganglio series (1)
<b>ec00740</b>	Riboflavin metabolism (1)
<b>ec00785</b>	Lipoic acid metabolism (1)
<b>ec00254</b>	Aflatoxin biosynthesis (1)
<b>ec00510</b>	N-Glycan biosynthesis (1)
<b>ec00642</b>	Ethylbenzene degradation (1)
<b>ec00910</b>	Nitrogen metabolism (1)
<b>ec00903</b>	Limonene and pinene degradation (1)
<b>ec01053</b>	Biosynthesis of siderophore group nonribosomal peptides (1)
<b>ec00780</b>	Biotin metabolism (1)
<b>ec00624</b>	Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation (1)
<b>ec00253</b>	Tetracycline biosynthesis (1)
<b>ec00945</b>	Stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis (1)
<b>ec00072</b>	Synthesis and degradation of ketone bodies (1)
<b>ec00943</b>	Isoflavonoid biosynthesis (1)
<b>ec00830</b>	Retinol metabolism (1)
<b>ec00531</b>	Glycosaminoglycan degradation (1)
<b>ec00760</b>	Nicotinate and nicotinamide metabolism (1)
<b>ec00930</b>	Caprolactam degradation (1)
<b>ec00430</b>	Taurine and hypotaurine metabolism (1)
<b>ec00942</b>	Anthocyanin biosynthesis (1)
<b>ec00908</b>	Zeatin biosynthesis (1)
<b>ec00563</b>	Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchor biosynthesis (1)
<b>ec00511</b>	Other glycan degradation (1)
<b>ec00730</b>	Thiamine metabolism (1)
<b>ec00660</b>	C5-Branched dibasic acid metabolism (1)
<b>ec00521</b>	Streptomycin biosynthesis (1)
<b>ec00300</b>	Lysine biosynthesis (1)
<b>ec00970</b>	Aminoacyl-tRNA biosynthesis (1)
<b>ec00770</b>	Pantothenate and CoA biosynthesis (1)
<b>ec00340</b>	Histidine metabolism (1)

Este comportamiento es seguido por enzimas que degradan polisacáridos, tales como la  $\beta$ -amilasa (ec:3.2.1.2), encargada de degradar el almidón y formar moléculas más simples como la maltosa y maltodextrina. A su vez, la enzima que degrada la maltosa en  $\alpha$ -D-glucosa, la  $\alpha$ -glucosidasa (ec:3.2.1.20) presenta la misma tendencia, aumentando su expresión en la inducción temprana de la abscisión y disminuyendo en la tardía. Otra enzima que se encarga de degradar polisacáridos, la pectinesterasa (ec:3.1.1.11), degrada pectina dando lugar a pectato.



00500\_67113  
(c) Kanitaka Laboratories

**Figura 23.** Representación gráfica de la ruta del metabolismo de almidón y sacarosa según KEGG. Los códigos EC en rojo codifican genes expresados diferencialmente en la ZA durante la abscisión de fruto maduro en melón. Las flechas de color verde oscuro (■) y azul (■) representan un aumento y descenso de la expresión respectivamente en la etapa de inducción temprana de la abscisión. Las flechas de color verde claro (■) y azul claro (■) representan un aumento y descenso de la expresión respectivamente en la etapa de inducción tardía de la abscisión. [ec:1.1.1.22](#) UDP-glucose 6-dehidrogenase; [ec:2.4.1.1](#) Phosphorylase; [ec:2.4.1.12](#) Transferase; [ec:2.4.1.13](#) Sucrose synthase; [ec:2.4.1.14](#) Sucrose-phosphate synthase 1; [ec:2.4.1.34](#) 1,3-beta-glucan synthase; [ec:2.7.1.4](#) Fructokinase; [ec:2.7.7.27](#) Glucose-1-phosphate adenyltransferase; [ec:2.7.7.9](#) Utp-glucose-1-phosphate uridyltransferase; [ec:3.1.1.11](#) Pectinesterase; [ec:3.1.3.12](#) Trehalose-6-phosphate synthase; [ec:3.2.1.15](#) Polygalacturonase; [ec:3.2.1.2](#) Beta-amilase; [ec:3.2.1.20](#) Alpha-glucosidase; [ec:3.2.1.26](#) Beta-fructofuranosidase; [ec:3.2.1.28](#) alpha-trehalase; [ec:3.2.1.39](#) Glucan endo-1,3-beta-glucosidase; [ec:3.2.1.4](#) Endo-beta-1,4-glucanase; [ec:3.2.1.67](#) Polygalacturonase; [ec:4.1.1.35](#) Dtdp-glucose 4-6-dehidratase.

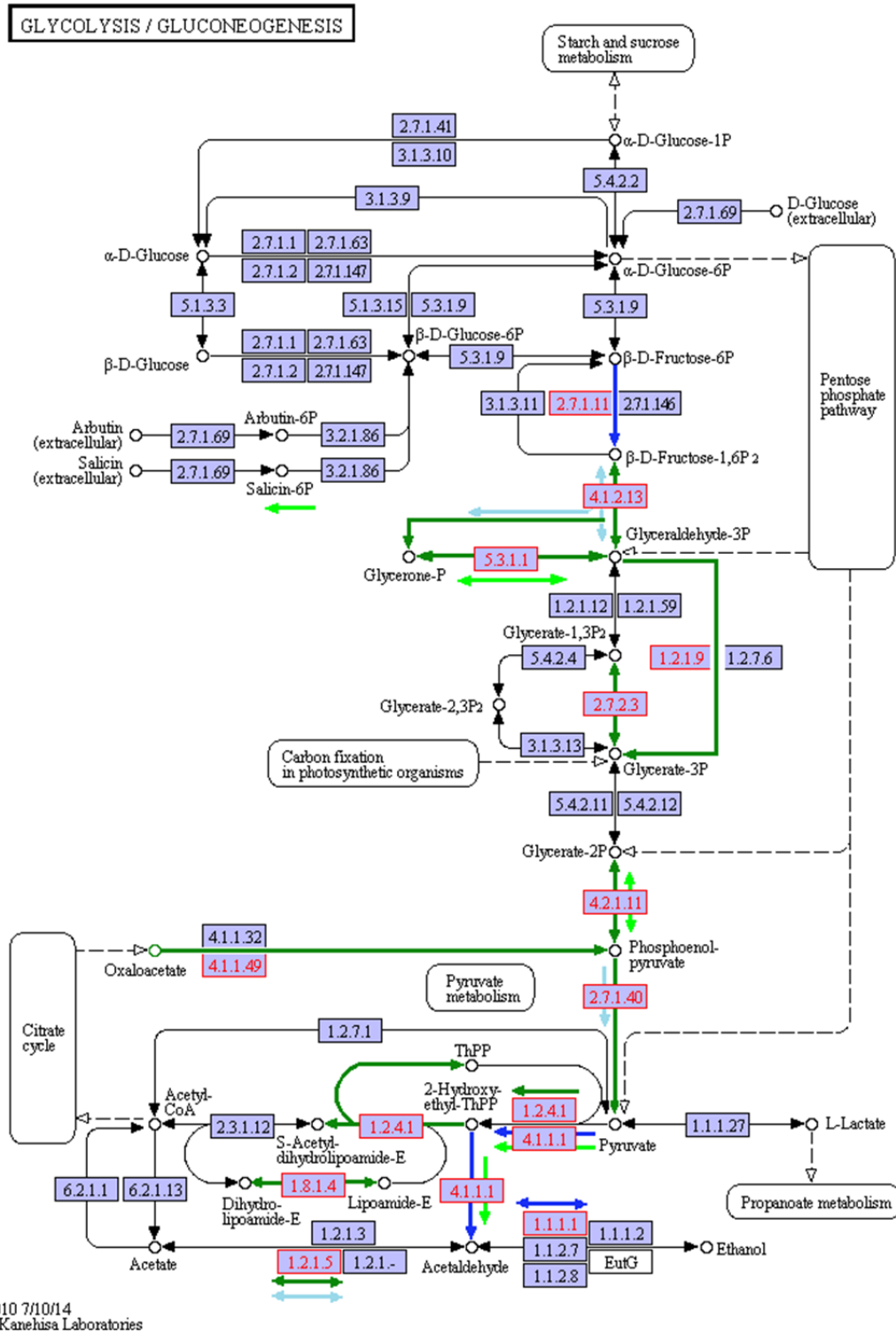


Esta enzima se encuentra inducida tanto en la inducción temprana como en la inducción tardía de la abscisión, y podría actuar en mecanismos de degradación de pared celular a lo largo del proceso de separación celular, como ha sido observado en eventos de abscisión en estambres, hojas y pétalos (Agustí y cols., 2009; Cai y Lashbrook, 2008; Sinh y cols., 2011). Las poligalacturonasas que continúan degradando el pectato a D-galacturonato también se encuentran inducidas en la fase temprana de inducción de la abscisión (ec:3.2.1.15; ec:3.2.1.67), por lo que también podrían participar en los mecanismos de degradación en la etapa de inducción temprana. Por otro lado, parece existir una degradación de trehalosa a D-glucosa durante la etapa de inducción temprana de la abscisión, debido a la inducción en esa etapa y posterior disminución en la inducción tardía de las enzimas trehalosa 6-fosfato sintasa (ec:3.1.3.12) y  $\alpha$ -trehalasa (ec:3.2.1.28) que catalizan la transformación de trehalosa-6P a trehalosa y de trehalosa a D-glucosa respectivamente. En general, parece haber una tendencia común en una serie de enzimas que catalizan la formación de monosacáridos activados y que se encuentran inducidas en la fase de inducción temprana de la abscisión y reprimidas en la fase de inducción tardía. Estas enzimas son: la fructoquinasa (ec:2.7.1.4) que realiza la interconversión entre la  $\beta$ -D-fructosa y la  $\beta$ -D-fructosa-6P y la  $\beta$ -fructofuranosidasa (ec:3.2.1.26), que degrada la sacarosa en  $\beta$ -D-fructosa y  $\alpha$ -D-glucosa. Las enzimas glucosa-1-fosfato adenililtransferasa (ec:2.7.7.27) y UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa (ec:2.7.7.9), solo se encuentran inducidas en la fase de inducción temprana y se encargan de producir ATP-glucosa y UDP-glucosa respectivamente. En el caso de enzimas que se encuentran reprimidas durante la inducción de la abscisión se encuentran la UDP-glucosa 6-deshidrogenasa (ec:1.1.1.22), con una expresión que disminuye en la fase temprana y tardía de la abscisión y que se encarga de oxidar la UDP-glucosa a UDP-D-glucuronato y la dTDP-glucosa-4,6-deshidratasa (ec:4.1.1.35), encargada de transformar UDP-D-glucuronato a UDP-D-xilosa, y cuya expresión disminuye solo en la fase de inducción temprana de la abscisión. En el análisis de expresión, además de enzimas encargadas de hidrolizar y degradar moléculas complejas también se encontraron enzimas encargadas de sintetizarlas. Este es el caso por ejemplo de la enzima celulosa sintasa (ec:2.4.1.12), que cataliza la formación de celulosa, actuando como una glucosil-transferasa que transfiere monómeros de UDP-glucosa a las moléculas de celulosa en formación. Esta enzima aumenta su expresión en la inducción temprana de la abscisión para descender posteriormente en la inducción tardía, lo que sugiere que la formación de celulosa está activada durante la fase de inducción temprana de este proceso. A su vez, la enzima que degrada la celulosa, la endo- $\beta$ -1,4-glucanasa (ec:3.2.1.4) sigue el mismo patrón de regulación, esta enzima se encarga de degradar la celulosa en celobiosa y 1,4- $\beta$ -glucano. Las enzimas de síntesis de sacarosa, sacarosa

sintasa (ec:2.4.1.13) y sacarosa-P sintasa 1 (ec:2.4.1.14) aumentan su expresión en la fase de inducción temprana de la abscisión y la disminuyen en la fase de inducción tardía. Estas enzimas catalizan la síntesis de sacarosa a partir de glucosa y fructosa. Parece ser, por tanto, que la producción de sacarosa está activa durante la primera fase de inducción de la abscisión. La sacarosa presenta una diversidad funcional en plantas superiores ya que sirve como azúcar de transporte, nutriente y molécula señal (Winter y Huber, 2000), por lo que su aumento de producción durante la abscisión podría jugar algún papel en el proceso. Con una regulación similar, de aumento en la fase temprana de inducción de la abscisión y disminución en la fase de inducción tardía, se encuentra la enzima 1,3- $\beta$ -glucano sintasa (ec:2.4.1.34). Esta enzima se encarga de producir 1,3- $\beta$ -glucano a partir de glucosa activada. Esta molécula es uno de los componentes de la pared celular (Brownfield y cols., 2009), por lo que la expresión diferencial de la 1,3- $\beta$ -glucano sintasa podría estar relacionada con los eventos de remodelación de pared ocurridos en la abscisión. A su vez, la enzima que degrada el 1,3-glucano en D-glucosa, la glucan endo-1,3- $\beta$ -glucosidasa (ec:3.2.1.39) se encuentra reprimida en la fase de inducción tardía de la abscisión.

#### **4.2.3.2. Glicólisis y gluconeogénesis**

En la figura 24 se representa gráficamente la ruta metabólica de la glicólisis y gluconeogénesis. Estas dos vías comparten algunas enzimas y ambas se encuentran estrictamente reguladas de manera que no se den en la misma célula a la vez de manera significativa. La primera enzima al seguir el curso de la glicólisis es la fosfofructoquinasa, que cataliza la transformación de fructosa 6-fosfato a fructosa 1,6-bifosfato. Esta enzima es una de los principales reguladores de la glucolisis (van Dongen y cols., 2010). La expresión de esta enzima se encuentra disminuida en la fase de inducción temprana de la abscisión, por lo que la vía de la glicólisis podría encontrarse reprimida durante dicha fase de inducción temprana. En contraste, puede observarse como varias enzimas de la misma vía glicolítica se encuentran inducidas al menos durante la fase de inducción temprana. Estas enzimas son la fructosa-bifosfato aldolasa (ec:4.1.2.13) encargada de catalizar la rotura de la fructosa 1,6-bifosfato en gliceraldehído 3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato. Esta enzima aumenta durante la inducción temprana de la abscisión y su expresión desciende en la inducción tardía del proceso. Las siguientes enzimas en la ruta son, por un lado, la triosa fosfato isomerasa (ec:5.3.1.1), que transforma la dihidroxiacetona fosfato en gliceraldehído 3-fosfato y que se encuentra inducida en ambas etapas de la abscisión, y por otro lado, la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (ec:1.2.1.9), que cataliza la conversión de gliceraldehído 3-fosfato a 3-fosfoglicerato estando esta enzima solo inducida en la fase de inducción temprana.



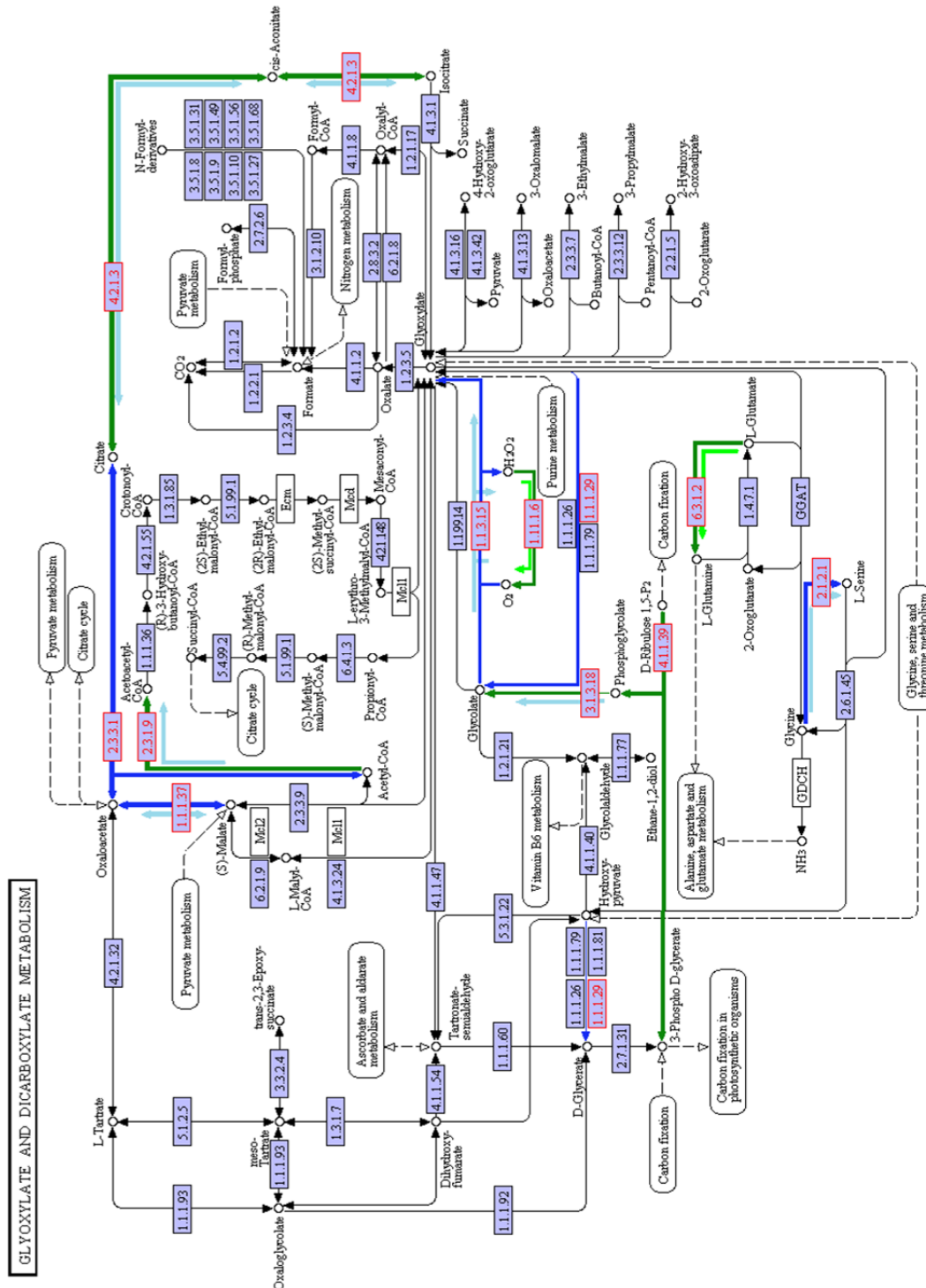
**Figura 24.** Representación gráfica de la ruta de glucólisis / gluconeogénesis según KEGG. Los códigos EC en rojo codifican genes expresados diferencialmente en la ZA durante la abscisión de fruto maduro en melón. Las flechas de color verde oscuro (■) y azul oscuro (■) representan un aumento y descenso de la expresión respectivamente en la etapa de inducción temprana de la abscisión. Las flechas de color verde claro (■) y azul claro (■) representan un aumento y descenso de la expresión respectivamente en la etapa de inducción tardía de la abscisión. [ec:1.1.1.1](#) Alcohol dehidrogenase class III; [ec:1.2.1.5](#) Aldehyde dehidrogenase; [ec:1.2.1.9](#) NADP-dependent glyceraldehído-3-phosphate dehidrogenase; [ec:1.2.4.1](#) Pyruvate dehidrogenase; [ec:1.8.1.4](#) Dihidrolipoyl dehidrogenase; [ec:2.7.1.11](#) Phosphofruktokinase; [ec:2.7.1.40](#) Pyruvate kinase; [ec:2.7.2.3](#) Phosphoglycerate kinase; [ec:4.1.1.1](#) Pyruvate decarboxylase; [ec:4.1.1.49](#) Phosphoenolpyruvate carboxykinase; [ec:4.1.2.13](#) Fructose-bisphosphate aldolase; [ec:4.2.1.11](#) Enolase 1; [ec:5.3.1.1](#) Triosephosphate isomerase.

La fosfoglicerato quinasa (ec:2.7.2.3) también muestra una expresión aumentada en la fase de inducción temprana de la abscisión. Esta enzima cataliza la conversión entre 1,3-bifosfoglicerato y el 3-fosfoglicerato, actuando en una reacción paralela que va a dar lugar a la misma molécula que en el caso de la enzima anterior. La mayoría de las enzimas de la vía glicolítica tienen la capacidad de actuar tanto en el sentido de degradación de glucosa como en el de su síntesis. Como la enzima fosfofructoquinasa, principal regulador de la vía, solo funciona en el sentido de degradación de glucosa y presenta una expresión disminuida durante la fase de inducción temprana, las demás enzimas de la vía podrían actuar en sentido contrario y estar, por tanto, la vía de gluconeogénesis inducida durante la fase de inducción temprana de la abscisión. Siguiendo la ruta de la glicólisis en el sentido de formación de piruvato la siguiente enzima que presenta una expresión diferencial es la enolasa 1(ec:4.2.1.11). Esta enzima cataliza la reacción de interconversión entre el 2-fosfoglicerato y el fosfoenolpiruvato y precede a la última reacción de la glicólisis. Esta última reacción es producida por la enzima piruvato quinasa (ec:2.7.1.40) que transforma el fosfoenolpiruvato en piruvato. La expresión de esta enzima aumenta durante la inducción temprana de la abscisión y disminuye durante la inducción tardía del proceso. La enzima piruvato deshidrogenasa (ec:1.2.4.1) presenta una expresión aumentada durante la fase de inducción temprana de la abscisión, esta enzima forma parte de un complejo multienzimático, y se encarga de la descarboxilación oxidativa del piruvato a hidroxietil-TPP y posteriormente a S-acetil-dihidrolipoamida. Esta molécula puede posteriormente transformarse a acetil-Coa y entrar en el ciclo del citrato por lo que el aumento de expresión de esta enzima podría aumentar indirectamente el flujo hacia dicho ciclo. La dihidrolipoil deshidrogenasa (ec:1.8.1.4) se encarga de regenerar la lipoamida, molécula necesaria para llevar a cabo la reacción de la piruvato deshidrogenasa, la expresión de esta enzima también aumenta durante la fase de inducción temprana de la abscisión. Por otra parte, la enzima piruvato descarboxilasa (ec:4.1.1.1) que transforma el piruvato a acetaldehído, disminuye su expresión durante la fase de inducción temprana, lo que podría indicar, junto con la inducción en esa misma etapa de la piruvato deshidrogenasa que se trata de un mecanismo que favorece que la mayor parte del piruvato siga la vía que lleva al ciclo del citrato. Por el contrario, la expresión de esta enzima aumenta durante la inducción tardía de la abscisión. La alcohol deshidrogenasa (ec:1.1.1.1) cataliza la conversión de acetaldehído a etanol, su expresión se encuentra disminuida durante la fase de inducción temprana de la abscisión, lo que es consistente con la disminución de expresión de la piruvato descarboxilasa al actuar en el mismo sentido. Por otro lado, la enzima aldehído deshidrogenasa, que se encarga de transformar el acetaldehído en acetato, aumenta su expresión en la fase de inducción temprana y

disminuye en la fase de inducción tardía. La fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (ec:4.1.1.49) es una de las pocas enzimas unidireccionales de este proceso, se trata de una enzima que participa en el proceso de gluconeogénesis y su expresión aumenta durante la primera etapa de inducción de la abscisión, lo que concuerda con la posible inducción de la ruta gluconeogénica. En resumen, la regulación de la enzima fosfofructoquinasa y de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, junto con la activación de enzimas intermedias de la vía, sugiere que la vía gluconeogénica podría encontrarse activada durante la fase de inducción temprana de la abscisión. Además, enzimas que efectúan la transformación desde piruvato hacia acetyl-CoA también se encuentran inducidas durante la misma etapa, lo que podría significar que se está produciendo un aumento de acetyl-CoA.

#### **4.2.3.3. Metabolismo del glioxilato y dicarboxilato**

La representación gráfica del metabolismo del glioxilato y dicarboxilato se encuentra en la figura 25. Algunas enzimas que catalizan reacciones relacionadas con el metabolismo de estas moléculas presentaron una expresión diferencial durante la inducción temprana y tardía de la abscisión del fruto maduro. Una de estas enzimas es la glutamina sintetasa (ec:6.3.1.2) que sintetiza L-glutamina a partir de L-glutamato. Esta enzima se encuentra inducida durante todo el proceso de abscisión. El aumento de expresión de esta enzima también ha sido también observada en la abscisión de fruto maduro de olivo (Gil-Amado y Gomez-Jimenez., 2012) y parece participar en la abscisión de flores en tomate (Meir y cols., 2010). Otra enzima que se encuentra inducida en ambas fases de la inducción de la abscisión es la catalasa (ec:1.11.1.6), encargada de degradar el peróxido de hidrógeno. Por el contrario, otras presentan una expresión disminuida tanto en la inducción temprana como tardía, como es el caso de la serina hidroximetiltransferasa (ec:2.1.2.1) que cataliza la transformación de glicina a L-serina. La expresión de la enzima (S)-2-hidroxi-ácido oxidasa (ec:1.1.3.15) también se encuentra disminuida durante ambas fases de la inducción de la abscisión. Esta enzima se encarga de producir glioxilato a partir de glicolato. Habitualmente, el glicolato se transforma en glicina en el contexto de la fotorrespiración, por lo que la inhibición de esta enzima podría suponer una disminución de la entrada de sustratos desde el glicolato hacia el ciclo del citrato. La inhibición de la enzima serina hidroximetiltransferasa podría actuar, por tanto, en el mismo sentido, ya que la transformación de glicina a serina es un paso anterior a la producción de piruvato. Esto contrasta con lo observado en el análisis de expresión de las enzimas con expresión diferencial en la ruta de la glicólisis y gluconeogénesis (Fig. 24), en la que parecía estar inducida la producción de sustratos al ciclo del citrato (Fig. 27).



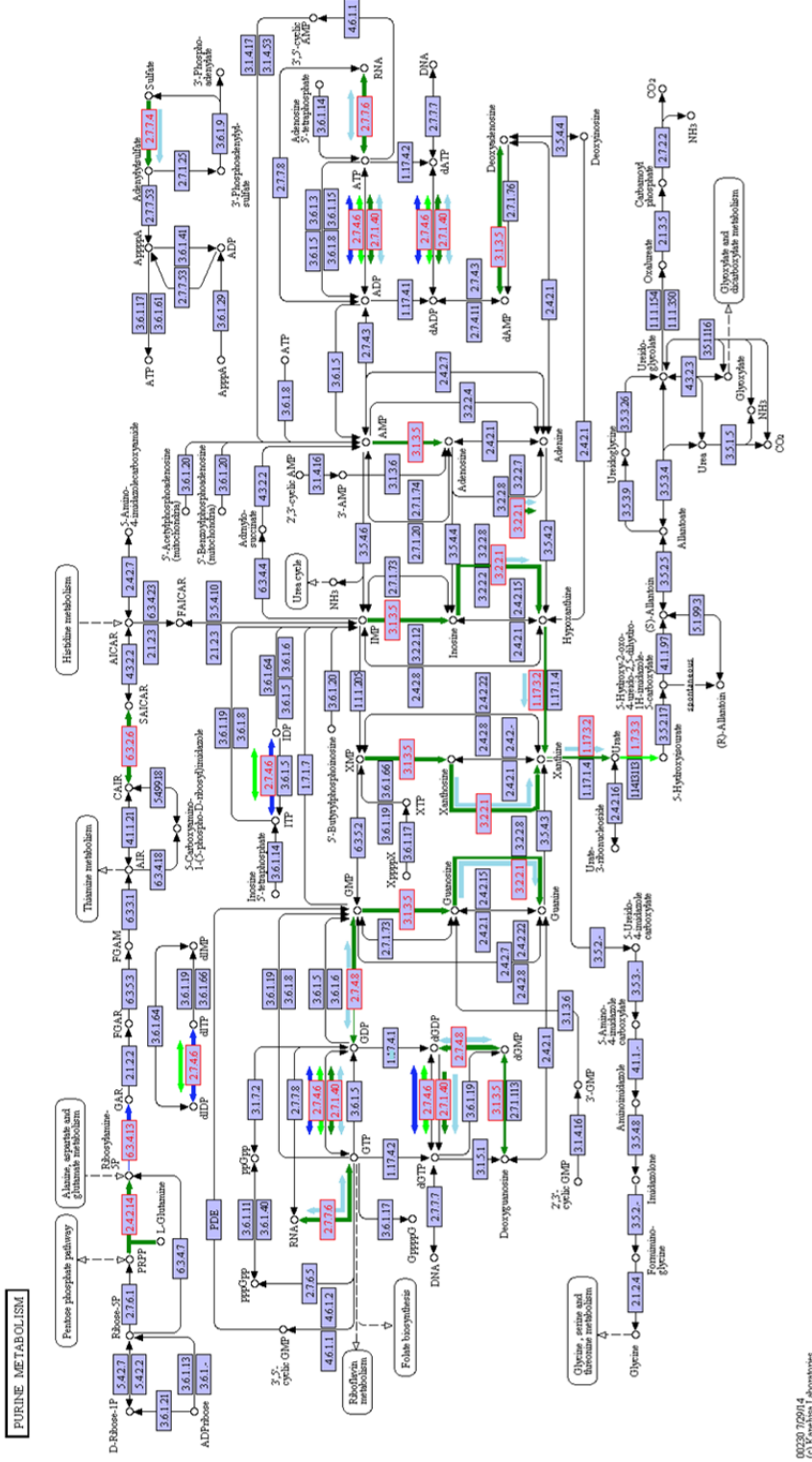
00630 6/31/4  
© Kanehisa Laboratories

**Figura 25.** Representación gráfica de la ruta del metabolismo del glioxilato y el carboxilato como se representa por KEGG. Los números EC de las enzimas, coloreados en rojo codifican genes expresados diferencialmente en las ZAs durante la abscisión de fruto maduro en melón. Los números EC de las enzimas coloreados en azul codifican genes no expresados diferencialmente en las ZAs durante la abscisión en melón. Las flechas de color verde oscuro (■) y azul oscuro (■) representan un aumento y descenso de la expresión respectivamente en la etapa de inducción temprana de la abscisión. Las flechas de color verde claro (■) y azul claro (■) representan un aumento y descenso de la expresión respectivamente en la etapa de inducción tardía de la abscisión. [ec:1.1.1.29](#) Hydroxypyruvate reductase; [ec:1.1.1.37](#) Malate dehydrogenase; [ec:1.1.3.15](#) Probable peroxisomal (S)-2-hydroxyacid oxidase 1; [ec:1.11.1.6](#) Catalase; [ec:2.1.2.1](#) Serine hydroxymethyltransferase; [ec:2.3.1.9](#) Acetyl-CoA acetyltransferase; [ec:2.3.3.1](#) Citrate synthase; [ec:3.1.3.18](#) 2-deoxyglucose-6-phosphate phosphatase; [ec:4.1.1.39](#) Ribulose biphosphate carboxylase small chain; [ec:4.2.1.3](#) Aconitate hydratase; [ec:6.3.1.2](#) Glutamine synthetase.

Por otro lado, la enzima malato deshidrogenasa (ec:1.1.1.37), enzima perteneciente a dicho ciclo, presenta una expresión disminuida durante la inducción tanto temprana como tardía de la abscisión. Esta enzima se encarga de oxidar malato para producir oxalacetato. La citrato sintasa (ec:2.3.3.1), enzima que condensa el oxalacetato con el grupo acetilo del acetyl-CoA para dar lugar al citrato también presenta una disminución de la expresión durante la fase de inducción temprana de la abscisión. La aconitato hidratasa (ec:4.1.2.3), otra enzima perteneciente al ciclo del citrato, cataliza la isomerización de citrato a isocitrato. Esta enzima aumenta su expresión durante la inducción temprana para descender posteriormente en la inducción tardía. Este mismo comportamiento es seguido por la acetil CoA acetiltransferasa (ec:2.3.1.9) que cataliza la síntesis de acetacetyl-CoA a partir de CoA. Esto parece concordar con lo observado en la ruta de glicólisis y gluconeogénesis, en la que parecía estar activada la vía de síntesis de acetyl-CoA. Por otro lado, la transformación desde D-ribulosa 1,5-difosfato hasta glicolato se encuentra activa durante la inducción temprana de la abscisión, a través de dos enzimas, la ribulosa bifosfato carboxilasa, que produce la primera transformación a fosfoglicolato y la 2-desoxi glucosa-6-fosfato fosfatasa, que produce la transformación a glicolato y cuya expresión aumenta en la inducción temprana de la abscisión y descende posteriormente en la tardía. En el caso del metabolismo del glioxilato y dicarboxilato, la expresión diferencial de las enzimas no muestran la activación o inhibición clara de ninguna vía, aunque algunas de ellas establecen conexiones tanto con el ciclo del citrato como con la ruta de glicólisis y gluconeogénesis (figura 24)

#### **4.2.3.4. Metabolismo de purinas**

La figura 26 representa gráficamente el metabolismo de purina. El metabolismo de las moléculas relacionadas con la purina se encuadra dentro del metabolismo de nucleótidos, y está estrechamente relacionado con la síntesis y degradación de ácidos nucleicos. Al realizar el análisis de expresión de las proteínas con expresión diferencial relacionadas con este metabolismo se observó la activación de algunas enzimas que actúan en el mismo sentido. Puede observarse una activación durante la fase de inducción temprana de las enzimas que catalizan las reacciones desde algunos nucleótidos cíclicos a sus bases libres. Estas enzimas son la fosfatasa ácida (ec:3.1.3.5) que se encarga de realizar la catálisis de GMP, XMP, IMP y AMP en guanosina, xantosina, inosina y adenosina respectivamente.



**Figura 26.** Representación gráfica de la ruta del metabolismo de purina según KEGG. Los números EC en rojo codifican genes expresados diferencialmente en la ZA durante la abscisión en melón. Los números EC en azul codifican genes no expresados diferencialmente en la ZA durante la abscisión en melón. Las flechas de color verde oscuro (■) y azul oscuro (■) representan un aumento y descenso de la expresión respectivamente en la etapa de inducción temprana de la abscisión. Las flechas de color verde claro (■) y azul claro (■) representan un aumento y descenso de la expresión respectivamente en la etapa de inducción tardía de la abscisión. [ec:1.17.3.2](#) Xanthine dehydrogenase; [ec:1.7.3.3](#) Uricase; [ec:2.4.2.14](#) Amidophosphoribosyltransferase (ATase); [ec:2.7.1.40](#) Pyruvate kinase; [ec:2.7.4.6](#) Nucleoside diphosphate kinase 1; [ec:2.7.4.8](#) Guanylate kinase; [ec:2.7.7.4](#) Elongation factor 1-alpha; [ec:2.7.7.6](#) DNA-directed RNA polymerase subunit alpha (PEP); [ec:3.1.3.5](#) Acid phosphatase; [ec:3.2.2.1](#) Inosine-uridine preferring nucleoside hydrolase; [ec:6.3.2.6](#) Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase; [ec:6.3.4.13](#) Phosphoribosylamine-glycine ligase.

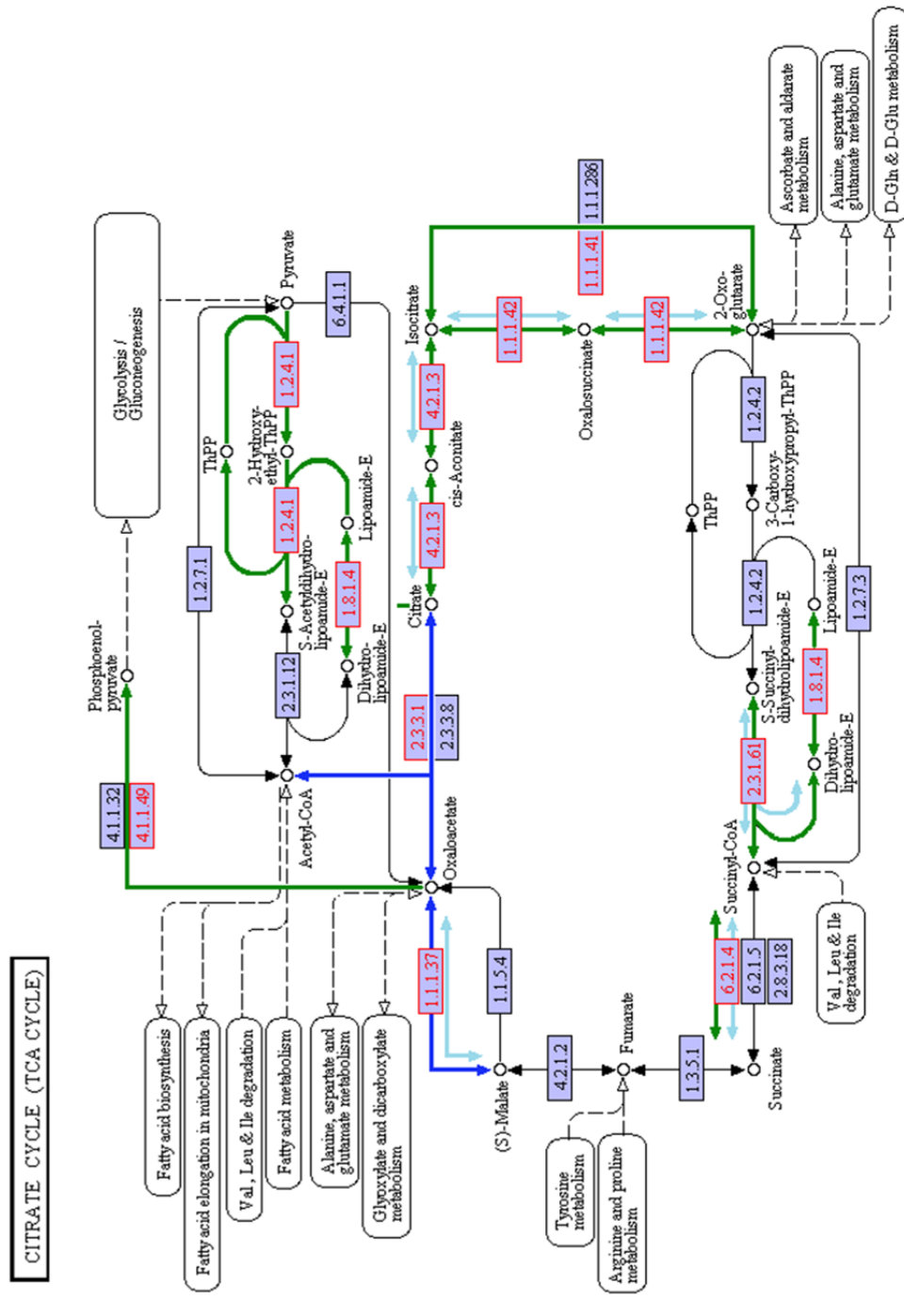


Posteriormente, la enzima purina nucleosidasa (ec:3.2.2.1) se encarga de catalizar la reacción hasta guanina, xantina, hipoxantina y adenina respectivamente. Esta última, además, muestra una disminución de su expresión en la fase de inducción tardía de la abscisión. El aumento de expresión de dichas enzimas sugiere que la síntesis de bases libres podría ser necesaria en la inducción temprana de la abscisión. Además, la reacción posterior de transformación de hipoxantina en xantina está catalizada por la enzima xantina deshidrogenasa (ec:1.17.3.2) cuya expresión aumenta en la fase de inducción temprana y desciende en la fase de inducción tardía, en consonancia con las demás enzimas presentes en la vía de producción de estas bases libres. Esta enzima también está encargada de transformar xantina en urato. A continuación, la enzima uricasa, cuya expresión aumenta durante la inducción tardía de la abscisión, se encarga de transformar el urato en 5'-hidroxiurato. En relación con la vía de síntesis de guanina, también parece estar activa la producción de GMP durante la fase de inducción temprana, ya que algunas enzimas que conducen a su biosíntesis también se encuentran inducidas durante dicha etapa. La enzima que cataliza la transformación entre GDP y GMP es la guanilato quinasa (ec:2.7.4.8) cuya expresión desciende en la fase de inducción tardía. En la reacción de transformación entre GTP y GDP actúan enzimas con una expresión diferencial opuesta. Por un lado, la enzima piruvato quinasa (ec:2.7.1.40), que aumenta durante la etapa de inducción temprana de la abscisión y disminuye en la etapa de inducción tardía, y por el otro lado, la enzima nucleosido difosfato quinasa (ec:2.7.4.6) cuya expresión disminuye en la primera etapa para posteriormente aumentar en la fase de inducción tardía de la abscisión. Ambas enzimas pueden catalizar la reacción en ambos sentidos, por lo que la expresión que muestran ambas indica que la piruvato quinasa funciona principalmente en la fase de inducción temprana mientras que la nucleosido difosfato quinasa funciona principalmente en la fase de inducción tardía. En una reacción relacionada con esta última funciona la enzima ARN polimerasa dependiente de ADN (ec:2.7.7.6), que se encarga de polimerizar el ARN utilizando entre otras, moléculas de GTP. Esta enzima aumenta su expresión durante la inducción temprana y disminuye en la fase de inducción tardía de la abscisión. La enzima amidofosforribosiltransferasa (ec:2.4.2.14) también aumenta su expresión en la fase temprana de inducción de la abscisión y transforma la L-glutamina en ribosilamina-5-fosfato. Por el contrario, la enzima que posteriormente transforma la ribosilamina-5-fosfato en glicinamida ribonucleótido (GAR), la fosforribosilamina-glicina ligasa (ec:6.3.4.13), presenta una expresión disminuida en la misma etapa de la abscisión. Existen otras enzimas con expresión diferencial en otros puntos de la ruta del metabolismo de purina. Una de ellas es la enzima fosforribosilaminoimidazol-succinocarboxamida sintasa (ec:6.3.2.6), que cataliza la interconversión entre CAIR (4-

carboxi-5-aminoimidazol ribonucleótido) y SAICAR (succinilaminoimidazol-carboxamida ribósido), cuya expresión se encuentra aumentada en la fase de inducción temprana. Por otro lado también se encuentra el factor de elongación 1- $\alpha$  (ec:2.7.7.4), que toma como sustrato al sulfato y lo transforma en adenililsulfato. Esta enzima también aumenta en la fase de inducción temprana y desciende posteriormente en la fase de inducción tardía.

#### **4.2.3.5. Ciclo del citrato**

La representación gráfica del ciclo del citrato se encuentra en la figura 27. El ciclo del citrato es la vía final común para la oxidación tanto de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos con el objetivo de generar ATP. Esta vía metabólica es, por tanto, de gran importancia para el balance energético de la célula. Algunas de las enzimas con expresión diferencial representadas dentro de esta vía también forman parte de rutas anteriormente descritas. Este es el caso de la piruvato deshidrogenasa (ec: 1.2.4.1), cuya expresión se encuentra inducida en la etapa de inducción temprana de la abscisión, como fue descrita en el análisis de la ruta de glicólisis y gluconeogénesis (figura 24). Esta enzima cataliza una primera transformación del piruvato en su ruta hacia la transformación hasta acetyl-CoA. Primero cataliza la transformación del piruvato a hidroxietil-TPP y posteriormente a S-acetilhidrolipoamida. Además la enzima dihidrolipoil deshidrogenasa encargada de regenerar la molécula de lipoamida necesaria para la reacción anterior, también se encuentra inducida en la fase temprana de la abscisión. La inducción de estas dos enzimas podría suponer un aumento en la producción de acetyl-CoA, aunque no parece producirse un aumento de la entrada de acetyl-CoA en el ciclo, ya que la enzima citrato sintasa (ec:2.3.3.1) disminuye su expresión en la inducción temprana de la abscisión, al igual que la enzima malato deshidrogenasa (ec:1.1.1.37) la cual se encarga de producir oxalacetato, necesario para la reacción de síntesis de citrato al condensarse con el acetyl-CoA. Esta enzima además también presenta una expresión disminuida en la inducción tardía de la abscisión. A su vez, la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (ec:4.1.1.49) presenta una expresión aumentada, con lo que la conversión aumentada de oxalacetato a fosfoenolpiruvato podría ser una señal de una posible activación de la ruta gluconeogénica como se mencionó anteriormente (figura 4.2.9). Por otro lado, existe una serie de enzimas pertenecientes al ciclo del citrato que muestran una regulación muy similar, estando mayoritariamente inducidas durante la fase de inducción temprana de la abscisión, y estando, posteriormente, reprimidas en la inducción tardía del proceso.



00020 7/10/14  
© Kanehisa Laboratories

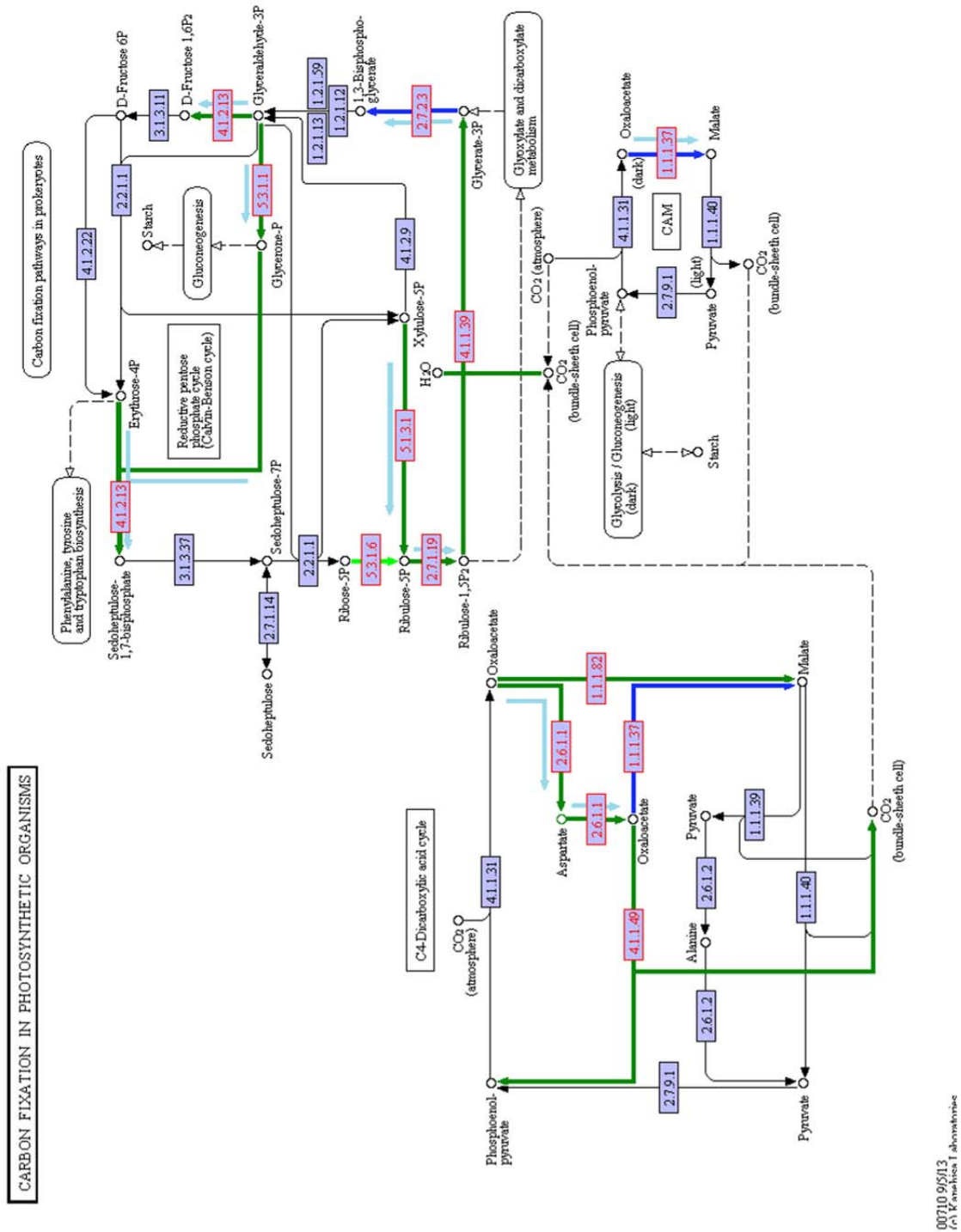
**Figura 27.** Representación gráfica del ciclo del citrato como se representa por KEGG. Los números EC de las enzimas, coloreados en rojo codifican genes expresados diferencialmente en las ZAs durante la abscisión de fruto maduro en melón. Los números EC de las enzimas coloreados en azul codifican genes no expresados diferencialmente en las ZAs durante la abscisión en melón. Las flechas de color verde oscuro (■) y azul oscuro (■) representan un aumento y descenso de la expresión respectivamente en la etapa de inducción temprana de la abscisión. Las flechas de color verde claro (■) y azul claro (■) representan un aumento y descenso de la expresión respectivamente en la etapa de inducción tardía de la abscisión. [ec:1.1.1.37](#) Malate dehidrogenase; [ec:1.1.1.41](#) Isocitrate dehidrogenase; [ec:1.1.1.42](#) Isocitrate dehidrogenase; [ec:1.2.4.1](#) Pyruvate dehidrogenase; [ec:1.8.1.4](#) Dihydrolipoil dehidrogenase; [ec:2.3.1.61](#) Dihydrolipoamide succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehidrogenase; [ec:2.3.3.1](#) Citrate synthase; [ec:4.1.1.49](#) Phosphoenolpyruvate carboxykinase; [ec:4.2.1.3](#) Aconitate hidratase; [ec:6.2.1.4](#) Succinyl-CoA synthetase beta chain.

Estas enzimas son la aconitato hidratasa (ec:4.2.1.3) que cataliza la transformación de citrato a cis-aconitato y posteriormente a isocitrato, dos isocitrato deshidrogenasas (ec:1.1.1.41 y ec:1.1.1.42) que transforman el isocitrato en 2-oxoglutarato, y por otro lado, la enzima dihidrolipoamida succiniltransferasa (ec:2.3.1.61) que participa en la formación de succinil-CoA y la enzima succinil-CoA sintetasa (ec:6.2.1.4) que cataliza la transformación de dicho succinil-CoA a succinato. Por un lado, podría parecer que el ciclo se activa durante la inducción temprana de la abscisión, al existir enzimas pertenecientes a dicho ciclo con una expresión aumentada durante esta fase. La disminución de la expresión de enzimas como la citrato sintasa y la malato deshidrogenasa provocan que disminuya la entrada de acetil-CoA, y sugieren, en cambio, que la activación de algunas enzimas del ciclo podría deberse a la necesidad de interconversión entre moléculas destinadas a otros procesos. Existen evidencias de diferentes flujos no cíclicos dentro del propio ciclo del citrato, destinados a la creación de materia orgánica. Concretamente, algunos de estos flujos utilizarían el citrato almacenado como punto de partida (Sweetlove y cols., 2010), lo que podría concordar en este caso con la activación de enzimas a partir de ese punto.

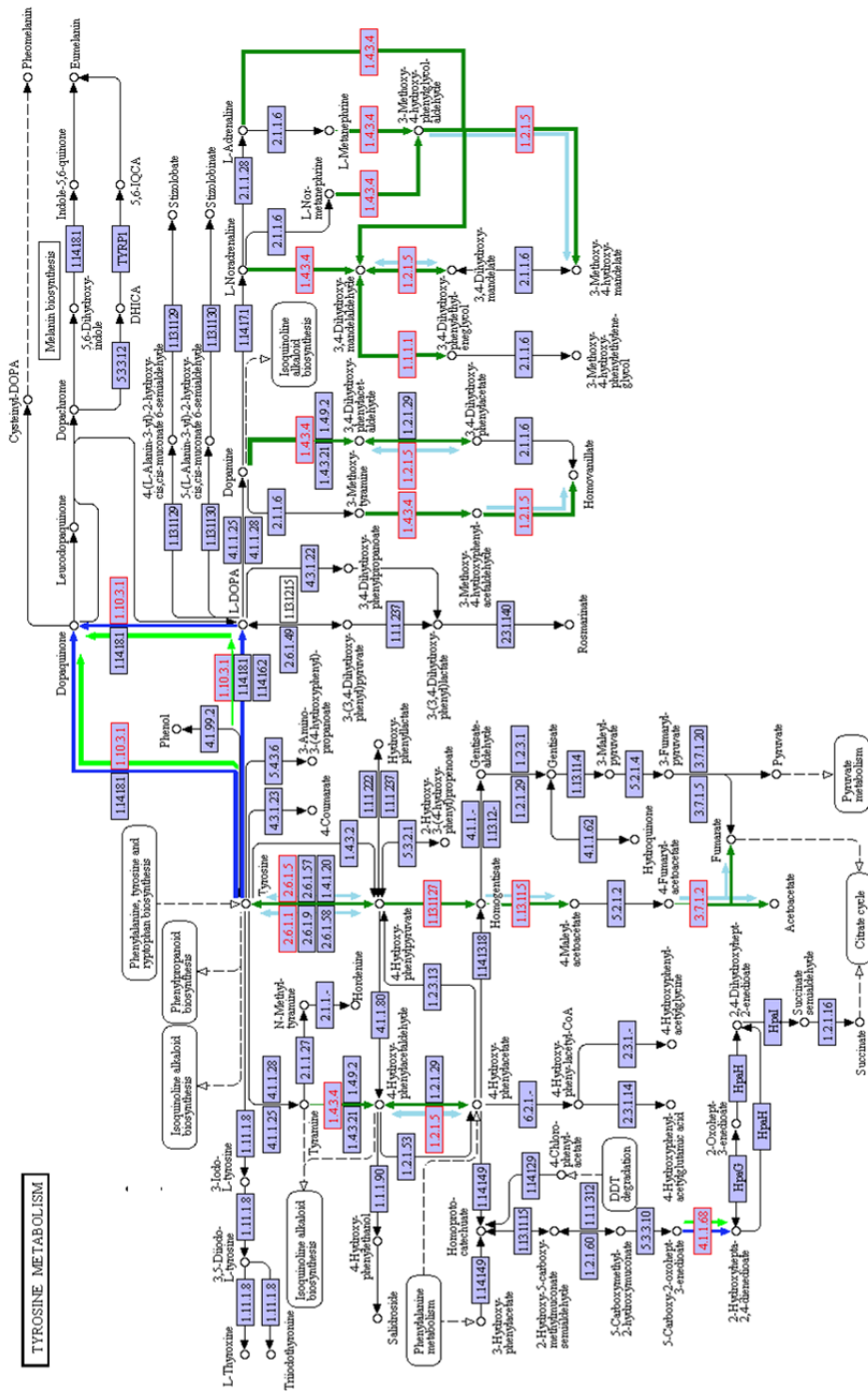
#### **4.2.3.6 Otras rutas metabólicas**

Además de las rutas metabólicas analizadas previamente, también se encontraron otras rutas metabólicas que contenían genes diferencialmente expresados en las distintas etapas de la abscisión de fruto maduro de melón. Este es el caso del metabolismo de fenilalanina (Fig. 28), del metabolismo relativo a la fijación de carbono en organismos fotosintéticos (Fig. 29), del metabolismo de tirosina (Fig. 30) y del metabolismo de cisteína y meteonina (Fig. 31). Las figuras representando estas rutas metabólicas se encuentran a continuación





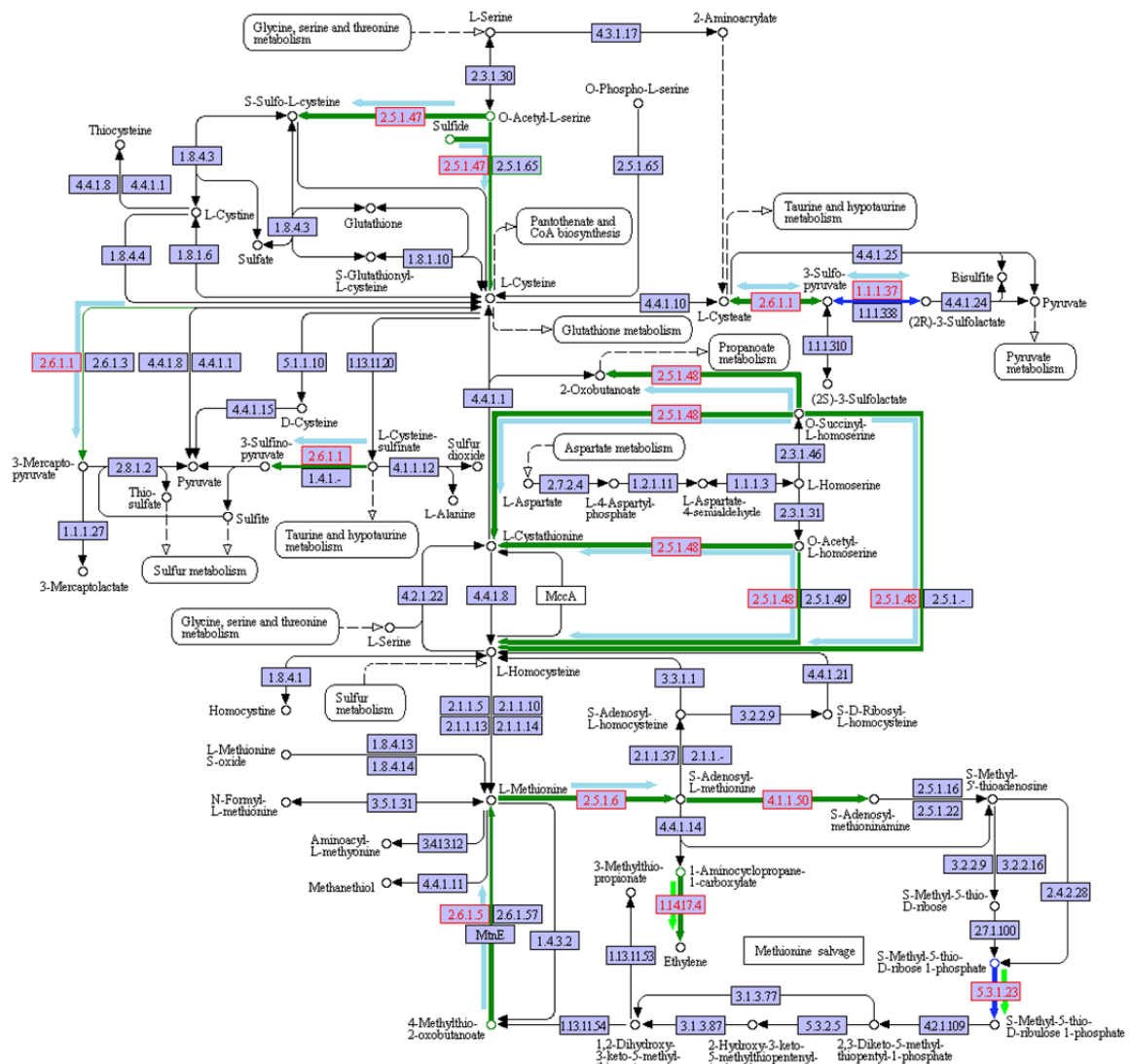
**Figura 29.** Representación gráfica de la ruta del metabolismo de fijación de carbono según KEGG. Los números EC coloreados en rojo codifican genes expresados diferencialmente en la ZA durante la abscisión en melón. Los números EC coloreados en azul codifican genes no expresados diferencialmente en la ZA durante la abscisión. Las flechas de color verde oscuro (■) y azul oscuro (■) representan un aumento y descenso de la expresión respectivamente en la etapa de inducción temprana de la abscisión. Las flechas de color verde claro (■) y azul claro (■) representan un aumento y descenso de la expresión respectivamente en la etapa de inducción tardía de la abscisión. [ec:1.1.1.37](#) Malate dehidrogenase; [ec:2.6.1.1](#) Transaminase mtnE; [ec:2.7.1.19](#) Phosphoribulokinase; [ec:2.7.2.3](#) Phosphoglycerate kinase; [ec:4.1.1.39](#) Ribulose biphosphate carboxylase small chain; [ec:4.1.1.49](#) Phosphoenolpyruvate carboxykinase; [ec:4.1.2.13](#) Fructose-bisphosphate aldolase; [ec:5.1.3.1](#) Ribulose-phosphate 3-epimerase; [ec:5.3.1.1](#) Triosephosphate isomerase; [ec:5.3.1.6](#) Ribose-5-phosphate isomerase.



00330 702014

**Figura 30.** Representación gráfica de la ruta del metabolismo de tirosina según KEGG. Los números EC coloreados en rojo codifican genes expresados diferencialmente en la ZA durante la abscisión en melón. Los números EC coloreados en azul codifican genes no expresados diferencialmente en la ZA durante la abscisión. Las flechas de color verde oscuro (■) y azul oscuro (■) representan un aumento y descenso de la expresión respectivamente en la etapa de inducción temprana de la abscisión. Las flechas de color verde claro (■) y azul claro (■) representan un aumento y descenso de la expresión respectivamente en la etapa de inducción tardía de la abscisión. [ec:1.1.1.1](#) Alcohol dehydrogenase; [ec:1.10.3.1](#) Polyphenol oxidase; [ec:1.13.11.27](#) 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase; [ec:1.13.11.5](#) Homogentisate 1,2-dioxygenase; [ec:1.2.1.5](#) Aldehyde dehydrogenase; [ec:1.4.3.4](#) Amine oxidase; [ec:2.6.1.1](#) Transaminase mtnE; [ec:2.6.1.5](#) Tyrosine aminotransferase; [ec:3.7.1.2](#) Fumarylacetoacetate hydrolase; [ec:4.1.1.68](#) Fumarylacetoacetate hydrolase.

CYSTEINE AND METHIONINE METABOLISM



00270 2/4/14

**Figura 31.** Representación gráfica de la ruta del metabolismo de cisteína y metionina según KEGG. Los números EC coloreados en rojo codifican genes expresados diferencialmente en la ZA durante la abscisión en melón. Los números EC coloreados en azul codifican genes no expresados diferencialmente en la ZA durante la abscisión. Las flechas de color verde oscuro (■) y azul oscuro (■) representan un aumento y descenso de la expresión respectivamente en la etapa de inducción temprana de la abscisión. Las flechas de color verde claro (■) y azul claro (■) representan un aumento y descenso de la expresión respectivamente en la etapa de inducción tardía de la abscisión. [ec:1.1.1.1](#) Alcohol dehidrogenase; [ec:1.10.3.1](#) Polyphenol oxidase; [ec:1.13.11.27](#) 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase; [ec:1.13.11.5](#) Homogentisate 1,2-dioxygenase; [ec:1.2.1.5](#) Aldehyde dehidrogenase; [ec:1.4.3.4](#) Amine oxidase; [ec:2.6.1.1](#) Transaminase mtnE; [ec:2.6.1.5](#) Tyrosine aminotransferase; [ec:3.7.1.2](#) Fumarylacetoacetate hidrolase; [ec:4.1.1.68](#) Fumarylacetoacetate hidrolase.



## CAPÍTULO 3:

### EXPRESIÓN GÉNICA RELACIONADA CON ABSCISIÓN

#### 4.3.1. Caracterización de genes relacionados con pared celular asociados a inducción temprana y tardía de la abscisión de fruto maduro

Mediante la utilización de microarrays y técnicas de selección diferencial, investigaciones anteriores han identificado genes relacionados con la modificación de pared celular específicos de la ZA o presentes en gran cantidad en ella (Botton y cols., 2011; Meir y cols., 2011; Gonzalez-Carranza y Roberts, 2012). Los análisis de nuestro conjunto de datos confirmaron la acumulación inducida en abscisión de transcritos supuestamente involucrados en la modificación de la composición y propiedades de la pared celular, incluyendo 79 genes expresados diferencialmente que codifican proteínas con posibles funciones en la remodelación de la pared celular durante la abscisión de melón. A continuación se muestran los genes relacionados con pared celular que presentaron expresión diferencial en la fase de inducción temprana de la abscisión (tabla 11) y en la fase de inducción tardía de abscisión (tabla 12).

De los genes expresados diferencialmente relacionados con la pared celular, 52 (3 poligalacturonasas (PGs), dos pectinesterasas (PEs), una  $\beta$ -fructofuranosidasa, dos  $\alpha$ -expansinas ( $\alpha$ -EXPs), 3  $\beta$ -expansinas ( $\beta$ -EXPs), una quitinasa, una  $\beta$ -1,3-glucanasa, cinco endo- $\beta$ -1,4-glucanasas (EGases o Cels), una glucano endo-1,3- $\beta$ -glucosidasa, una xiloglucano endotransglucosilasa/hidrolasa (XTH), dos pectato liasas (PLs), nueve  $\beta$ -galactosidasas, y otras proteínas) se indujeron exclusivamente durante la inducción temprana de la abscisión, y seis (dos PEs, una extensina (EXT), una quitinasa y dos  $\beta$ -EXPs) aumentaron exclusivamente durante la inducción tardía de la abscisión, mientras que solo dos genes de EXT aumentaron tanto en la inducción temprana como en la tardía. Por tanto, esta aproximación proporcionó resultados que corroboraron y ampliaron experimentos previos, identificando rutas de síntesis y disolución de pared celular como los inducidos durante la abscisión de otros órganos de la planta tales como frutos inmaduros, flores y hojas (Botton y cols., 2011; Meir y cols., 2010; Agustí y cols., 2009).

## Resultados y discusión

**Tabla 11.** Genes relacionados con la pared celular inducidos o reprimidos en la ZA del fruto a 38 DPA en relación a 36 DPA durante la inducción temprana de la abscisión de fruto maduro de melón. La tabla muestra el conteo total de lecturas para cada gen tras la normalización (RPKMx1000) en las 3 muestras: (a) separación pre-celular de la AZ (36 DPA), (b) separación celular parcial de la AZ (38 DPA, inducción temprana de abscisión), (c) separación celular casi completa (40 DPA, inducción de abscisión tardía).

UniProt ID	36 DPA	38 DPA	40 DPA	Descripción
<b>Tránscrios inducidos</b>				
B9RVQ4	0	48.57	0	Polygalacturonase = <i>Ricinus communis</i>
B9SSX1	0	280.74	0	Polygalacturonase = <i>Ricinus communis</i>
O81245	0	3309.69	0	Polygalacturonase, MPG2 = <i>Cucumis melo</i>
B9RD90	0	60.31	60.95	Pectinesterase = <i>Ricinus communis</i>
B9H3W4	0	79.11	0	Pectinesterase = <i>Populus trichocarpa</i>
Q43111	0	14.91	0	Pectinesterase 3 (PE 3) (Pectin methylesterase 3) MPE3 = <i>Phaseolus vulvaris</i>
B9GXZ7	0	11.33	0	Pectinesterase = <i>Populus trichocarpa</i>
B9R9Q8	0	875.40	0	21 kDa protein. putative = <i>Ricinus communis</i>
B9S5X9	0	20.75	0	Beta-fructofuranosidase. cell wall isozyme = <i>Ricinus communis</i>
Q38913	25.02	115.28	403.93	Extensin-1 (AtExt1) (AtExt4) EXT1 EXT4 At1g76930
Q9FS16	0	23.41	23.41	Extensin-3 (AtExt3) (AtExt5) EXT3 EXT5 At1g21310
Q8W5B0	0	25.13	0	Alpha-expansin 3 = <i>Cucumis sativus</i>
Q8W5A6	0	189.94	42.83	Alpha-expansin 7 = <i>Cucumis sativus</i>
Q2V728	0	201.83	30.58	Expansin 5 = <i>Cucumis sativus</i>
B9RW20	0	38.61	0	Beta-expansin 3 = <i>Ricinus communis</i>
A1X8W4	0	599.03	0	Beta expansin 1, EXPB1 = <i>Solanum tuberosum</i>
Q7M1K0	0	275.74	0	Chitinase = <i>Lagenaria siceraria</i>
P54904	0	27.77	8	Pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR) (Protein EMBRYO DEFECTIVE 2772). At5g14800
Q9LVJ1	0	7.72	0	Cucumisin-like serine protease; subtilisin-like protease. At3g14067
B2ZP02	30.91	2218.35	114.97	Beta-1.3-glucanase = <i>Vitis vinifera</i>
Q9ZSP9	0	21.33	0	Endo-beta-1.4-D-glucanase (Cel8) = <i>Solanum lycopersicum</i>
Q25B23	0	29.56	0	Endo-beta-1.4-glucanase, eg4 = <i>Prunus persica</i>
B9T947	0	35.46	0	Endo-1.4-beta-glucanase = <i>Ricinus communis</i>
P22503	0	806.45	0	Endoglucanase (Abscission cellulase) (Endo-1.4-beta-glucanase) = <i>Phaseolus vulvaris</i>
Q0KIX2	10.18	10.71	11.25	Endoglucanase, CmeGase1 = <i>Cucumis melo</i>
Q6V596	0	458.75	0	Endo-1.4-beta-glucanase = <i>Malus domestica</i>
P52408	0	1133.33	0	Glucan endo-1.3-beta-glucosidase. basic isoform (PpGns1) = <i>Prunus persica</i>
C0IRH2	0	46.60	0	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 13 = <i>Actinidia deliciosa</i>
Q2HV87	0	31.70	0	Alpha-1.4-glucan-protein synthase (UDP-forming) = <i>Medicago truncatula</i>
Q7XAS3	0	13.26	0	Beta-D-glucosidase = <i>Gossypium hirsutum</i>
B9T066	0	11.82	0	Alpha-glucosidase = <i>Ricinus communis</i>
B9STU2	0	28.89	7.22	Neutral alpha-glucosidase ab = <i>Ricinus communis</i>
B9MWS0	0	6.35	0	Beta-galactosidase = <i>Populus trichocarpa</i>
B9RK64	0	7.14	0	Beta-galactosidase = <i>Ricinus communis</i>

Resultados y discusión

C6F122	0	10.63	0	Beta-galactosidase = <i>Glycine max</i>
Q9LLT0	0	13.69	0	Beta-galactosidase TBG5= <i>Solanum lycopersicum</i>
B9SWC7	0	14.64	0	Beta-galactosidase = <i>Ricinus communis</i>
B9HFB3	0	15.34	0	Beta-galactosidase = <i>Populus trichocarpa</i>
Q5CCP8	0	16.00	0	Beta-galactosidase = <i>Pyrus pyrifolia</i>
D7TB77	0	24.40	2.00	Beta-galactosidase = <i>Vitis vinifera</i>
B9HDL7	0	26.65	0	Beta-galactosidase = <i>Populus trichocarpa</i>
Q9FE06	0	374.86	0	Protein EXORDIUM like 2, Phi-1-like protein, AT5g64260/MSJ1_10
P41376	0	43.68	28.31	Eukaryotic initiation factor 4A-1 (eIF-4A-1), TIF4A-1 RH4 At3g13920 MDC16.4
B9STK4	10.52	200.00	0	Transferase = <i>Ricinus communis</i>
Q9FLC0	0	34.97	58.64	Peroxidase 52 (Atperox P52) (EC 1.11.1.7) (ATP49), PER52 P52 At5g05340 K18I23.14
D7T7P7	0	6.28	0	Whole genome shotgun sequence of line PN40024. scaffold 39.assemblv12x = <i>Vitis vinifera</i>
O22197	0	17.27	4.06	RING-H2 finger protein RHC1a, At2g40830
D7TEC1	0	12.80	0	Whole genome shotgun sequence of line PN40024. scaffold 59.assemblv12x (Fragment) = <i>Vitis vinifera</i>
D7T9Z2	0	128.87	40.89	Whole genome shotgun sequence of line PN40024. scaffold 11.assemblv12x (Fragment) = <i>Vitis vinifera</i>
B9HIG2	58.17	73.86	0	Predicted protein = <i>Populus trichocarpa</i>
B9HXH9	0	42.83	13.96	Predicted protein = <i>Populus trichocarpa</i>
Q8VYW6	0	74.59	0	AT4g39640/T19P19_30
Q41360	42.85	823.80	1223.80	Pathogenesis-related protein PR-4 type = <i>Sambucus nigra</i>
D7T7B8	0	182.07	0	Whole genome shotgun sequence of line PN40024. scaffold 20.assemblv12x (Fragment) = <i>Vitis vinifera</i>
B9S561	0	827.66	0	Pectate lyase = <i>Ricinus communis</i>
Q6U7H9	0	92.50	0	Pectate lyase = <i>Malus domestica</i>
<b>Tránscritos reprimidos</b>				
A2Q3Z3	12.91	0	0	Pectinesterase = <i>Medicago truncatula</i>
Q06802	8.38	0	0	Extensin = <i>Nicotiana tabacum</i>
Q9SL03	9.56	2.39	1.02	Callose synthase 2 (EC 2.4.1.34) (1.3-beta-glucan synthase). CALS2 GSL3 At2g31960
Q06BI5	26.71	0	0	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 2, XTH2 = <i>Cucumis melo</i>
O24548	55.87	0	0	Type IIIa membrane protein cp-wap13 = <i>Vigna unguiculata</i>
D7THX8	1.60	0	0	Whole genome shotgun sequence of line PN40024. scaffold 7.assemblv12x (Fragment) = <i>Vitis vinifera</i>
Q9ZSP8	24.78	0	0	Latex-abundant protein, LAR = <i>Hevea brasiliensis</i>

## Resultados y discusión

**Tabla 12.** Genes relacionados con la pared celular inducidos o reprimidos en la ZA del fruto a 40 DPA en relación a 38 DPA durante la inducción temprana de la abscisión de melón. La tabla muestra el conteo total de lecturas para cada gen tras la normalización (RPKMx1000) en las 3 muestras: (a) separación pre-celular de la AZ (36 DPA), (b) separación celular parcial de la AZ (38 DPA, inducción temprana de abscisión), (c) separación celular casi completa (40 DPA, inducción de abscisión tardía)

UniProt ID	36 DPA	38 DPA	40 DPA	Descripción
<b>Tránscritos inducidos</b>				
D7U7V9	0	0	45.04	Pectinesterase = <i>Vitis vinifera</i>
B9RD90	0	60.31	60.95	Pectinesterase = <i>Ricinus communis</i>
Q38913	25.02	115.28	403.93	Extensin-1 (AtExt1) (AtExt4). EXT1 EXT4 At1g76930 F22K20.3
Q09082	0	4.29	23.19	Extensin (Class I), teg1 = <i>Solanum lycopersicum</i>
B9RPJ5	0	0	7.26	Chitinase = <i>Ricinus communis</i>
B9VQ34	15.93	31.86	84.55	Class IV chitinase = <i>Pyrus pyrifolia</i>
Q41360	42.85	823.80	1223.80	Pathogenesis-related protein PR-4 type (Fragment) = <i>Sambucus</i>
B9T775	0	0	12.87	Beta-expansin 1a putative, Expansin-like CBD domain (1), Expansin-like EG45 domain (1) = <i>Ricinus communis</i>
D7U4W1	0	0	63.06	Expansin-like CBD domain (1), Expansin-like EG45 domain (1) = <i>Vitis vinifera</i>
Q0KIX2	10.18	10.71	11.25	Endoglucanase, CmEGase1 = <i>Cucumis melo</i>
Q9AVA8	683.81	0	13496.24	Endochitinase, MCHT-2 = <i>Cucumis melo</i>
Q9FLC0	0	34.97	58.64	Peroxidase 52 (Atperox P52) (EC 1.11.1.7) (ATP49). PER52 P52 At5g05340 K18I23.14
<b>Tránscritos reprimidos</b>				
O81245	0	3309.69	0	Polygalacturonase, MPG2 = <i>Cucumis melo</i>
B9RVQ4	0	48.57	0	Polygalacturonase = <i>Ricinus communis</i>
B9SSX1	0	280.74	0	Polygalacturonase = <i>Ricinus communis</i>
B9H3W4	0	79.11	0	Pectinesterase = <i>Populus trichocarpa</i>
Q43111	0	14.91	0	Pectinesterase 3 (PE 3) (Pectin methylesterase 3), MPE3 = <i>Phaseolus vulgaris</i>
B9R9Q8	0	875.40	0	21 kDa protein, enzyme inhibitor activity; pectinesterase activity = <i>Ricinus communis</i>
B9GXZ7	0	11.33	0	Pectinesterase = <i>Populus trichocarpa</i>
B9S5X9	0	20.75	0	Beta-fructofuranosidase. cell wall isozyme = <i>Ricinus communis</i>
Q01943	0	117.86	81.03	Extensin (Class I) = <i>Solanum lycopersicum</i>
Q8W5B0	0	25.13	0	Alpha-expansin 3 = <i>Cucumis sativus</i>
A1X8W4	0	599.03	0	Beta expansin 1, EXPB1 = <i>Solanum tuberosum</i>
B9RW20	0	38.61	0	Beta-expansin 3, putative = <i>Ricinus communis</i>
P54904	0	27.77	0	Pyrroline-5-carboxylate reductase (P5C reductase) (P5CR) (Protein EMBRYO DEFECTIVE 2772). PROC1 EMB2772
Q9LVJ1	0	7.72	0	Cucumisin-like serine protease; subtilisin-like protease, At3g14067
P22503	0	806.45	0	Endoglucanase (Abscission cellulase) (Endo-1.4-beta-glucanase) = <i>Phaseolus vulgaris</i>
B2ZP02	30.91	2218.35	114.97	Beta-1.3-glucanase = <i>Vitis vinifera</i>
Q6V596	0	458.75	0	Endo-1.4-beta-glucanase = <i>Malus domestica</i>
Q25B23	0	29.56	0	Endo-beta-1.4-glucanase, eg4 = <i>Prunus pérsica</i>
D0R6J2	11.69	49.70	0	1.3-beta-glucan synthase (EC 2.4.1.34), cal5 = <i>Malus domestica</i>
P41376	0	43.68	28.31	Eukaryotic initiation factor 4A-1 (eIF-4A-1) (ATP-dependent RNA helicase eIF4A-1) (DEAD-box ATP-Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 13 = <i>Actinidia deliciosa</i>
C0IRH2	0	46.60	0	

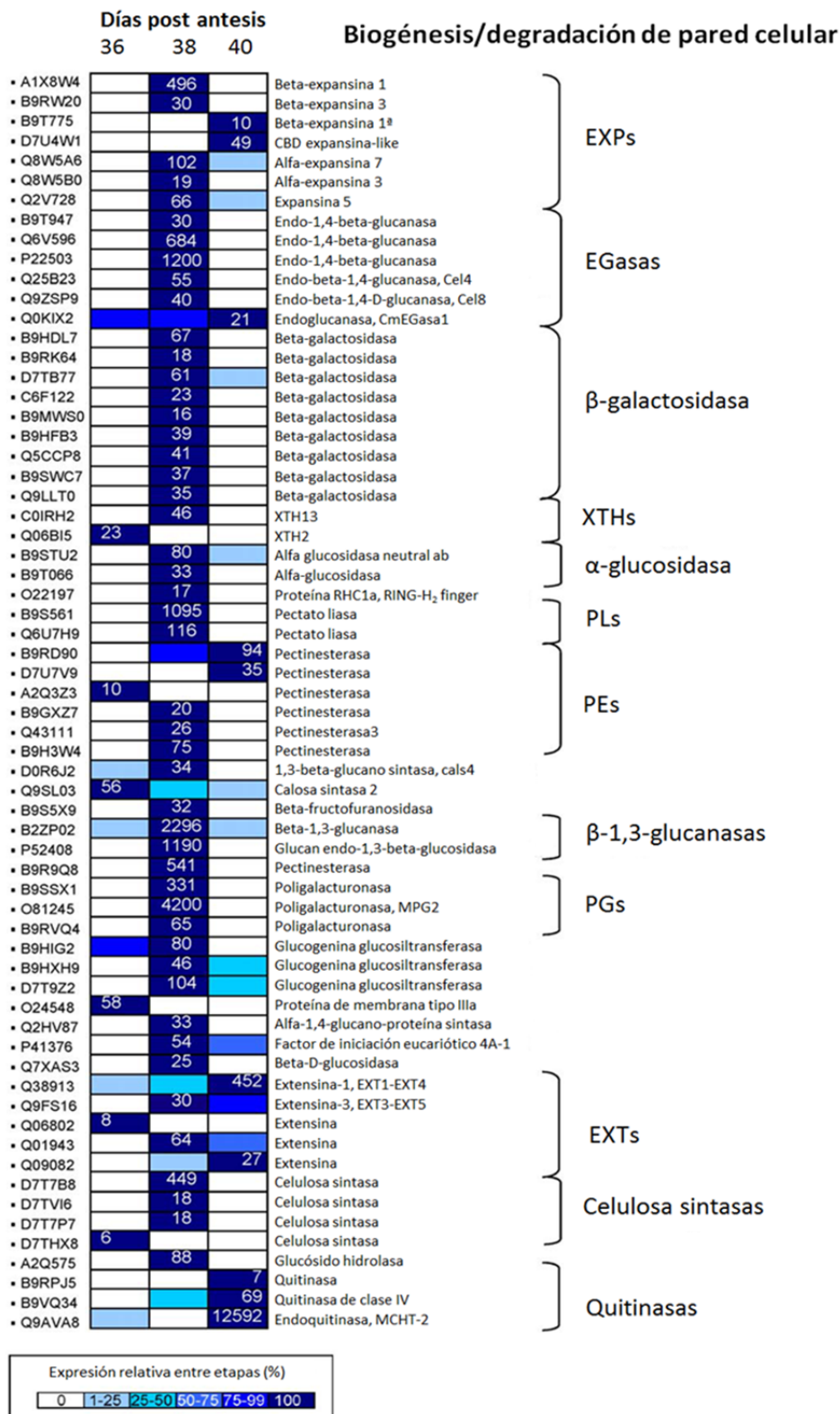
## Resultados y discusión

Q2HV87	0	31.70	0	Alpha-1.4-glucan-protein synthase (UDP-forming) = <i>Medicago truncatula</i>
P52408	0	1133.33	0	Glucan endo-1.3-beta-glucosidase, basic isoform (1->3)-beta-glucan endohydrolase) ((1->3)-beta-glucanase) (Beta-
Q7XAS3	0	13.26	0	Beta-D-glucosidase = <i>Gossypium hirsutum</i>
B9T066	0	11.82	0	Alpha-glucosidase = <i>Ricinus communis</i>
B9T947	0	35.46	0	Endo-1.4-beta-glucanase = <i>Ricinus communis</i>
Q9ZSP9	0	21.33	0	Endo-beta-1.4-D-glucanase, Cel8 = <i>Solanum lycopersicum</i>
B9S561	0	827.66	0	Pectate lyase = <i>Ricinus communis</i>
Q6U7H9	0	92.50	0	Pectate lyase = <i>Malus domestica</i>
B9HDL7	0	26.65	0	Beta-galactosidase = <i>Populus trichocarpa</i>
Q5CCP8	0	16.00	0	Beta-galactosidase, PpGAL5 = <i>Pyrus pyrifolia</i>
B9HFB3	0	15.34	0	Beta-galactosidase = <i>Populus trichocarpa</i>
B9SWC7	0	14.64	0	Beta-galactosidase = <i>Ricinus communis</i>
C6F122	0	10.63	0	Beta-galactosidase = <i>Glycine max</i>
D7TB77	0	24.40	2.00	Beta-galactosidase = <i>Vitis vinifera</i>
B9RK64	0	7.14	0	Beta-galactosidase = <i>Ricinus communis</i>
Q9LLT0	0	13.69	0	Beta-galactosidase, TBG5 = <i>Solanum lycopersicum</i>
A2Q575	25.07	91.95	0	Glycoside hydrolase, family 19 (uncharacterized protein) = <i>Medicago truncatula</i>
D7T7B8	0	182.07	0	Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold 20.assembly12x (Fragment) = <i>Vitis vinifera</i>
Q9FE06	0	374.86	0	AT5g64260/MSJ1_10 (Phi-1-like protein) (Putative phi-1 protein). At5g64260
B9STK4	10.52	200.00	0	Transferase = <i>Ricinus communis</i>
B9HIG2	58.17	73.86	0	Predicted protein = <i>Populus trichocarpa</i>
D7T7P7	0	6.28	0	Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold 39.assembly12x (Fragment) = <i>Vitis vinifera</i>
D7TVI6	3.59	8.09	0	Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold 25.assembly12x (Fragment) = <i>Vitis vinifera</i>
Q8VYW6	0	74.59	0	AT4g39640/T19P19_30 (At4g39640/T19P19_30)
D7TEC1	0	12.80	0	Whole genome shotgun sequence of line PN40024, scaffold 59.assembly12x (Fragment) = <i>Vitis vinifera</i>
Q7M1K0	0	275.74	0	Chitinase = <i>Lagenaria siceraria</i>

En el grupo A, los transcritos más abundantes codifican XTH2 y calosa sintasa 2 (CALS2). Como las xiloglucano endotransglucosilasas (XTHs) están involucradas en la modificación de la carga y transporte de componentes de la pared celular, aumentaban normalmente durante el proceso de abscisión en hojas de soja, estambre de arabis, hojas de cítricos, flores de tomate y pétalos de rosa (Meir y cols., 2010; Agustí y cols., 2007; Tucker y cols., 2007; Cai y Lashbrook, 2008; Singh y cols., 2011).

En la figura 32 se representan los perfiles de expresión de diferentes genes relacionados con biogénesis y degradación de la pared celular durante la abscisión de fruto maduro de melón.

Resultados y discusión



**Figura 32. Perfil de expresión de familias génicas que codifican diferentes proteínas relacionadas con pared celular durante la abscisión de fruto maduro de melón.** Las secuencias fueron seleccionadas tras establecer un  $P < 0,01$ . Los niveles de expresión génica a 36, 38 y 40 DPA se indican con barras de colores. Para la muestra que presenta el nivel máximo de expresión, la abundancia de transcritos normalizada se expresa como el número de transcritos por total de transcritos. Para las otras muestras, el nivel de expresión se indica como porcentajes de la máxima abundancia de transcritos normalizada del gen, como se describe en el código de colores desde 0% (blanco) a 100% (azul oscuro)

Los resultados mostraron que dos XTHs: *CmXTH2* y *CmXTH13*, disminuyen y aumentan, respectivamente, durante la inducción temprana de la abscisión, sugiriendo que el papel de *CmXTH2* en la ZA de fruta madura podría estar relacionado con el mantenimiento de la integridad estructural de la pared celular, y su posterior disminución durante la inducción temprana de la abscisión de melón podría contribuir a la desorganización de la pared celular, lo cual estaría regulado a través de diferentes genes de XTH como *CmXTH13*. Por otra parte, la expresión de *CmXTH13* está fuertemente reprimida durante la inducción tardía de la abscisión en la ZA de melón, lo que sugiere que su acción podría no ser importante para la reestructuración tras la separación de las células de la ZA. Ha sido demostrado que la expresión de otros genes de XTH en melón (*CmXTH1* y *CmXTH3*) está asociada con la maduración, pero solo de una manera parcialmente dependiente del etileno, lo que sugiere que no juegan un papel significativo en el reblandecimiento de frutos de melón dependiente de etileno (Rose y cols., 1998). Anteriormente, la enzima *XTH2* ha sido identificada como una XTH bajo el control de brasinoesteroides (BR), mientras que *XTH13* ha sido identificada como una XTH bajo el control combinado de BR y auxinas en las respuestas de escape al sombreado inducidas por luz azul en plántulas de *Arabidopsis thaliana* (Keuskamp y cols., 2012). De manera homóloga, la auxina y los BR podrían regular *CmXTH13* durante la abscisión de melón, por lo cual regularían la organización de la pared celular en la ZA. Así, estos resultados indican que los dos genes XTH han diversificado su perfil de expresión dentro de las ZAs de frutos como una manera de adoptar competencias para funciones específicas en las dinámicas de pared celular.

A 38 DPA, tres genes de poligalacturonasas (PGs) diferentes son inducidos en la ZA de melón, siendo reprimidos posteriormente. El análisis mostró que la expresión de *MPG2*, y no la de *MPG1*, es inducida y reprimida en la ZA de melón durante la inducción temprana y tardía de la abscisión respectivamente, sugiriendo que *MPG2* podría participar en los eventos tempranos de desorganización influyendo en la porosidad de la pared. Análisis genéticos han demostrado que *ADPG1* y *ADPG2* son esenciales para la dehiscencia de las silicuas en *Arabidopsis* (Ogawa y cols., 2009). Además, *ADPG2* contribuye a la abscisión de órganos florales, mientras que los dos genes, *ADPG1* y *ADPG2*, contribuyen a la dehiscencia de las anteras (Ogawa y cols., 2009). Los datos también muestran que 2 genes de pectinliasas (PL) y 3 de pectinesterasas (PE) aumentaron fuertemente durante la inducción temprana de la abscisión, lo que sugiere que estos tipos de enzimas podrían también contribuir a la desorganización de la pared asociada con la abscisión de melón, como se indicó previamente en abscisión de estambres, hojas y pétalos (Agustí y cols., 2009; Cai y Lashbrook, 2008; Sinh y cols., 2011). De manera similar, nuestros resultados

indican que 5 genes de expansinas (EXP): *EXP5*,  $\beta$ -*EXP1*,  $\beta$ -*EXP3*,  $\alpha$ -*EXP3* y  $\alpha$ -*EXP7* aumentaron durante la inducción temprana de la abscisión, como había sido observado previamente en el proceso de abscisión (Tucker y cols., 2007; Zhu y cols., 2011). Estos resultados aumentan la posibilidad de que muchas EXPs podrían actuar en la expansión celular durante la inducción temprana de la abscisión de melón. Por otro lado, en nuestro análisis se encontró que dos genes relacionados con pared celular: *EXT1-EXT4* y *EXT3-EXT5*, eran inducidos específicamente en la ZA de melón durante las etapas temprana y tardía de la inducción de la abscisión. El gen *EXT1-EXT4* se induce por heridas, y por una serie de estímulos tales como ABA, JA, y ácido salicílico (SA) (Merkouropoulos y Shirsat, 2003).

En los análisis realizados, un nuevo gen relacionado con pared celular: *EXORDIUM (EXO) like 2 (EL2)*, se encontró que aumentaba en la ZA de melón durante la inducción temprana de la abscisión. Este gen *EXO* extracelular fue identificado como un mediador potencial del crecimiento promovido por BR (Farrar y cols., 2003), y es parte de una familia génica con 8 miembros en Arabidopsis. Como *EXO* está presumiblemente involucrado en un proceso de señalización que coordina las respuestas a BR con señales ambientales o de desarrollo, no puede descartarse que la proteína *EXO* pudiera estar involucrada en la expansión celular asociada con la inducción temprana de la abscisión de melón. Recientemente, ha sido descubierto que otro gen bajo el control de BR, *XET-BR1*, está involucrado en la abscisión de flores de tomate (Meir y cols., 2010). Por tanto, aquí encontramos una fuerte inducción de *EXO* en la ZA de melón lo cual podría probablemente actuar corriente abajo de la ruta de señalización del BR en la ZA de melón, y podría mediar en la abscisión a través de modificaciones de las propiedades de la pared celular y el metabolismo.

El perfil del grupo C incluye transcritos acumulados en la muestra de la ZA a 40 DPA, tales como una PE, dos quitinasas, dos  $\beta$ -EXPs, y dos EXTs, lo que indica que estos tipos de enzimas podrían ser requeridos para la separación celular completa del fruto maduro, y posiblemente, para la reestructuración de la pared celular tras la separación celular de la ZA. La acumulación de quitinasas ha sido asociada con la defensa de la planta (Li y cols., 2009; Agustí y cols., 2009), y con la abscisión promovida por etileno en hojas de cítricos (Agustí y cols., 2009), donde los seis genes encontrados que codifican quitinasas y una endoglucanasa hevein-like estaban sobreexpresados en las células corticales del peciolo tras el tratamiento con etileno. En el presente trabajo, los análisis de pirosecuenciación de la ZA revelaron que de los cuatro genes analizados que codifican quitinasas, la expresión de 3 genes está inducida en la ZA de melón durante la abscisión (1 en fase temprana y 2 en



tardía), mientras que la expresión de solo una endoquitinasa (*MCHT-2*) se reprime y se induce durante la inducción temprana y tardía de la abscisión, respectivamente, indicando que *MCHT-2* actúa exclusivamente en eventos tardíos a lo largo de la separación celular en melón. Así, el estudio indica que todos los miembros de las familias PG, PL, EGasa,  $\beta$ -1,3-glucanasa,  $\beta$ -glucosidasa, y  $\beta$ -galactosidasa, aumentaron fuertemente solo durante la inducción temprana de la abscisión, lo que sugiere que estos tipos de enzimas actúan sinérgicamente en los eventos tempranos de desorganización para remodelar la pared celular, mientras que se observó que la expresión de miembros de las familias PE, EXP,  $\alpha$ -glucosidasa, y EXT eran inducidos durante la inducción temprana y permanecían estables o aumentaban a lo largo de la separación celular, lo que implica que estos tipos de enzimas tienen el potencial para realizar funciones en la desorganización y la separación celular.

#### 4.3.2. Caracterización de genes relacionados con tráfico de vesículas

La expresión de genes inducidos en la ZA de melón indica una reorganización de la pared celular entre 38 y 40 DPA. Los cambios en la disposición de material de la pared requieren formación de vesículas y transporte, lo que se refleja en un gran número de genes inducidos a 38 DPA (tabla 13). Motores de kinesina y Rab-GTPasas junto con tubulinas están potencialmente involucrados en el transporte de orgánulos y vesículas (Deneka y cols., 2003). En particular, ha sido demostrado que las Rab-GTPasas son reguladores importantes del tráfico de endomembranas, mediando la comunicación entre vacuola, membrana plasmática, ER, Golgi y pared celular (Lycett, 2008). Sin embargo, se conoce poco sobre la participación de las Rab-GTPasas en abscisión. Entre las Rab-GTPasas identificadas en nuestro análisis, 22 de ellas fueron inducidas a 38 DPA en la ZA de melón (tabla 13), lo que indica que al menos algunas participan en la secreción y/o reciclaje de componentes de la pared celular durante la inducción temprana de la abscisión de melón.

Las siguientes proteínas son expresadas intensamente en la ZA de frutos de melón a 38 DPA (Fig. 33): 8 Rab11 (correspondientes al clado de RabA de Arabidopsis), 3 Rab2 (correspondientes a RabB), 2 Rab18 (correspondientes a RabE), 3 Rab1 (correspondientes a RabD), 2 Rab8 (correspondientes a RabE), 2 Rab5 (correspondientes a RabF), 2 Rab7 (correspondientes a RabG), y una Rab6 (correspondiente a RabH). Al haber diferentes clases de proteínas Rab-GTPasas, sería esperable que regularan alguno de los siguientes procesos: la exocitosis desde el trans-Golgi network, el transporte a la membrana plasmática y la pared, la endocitosis, o el tráfico de vesículas durante la abscisión de melón (Fig. 33).

Resultados y discusión

**Tabla 13.** Genes relacionados con tráfico de vesículas reprimidos o inducidos en la ZA del fruto durante la abscisión de fruto maduro de melón. Las secuencias fueron seleccionadas estableciendo una  $P < 0.01$ . La tabla muestra el conteo total de lecturas para cada gen tras la normalización (RPKMx1000) a través de las tres muestras: (a) ZA pre-separación celular (36 DPA), (b) ZA separación celular parcial (38 DPA, inducción temprana de abscisión), (c) separación celular casi completa (40 DPA, inducción tardía de abscisión).

	Uniprot ID	36 DPA	38 DPA	40 DPA	Ortólogo supuesto	Descripción del gen
<b>Familia tubulina</b>	Q41973	43.85	0	0	At5g19780	TUA5, tubulina alfa-5
	B9DHQ0	23.47	106.80	53.99	At5g19780	TUA5, tubulina alfa-5
	B9S382	0	6.11	0	At5g23860	TUB8, tubulina beta 8
<b>Familia de proteínas quinesin-like</b>	D7T6C8	0	13.90	0	At3g16630	Quinesina-13A
	B9RB32	0	7.82	0	AT1G27500	Cadena ligera de quinesina
	A5BHF6	0	5.39	0	AT3G16630	Quinesina-13A
	B9RYP4	3.30	3.30	6.06	At4g10840	Cadena ligera de quinesina
<b>Superfamilia de GTPasas pequeñas, familia RAB</b>	Q9FGK5	0	13.57	0	At5g47520	Grupo RabA/Rab11 (RabA5a)
	Q40193	0	21.60	0	At1g07410	Grupo RabA/Rab11 (RabA2b)
	B9H2F2	0	21.40	0	At4g18800	Grupo RabA/Rab11 (RabA1d, Rab11B)
	A9PCE2	12.40	27.90	0	At1g09630	Grupo RabA/Rab11 (RabA2a, Rab11C)
	B9GU86	0	55.29	0	At2g31680	Grupo RabA/Rab11 (RabA5d)
	B9RHG6	7.47	0	0	At3g12160	Grupo RabA/Rab11 (RabA4d)
	A5AWW7	0	22.42	0	At5g47960	Grupo RabA/Rab11 (RabA4c)
	D7TLL7	0	8.29	0	At1g07410	Grupo RabA/Rab11 (RabA2b)
	A5B3S9	23.25	0	0	At1g05810	Grupo RabA/Rab11 (RabA5e, ARA1)
	A5BGY6	0	48.67	0	At5g65270	RabA/Rab11 group (RabA4a)
	P92963	17.37	45.81	0	At4g17170	RabB/Rab2 group (RabB1b, RabB1c, Rab2A, Rab2)
	Q38922	50.55	75.82	0	At4g35860	RabB/Rab2 group (RabB1b, Rab2C)
	<b>Superfamilia de GTPasas pequeñas, familia RAB</b>	B9SGV6	0	0	12.19	At4g17170
Q9LP15		24.32	0	0	At1g43890	RabC/Rab18 group (RabC1, Rab18, RabB18)
D7TIU1		0	12.63	0	At5g03530	RabC/Rab18 group (RabC2A, Rab18b)
E0CQK6		7.60	68.40	0	At1g43890	RabC/Rab18 group (RabC1, Rab18-1)
Q8W4S8		0	13.20	0	At4g17530	RabD/Rab1 group (RabD2C, Rab1C)
B9MUT7		75.53	228.24	72.24	At1g02130	RabD/Rab1 group (RabD2a, ARA5)

Resultados y discusión

	D7TGR5	29.70	21.45	0	At3g11730	RabD/Rab1 group (RabD1)
	P28186	72.53	103.39	15.43	At3g46060	RabE/Rab8 group (RabE1c, Rab8A, ARA3)
	B9RAT6	0	14.49	0	At4g20360	RabE/Rab8 group (RABE1b, RAB8D)
	P31582	115.00	131.66	35.00	At5g45130	RabF/Rab5 group (RabF2a)
	B9HUI6	26.53	36.48	21.55	At3g54840	RabF/Rab5 group (RabF1, ARA6)
	Q43463	0	58.25	0	At4g09720	RabG/Rab7 group (RabG3a)
	Q9XER8	0	28.98	0	At1g52280	RabG/Rab7 group (RabG3d)
	Q9LFT9	17.71	27.37	0	At5g10260	RabH/Rab6 group (RabH1e)
	O80501	76.92	54.48	0	At2g44610	RabH/Rab6 group (RabH1b, Rab6A)
	B9S6U7	15.72	9.67	0	At3g06540	REP, RAB escort protein
	Q9LTF8	0	5.91	0	At5g52580	RabGAP/TBC domain-containing protein, RAB GTPase activator
	B9RWU9	3.04	4.87	0	At3g49350	Ypt/Rab-GAP domain of gyp1p superfamily protein, RAB GTPase activator
	B9SA43	0	7.26	0	At4g27100	Ypt/Rab-GAP domain of gyp1p superfamily protein, RAB GTPase activator
	B9SP88	0	4.04	0	At4g29950	Ypt/Rab-GAP domain of gyp1p superfamily protein, RAB GTPase activator
	D7TC51	0	3.89	3.41	At5g52580	Ypt/Rab-GAP domain of gyp1p superfamily protein, RAB GTPase activator
	D7SMJ1	0	5.58	0	At3g02460	Ypt/Rab-GAP domain of gyp1p superfamily protein, RAB GTPase activator
	A9PC79	30.03	80.33	16.51	At2g44100	GDI1, guanosine nucleotide diphosphate dissociation inhibitor 1
	B9SL15	36.19	93.51	27.14	At2g38360	PRA1.B4, prenylated rab acceptor 1.B4
	B9SZ60	7.71	10.80	3.08	At1g08770	PRA1.E, prenylated rab acceptor 1.E
Small GTPase superfamily, ARF family	Q9ZPX1	0	18.01	0	At2g18390	ARL2, HAL, TTN5
	B9R9D6	37.58	251.63	58.82	At5g52210	GB1, GTP-binding protein 1
	D7T663	341.23	873.61	176.93	At3g62290	ARF1E, ADP-ribosylation factor A1E
	O04834	72.53	103.62	58.72	At4g02080	SAR2, secretion-

Resultados y discusión

						associated RAS super family 2
Small GTPase superfamily, RAN family	D7SUQ2	83.06	106.01	22.95	At5g55190	RAN3
	D7TBW7	0	0	20.51	At5g55190	RAN3
	D7U0V8	83.64	57.42	0	At5g55190	RAN3
Small GTPase superfamily, RHO GTPase family	B9RF54	0	13.72	0	At3g63150	Calcium binding GTP-ASE, MIRO-related GTP-ASE 2, MIRO2
	B9R9W7	0	16.26	0	At5g61530	Rho GTPase activator
Syntaxin/t-SNARE family	A5BYQ4	0	37.71	0	At5g46860	SYP22, VAM3, SGR3
	B9SDJ9	0	28.48	0	At3g11820	SYP121, SYR, PEN1
	B9SIA7	0	27.41	0	At5g08080	SYP132
	B9RFG2	0	9.28	0	At3g05710	SYP43
	B9T2S1	0	59.36	0	At5g06320	NDR1/HIN1-LIKE 3, NHL3
	D7T4S5	0	5.06	0	At5g05760	SYP31, SED5
	Q94AU2	0	19.87	0	At1g11890	SNARE protein SEC22, SECRETION 22
Exocyst componenet	B9RRM3	6.15	21.98	0	At3g10380	SEC8, subunit of exocyst complex 8
VSR (BP-80) family	P93026	0	5.88	0	At3g52850	VSR1
SCAMP family	Q9SXA5	0	6.87	0	At1g11180	SCAMP5
Dynamin family	B9SBU7	0	4.05	0	At1g10290	ADL6, DRP2A
	B9T3E4	3.18	8.36	0	At4g33650	ADL2, DRP3A
SecY/SEC61-alpha family	B9T4L2	0	2.99	0	At2g18710	SCY1, SECY HOMOLOG 1
	D7T5Q9	0	14.41	0	At1g29310	SecY
G-alpha family	P18064	0	0	22.62	At2g26300	GP ALPHA 1, GPA1
GTP-binding elongation factor family	A5BSV9	0	13.62	0	At1g04170	EIF2 GAMMA, eukaryotic translation initiation factor 2
	B9I879	0	15.36	0	At1g18070	Translation elongation factor EF1A/initiation factor
	B9PAE3	11.49	0	0	At5g60390	GTP binding Elongation factor Tu family protein
	O23755	134.44	653.22	157.37	At1g56070	LOS1, Ribosomal protein S5/Elongation factor G/III/V
	B9GTD8	5.96	0	0	At4g02930	GTP binding Elongation factor Tu family protein
	Q56XT1	0	14.59	0	At1g62750	Elongation factor G
	D7TDD3	0	14.13	0	At1g62750	SCO1, Translation elongation
	B9DHZ8	13.93	116.14	61.55	At4g20360	Translation elongation factor
	D7SX17	0	6.26	0	At1g17220	FUG1, Translation initiation factor 2, small GTP-binding
	V-type ATPase	Q9SZN1	15.05	48.59	0	At4g38510
O23654		4.28	12.84	2.67	At1g78900	VHA-A

## Resultados y discusión

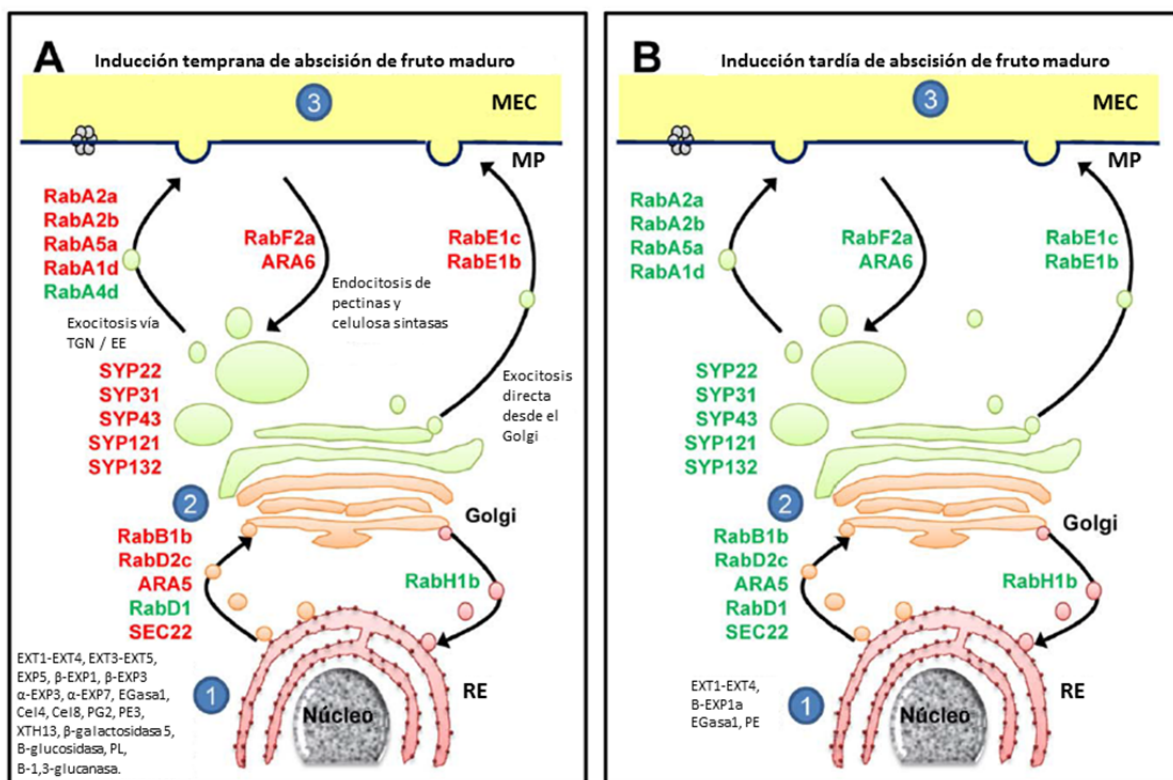
family	Q9XGM1	16.60	66.41	12.77	At3g58730	VHA-D, VATD, VATPD
	P59227	140.24	95.52	18.29	At4g34720;At4g38920 At2g16510	VHA-C1 AVA-P1 AVAP1; VHA-C3 AVA-P3 AVAP3; VHA-C5 AVA-P5 AVAP5
	Q9SZY7	77.77	103.70	24.07	At4g32530	VMA16
	Q9LJ15	0	94.01	0	At3g28710	VHA-D1

Esto implica su participación en mediar el reparto de enzimas despolimerizadoras de pared al apoplasto, requeridas para la expansión celular y la desorganización de pared a 38 DPA en la ZA de melón. Notablemente, la sintaxina SYP121 (familia t-SNARE), la cual ha sido relacionada con la secreción en respuesta a ABA (Leyman y cols., 2000), también aumenta durante la inducción temprana de la abscisión. Sobre esta base, podría ser cuestionado si esta proteína SYP121 juega un papel esencial junto con algunas de las diferentes Rab-GTPasas inducidas en la ZA de melón para el transporte de proteínas y membrana a través del sistema endomembranoso hacia su destino y si este transporte juega un papel crítico en mediar las señales planta-hormona durante la abscisión de melón.

Un gen que codifica una proteína GTPasa activadora del factor de ribosilación del ADP (ARF-GAP), NEVERSHED (NEV), ha sido propuesto como un regulador esencial del movimiento de proteínas para activar la separación celular en *Arabidopsis* (Liljegren y cols., 2009). Nuestros resultados demuestran que algunos miembros ARFs aumentaron durante la inducción temprana de la abscisión (tabla 13), lo que fortalece la posibilidad de que el tráfico de endosomas regulado por GTPasa ARF pueda participar en la señalización de la abscisión. Es de particular interés también el conjunto de dos miembros de la familia RAN GTPasas homólogos a RAN3 (Haizel y cols., 1997). El aumento de expresión de estos genes en la ZA de frutos a 38 o 40 DPA sugiere que podrían funcionar en la mediación del transporte nucleocitoplasmático durante la señalización de la abscisión. Cabe señalar que la sobreexpresión de *TaRAN1* y *OsRAN2* provocan que *Arabidopsis* sea hipersensible a auxina y ABA, respectivamente (Wang y cols., 2006; Zang y cols., 2010), por lo que estas dos rutas de señalización podrían ser particularmente sensibles a componentes alteradores del tráfico nucleocitoplasmático. Otro gen inducido homólogo a MIRO1 codifica un miembro de la familia Rho GTPasa que ha evolucionado para regular el tráfico mitocondrial (Yamaoka y Leaver, 2008). Por lo tanto, estos resultados aumentan la posibilidad de que muchas familias de pequeñas GTPasas pudieran actuar en el tráfico de vesículas durante la abscisión de fruto maduro, incluyendo Rabs, ARFs, RANs y Rhos. Otros genes que se encontraron notablemente presentes en la ZA de frutos a 38 DPA

involucraban tráfico de vesículas, codificando ATPasas de tipo V y midasinas, los cuales están involucrados en el tráfico desde el trans-Golgi network a la vacuola central. Por tanto, estos datos sugieren que el tráfico vesicular podría regular la separación celular durante la inducción temprana de la abscisión de melón.

Un modelo que integra las funciones potenciales del tráfico de vesículas y la señalización de receptores quinasa-like (RLK) durante la separación de órganos ha sido presentado recientemente en la abscisión floral de *Arabidopsis* (Burr y cols., 2011). En *Arabidopsis*, la abscisión floral está controlada por la actividad en competencia de varios LRR-RLKs (receptores proteín kinasas con repeticiones ricas en leucina). (Burr y cols., 2011; Cho y cols., 2007; Lewis y cols., 2010). Aquí, el análisis de expresión detecta varios LRR-RLKs y RLKs inducidos y reprimidos a 38 o 40 DPA en la ZA de melón (tabla 14).



**Figura 33.** Representación esquemática simplificada de las rutas de tráfico hacia y desde la pared celular durante la inducción temprana (A) y tardía (B) de la abscisión de melón. Las Rab-GTPasas probablemente involucradas en cada etapa están indicadas en verde (expresión disminuida) y rojo (expresión aumentada). 1, síntesis de proteínas en el retículo endoplasmático (RE): EXT, EXP, EGasa, PG, PE, PL, XTH, β-glucosidasa, β-galactosidasa, y 1,3-glucanasa, durante la inducción temprana de la abscisión; EXT, EXP, EGasa, y PE durante la inducción tardía de la abscisión. 2, síntesis de polisacáridos de matriz y ensamblaje de proteínas en Golgi y TGN (trans-Golgi network)/compartimentos primarios endosomales. 3, modificación de elementos de la pared por enzimas secretadas. Rutas hacia y desde la vacuola han sido omitidas por simplicidad. Información adicional de los genes relacionados con tráfico de vesículas se presentan en el anexo 10. (MEC: equivale a pared celular o apoplasto; MP: membrana plasmática).

## Resultados y discusión

**Tabla 14.** Genes relacionados con la fosforilación de proteínas inducidos o reprimidos en la ZA del fruto durante la abscisión de melón. La tabla muestra el conteo total de lecturas para cada gen tras la normalización (RPKMx1000) en las 3 muestras: (a) separación pre-celular de la AZ (36 DPA), (b) separación celular parcial de la AZ (38 DPA, inducción temprana de abscisión), (c) separación celular casi completa (40 DPA, inducción de abscisión tardía).

UniProt ID	36 DPA	38 DPA	40 DPA	Descripción
D7SK82	0	65.30	40.00	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
P48578	13.84	167.19	8.51	Serine/threonine-protein phosphatase PP2A-3 catalytic subunit, PP2A3 EP7 PP2A4 At3g58500 F14P22.90
D7SYX3	0	45.85	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
B9S5U9	0	25.49	0	Protein phosphatase 2c = <i>Ricinus communis</i>
B9IA45	0	19.80	0	uncharacterized protein = <i>Populus trichocarpa</i>
D7T4F2	17.62	0	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
D7TEG6	26.96	17.15	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
B9SPE2	0	13.93	0	protein tyrosine/serine/threonine phosphatase =
B9ILA9	0	26.25	0	uncharacterized protein = <i>Populus trichocarpa</i>
D7SV50	11.20	77.49	16.80	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
Q9M3V1	6.45	0	0	Protein phosphatase 2C (PP2C) = <i>Fagus sylvatica</i>
B9R8Q9	0	16.36	0	Protein phosphatase 2c = <i>Ricinus communis</i>
B9S5C5	0	16.84	0	Protein phosphatase 2c = <i>Ricinus communis</i>
D7U2P0	0	16.07	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
B9RNU7	5.54	0	0	Protein phosphatase 2c = <i>Ricinus communis</i>
B9SUG2	0	111.94	0	Guanylate kinase = <i>Ricinus communis</i>
B9SVD1	0	93.87	0	ATP binding protein = <i>Ricinus communis</i>
D7SHG7	2.29	110.34	64.36	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
B9SFH0	0	75.82	0	Protein kinase atmrk1= <i>Ricinus communis</i>
D7T237	0	50.07	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
B9RII2	0	48.04	0	ATP binding protein= <i>Ricinus communis</i>
B9RIE7	0	54.51	14.41	Poly(P)/ATP NAD kinase = <i>Ricinus communis</i>
B9S2A6	23.32	0	0	AMP-activated protein kinase, gamma regulatory subunit = <i>Ricinus communis</i>
B9SEU2	10.49	0	0	ATP binding protein = <i>Ricinus communis</i>
D7T6M9	0	17.19	2.83	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
B9RLU0	0	24.56	9.09	Brassinosteroid LRR receptor kinase = <i>Ricinus communis</i>
Q7GC82	19.88	5.75	0	Cm-ERS1 protein = <i>Cucumis melo</i>
B9SU88	27.43	0	0	Receptor for activated protein kinase C = <i>Ricinus communis</i>
Q9SSY6	0	33.78	0	Ethylene receptor 1, ETR1 = <i>Cucumis sativus</i>
D7U5N9	40.81	15.87	11.33	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
B9SHG2	0	31.67	7.09	Casein kinase = <i>Ricinus communis</i>
Q9FDV7	0	44.44	4.16	Protein kinase (PK)
A0MNJ1	5.30	90.90	4.54	CBL-interacting protein kinase 3, CIPK3 = <i>Populus trichocarpa</i>
B9SWC3	0	49.64	9.45	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase = <i>Ricinus communis</i>
B9REV9	0	35.02	0	Serine/threonine-protein kinase cdk9 = <i>Ricinus communis</i>
B9SPP7	0	29.36	0	Protein ABC1 = <i>Ricinus communis</i>
B9T544	9.09	124.24	100.00	Fructokinase = <i>Ricinus communis</i>
D7SZI3	0	35.91	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
B9RLG3	0	28.33	3.09	Inositol or phosphatidylinositol kinase = <i>Ricinus communis</i>
B9RWX6	0.9	21.29	0	Fkbp-rapamycin associated protein = <i>Ricinus communis</i>
O65379	11.03	0	0	F12F1.13 protein
B9S1K5	0	39.56	7.32	Mak = <i>Ricinus communis</i>

## Resultados y discusión

B9S7L3	0	34.78	0	Casein kinase = <i>Ricinus communis</i>
B9SJ54	0	32.47	0	Big map kinase/bmk = <i>Ricinus communis</i>
O23249	233.71	218.39	126.43	Cyclin-dependent kinases regulatory subunit 1 CKS1 At2g27960 T1E2.12
B9S2T6	7.91	0	0	ATP binding protein = <i>Ricinus communis</i>
D7SVW4	0	36.09	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
D7U323	0	35.54	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
D7SU25	0	20.64	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
A9P7U5	0	26.56	9.48	Pyruvate kinase = <i>Populus trichocarpa</i>
B9RA37	5.46	85.24	22.95	Inositol hexaphosphate kinase = <i>Ricinus communis</i>
A9P984	0	39.10	21.50	uncharacterized protein = <i>Populus trichocarpa</i>
D7TCE8	16.59	6.78	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
C4P7V9	10.70	0	0	CBL-interacting protein kinase 10, CIPK10 = <i>Vitis vinifera</i>
D7TQF1	0	28.74	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
B6V3C0	0	25.43	0	Hexokinase 1 = <i>Cucumis melo</i>
D7SWH1	0	26.33	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
D7TX82	2.65	0	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
B9HSF8	4.32	56.27	0	uncharacterized protein = <i>Populus trichocarpa</i>
B9SRC8	0	19.13	0	Big map kinase/bmk = <i>Ricinus communis</i>
Q5F2M7	0	19.92	0	Pyruvate kinase = <i>Glycine max</i>
Q6RUF8	0	19.26	0	Glycerol kinase = <i>Glycine max</i>
B9RVC9	0	28.15	0	Homoserine kinase = <i>Ricinus communis</i>
B9T4J2	0	35.02	82.48	Casein kinase II, alpha chain = <i>Ricinus communis</i>
D7TRL4	0	30.57	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
Q9SA26	0	9.88	4.35	F309.7 protein, At1g16270 F309.7
D7TWH5	0	33.14	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
P43289	0	28.52	12.22	Shaggy-related protein kinase gamma, ASK3 At3g05840 F10A16.14
Q06060	0	24.53	0	Mitogen-activated protein kinase homolog D5 = <i>Pisum sativum</i>
D7T3N9	0	3.96	1.68	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
D7KVL5	0	11.90	0	Kinase family protein = <i>Arabidopsis lyrata</i>
B9S8J6	0	19.98	2.14	Calcium-dependent protein kinase = <i>Ricinus communis</i>
P93774	0	33.69	0	Shaggy-like kinase = <i>Ricinus communis</i>
D7SWB3	0	19.51	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
Q9LRN0	0	10.92	6.10	AT3g24190/MUJ8_17
A5BJJ8	0	17.31	0	CBL-interacting protein kinase 07, CIPK07 = <i>Vitis vinifera</i>
D7SRF4	0	27.02	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
D7TD38	0	9.62	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
D7TEC1	0	12.80	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
A0MNJ4	0	18.98	9.87	CBL-interacting protein kinase 7 = <i>Populus trichocarpa</i>
B9N4U7	0	22.95	0	uncharacterized protein = <i>Populus trichocarpa</i>
B9RUI5	0	13.84	4.42	BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-associated receptor kinase 1 = <i>Ricinus communis</i>
B9SNC0	0	39.30	7.86	Serine-threonine protein kinase = <i>Ricinus communis</i>
B9RBD2	5.37	49.05	7.39	Protein-tyrosine kinase = <i>Ricinus communis</i>
B9S423	25.87	13.69	0	Cyclin-dependent protein kinase = <i>Ricinus communis</i>
B9RKE5	4.74	0	0	Phosphofructokinase = <i>Ricinus communis</i>
D7SJ26	3.08	0	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
B9SDF7	0	9.04	0	ATP binding protein = <i>Ricinus communis</i>
B9SFF2	0	9.03	2.35	S-locus-specific glycoprotein S6 = <i>Ricinus communis</i>



## Resultados y discusión

P42066	3.48	32.33	4.97	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [ATP] (PEP carboxykinase) (PEPCK) = <i>Cucumis sativus</i>
A9PGT2	0	27.46	0	Phosphoribulokinase = <i>Populus trichocarpa</i>
B9S8F8	0	7.97	0	ATP binding protein = <i>Ricinus communis</i>
B9SR58	0	12.10	0	Big map kinase/bmk = <i>Ricinus communis</i>
D7SK53	0	14.96	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
Q9XF95	0	19.92	0	Mitogen-activated protein kinase MAPK = <i>Prunus armeniaca</i>
D7TT82	14.15	9.43	57.38	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
A5BWT7	2.08	26.64	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
A8QYK9	48.67	85.61	13.90	Ethylene receptor, ETR2 = <i>Cucumis melo</i>
A5BEQ2	3.98	0	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
B9SUR2	4.65	0	0	Mitogen activated protein kinase kinase kinase 3, mapkkk3, mekk3 = <i>Ricinus communis</i>
B9SZM1	7.93	0	0	Protein kinase APK1A, chloroplast = <i>Ricinus communis</i>
Q42896	8.13	0	0	Fructokinase-2 = <i>Solanum lycopersicum</i>
B9RNW5	0	15.11	68.02	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase = <i>Ricinus communis</i>
B9RVE0	0	15.54	10.10	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase = <i>Ricinus communis</i>
B9S2B9	0	13.46	0	Protein kinase APK1B, chloroplast = <i>Ricinus communis</i>
B9SP66	0	16.22	0	Serine/threonine-protein kinase PBS1 = <i>Ricinus communis</i>
B9T2U0	0	12.50	0	Calcium-dependent protein kinase = <i>Ricinus communis</i>
B9T5H7	0	15.50	0	Serine/threonine protein kinase = <i>Ricinus communis</i>
D7KYV4	0	7.41	0	Kinase family protein = <i>Arabidopsis lyrata</i>
D7T9M5	0	5.38	3.76	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
D7TBN3	0	10.25	3.58	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
D7TUS1	0	11.45	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
A5C3G5	0	8.20	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
B9SUI6	0	18.13	0	Mevalonate kinase, putative (EC 2.7.1.36)
B9T2T2	0	7.28	0	Serine/threonine-protein kinase PBS1 = <i>Ricinus communis</i>
Q9ZST3	0	12.36	0	Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase beta subunit = <i>Citrus paradisi</i>
D7U4C1	0	8.72	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
D7U4E2	0	10.55	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
B9STP9	40.00	178.09	40.00	Serine-threonine kinase receptor-associated protein = <i>Ricinus communis</i>
B9S411	7.33	0	3.14	WD-repeat protein = <i>Ricinus communis</i>
D7TM75	7.02	0	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
Q56E62	15.76	0	0	Nucleoside diphosphate kinase 1 = <i>Nicotiana tabacum</i>
Q9LKJ2	5.81	0	0	Phosphoglycerate kinase = <i>Pisum sativum</i>
B9RTM1	7.63	57.67	16.11	Protein kinase atmrk1 = <i>Ricinus communis</i>
A5C4V0	0	15.31	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
A5CB35	0	15.39	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
B9RCG7	0	14.64	0	Big map kinase/bmk = <i>Ricinus communis</i>
C4P7W8	0	14.45	0	CBL-interacting protein kinase 19 = <i>Vitis vinifera</i>
D7T8U3	0	3.80	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
D7TNE7	0	11.78	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
A5AW40	0	10.69	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
A5AZP7	0	6.73	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
B7FLG3	0	12.00	0	Pyruvate kinase = <i>Medicago truncatula</i>
B9R7Y2	0	8.63	0	Inositol-pentakisphosphate 2-kinase = <i>Ricinus communis</i>

## Resultados y discusión

B9RQY5	0	13.39	17.85	Protein kinase APK1A, chloroplast = <i>Ricinus communis</i>
B9S8Q9	0	8.55	0	Kinase = <i>Ricinus communis</i>
B9T3P6	0	16.34	0	Protein kinase atn1 = <i>Ricinus communis</i>
B9RMT1	4.56	0	0	F-box and wd40 domain protein = <i>Ricinus communis</i>
B9S652	2.95	0	0	Serine/threonine protein kinase = <i>Ricinus communis</i>
Q9CAR7	6.99	0	0	Hypersensitive-induced response protein 2, HIR2 At1g69840 T17F3.13
Q9FM19	6.99	0	0	Hypersensitive-induced response protein 1, HIR1 P31 At5g62740 MQB2.6
Q9XGZ2	1.99	0	0	Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase, LRR-RLK At5g25930 AT5G25930 T1N24.22
B9T650	0	12.46	0	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase = <i>Ricinus communis</i>
D7KMK3	0	5.84	0	Kinase family protein = <i>Arabidopsis lyrata</i>
D7SIH7	0	13.16	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
Q6QLL5	0	7.58	0	WAK-like kinase = <i>Solanum lycopersicum</i>
B9SC81	9.31	5.58	0	ATP binding protein = <i>Ricinus communis</i>
A5AHG4	0	10.61	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
A5C8S4	0	4.86	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
B9HDG3	0	6.49	0	uncharacterized protein = <i>Populus trichocarpa</i>
B9REV1	0	4.36	0	Nucleotide binding protein = <i>Ricinus communis</i>
B9RMJ0	0	13.77	27.54	Adenylate kinase 1 = <i>Ricinus communis</i>
B9RYA6	0	8.63	0	Serine-threonine protein kinase = <i>Ricinus communis</i>
B9SC89	0	6.54	0	BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-associated receptor kinase 1 = <i>Ricinus communis</i>
B9SGT0	0	4.37	0	Sensory transduction histidine kinase = <i>Ricinus communis</i>
B9SQH2	0	3.17	1.26	Phytosulfokine receptor = <i>Ricinus communis</i>
B9SXH2	0	5.60	0	Kinase = <i>Ricinus communis</i>
B9T7T7	0	8.56	0	Protein kinase APK1B = <i>Ricinus communis</i>
D7SHT8	0	9.55	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
D7SLB5	0	2.43	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
D7SXG2	0	6.48	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
D7TZI8	0	4.70	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
D7U816	0	7.57	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
D7SNZ6	8.36	6.57	0	uncharacterized protein = <i>Vitis vinifera</i>
Q9LLT5	0	0	7.54	Receptor-like protein kinase, RLK = <i>Prunus dulcis</i>
B9HPN3	15.33	44.83	10.02	Calcium-dependent protein kinase, CPK6, ATCDPK3, ATCPK6 , AT2G17290
B9RL17	0	2.88	0	Calcium-dependent protein kinase, CPK2, ATCPK2 , AT3G10660
B9RNW5	0	15.11	68.02	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase, CIPK25, SnRK3.25, AT5G25110
B9RVE0	0	15.54	10.10	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase, CIPK11, PKS5, SIP4, SNRK3.22, AT2G30360
B9RVE7	0	5.10	0	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase, CIPK10, PKS2, SIP1, SNRK3.8m, AT5G58380
B9RW88	0	10.69	0	Calcium-dependent protein kinase, CPK4, ATCPK4 , AT4G09570
B9RXL5	5.44	20.56	0	Calcium-dependent protein kinase, CPK4, ATCPK4 , AT4G09570
B9S8J6	0	9.38	0	Calcium-dependent protein kinase, CPK4, ATCPK4, AT4G09570
B9S009	0	4.58	0	Calcium-dependent protein kinase, CIPK1, SnRK3.16, AT3G17510
B9SLE6	0	9.38	0	ATCDPK2, CPK11, ATCPK11, CDPK2, AT1G35670
B9SMX5	0	6.72	0	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase, CIPK8, SnRK3.13, PKS11, ATCIPK8, AT4G24400
B9SUF1	0	5.04	0	Calcium-dependent protein kinase, CPK32, ATCPK32, CDPK32, AT3G57530

## Resultados y discusión

<b>B9SWC3</b>	0	49.64	9.45	<b>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase, GRIK2, AT5G60550</b>
<b>B9T2U0</b>	0	12.50	0	<b>Calcium-dependent protein kinase, CPK33, AT1G50700</b>
<b>B9T650</b>	0	12.46	0	<b>CBL-interacting serine/threonine-protein kinase, CIPK10, PKS2, SIP1, SNRK3.8, AT5G58380</b>
<b>Q7XJR9</b>	0	2.91	0	<b>Calcium-dependent protein kinase, CPK16, AT2G17890</b>

Estos resultados demuestran la participación potencial de varias RLKs en la regulación de la abscisión de fruto maduro de melón. Además, se observó como un subconjunto de 181 genes que codifican fosfoproteínas modificaban su abundancia durante la abscisión de melón (tabla 14). Se encontraron similitudes entre los motivos quinasa en proteínas de respuesta a abscisión y caseína quinasas, proteínas quinasas shaggy-related, proteínas quinasas que interactúan con CBL, proteínas serin/treonin-quinasas que interactúan con CBL (CIPK), proteínas quinasas dependiente de calcio (CDPK,CPK), quinasa activada por mitógeno (MAP), proteína activada por mitógeno (MPK), quinasa asociada a pared (WAK), y receptor proteín quinasa S-locus-like, lo que indica una posible función crítica de estos tipos de quinasas en la regulación de la separación celular durante la abscisión de melón. La expresión de genes de caseína quinasas fue detectada mayormente en las células de la ZA laminar en hojas de cítricos durante la abscisión promovida por etileno (Agustí y cols., 2009). La participación de caseína quinasas en abscisión no ha sido documentada previamente, y por tanto, los mecanismos de regulación mediados por estas enzimas selectivas de serina/treonina permanecen desconocidos. Otras fosfoproteínas que median comunicación celular y percepción de señales a través de pared celular, tales como MAPK, WAK, y receptor quinasa rico en leucina, son inducidos a 38 DPA, lo que sugiere que podrían tener funciones reguladoras en tráfico macromolecular entre la pared y la membrana en la ZA de frutos durante la inducción temprana de la abscisión de melón. Un estudio previo ha mostrado que algunas proteínas MPKK o MEK, MKK4 y MKK5 están involucradas en la fase de separación celular del proceso de abscisión floral en Arabidopsis, pero no son necesarias para la formación de la ZA (Cho y cols., 2008). Por otro lado, los resultados también parecen reflejar diferencias en el transporte de la ZA durante la inducción temprana y tardía de la abscisión (Fig. 44); por ejemplo, el transporte temprano es realizado principalmente por la actividad génica de los transportadores de boro y nitrato y el transporte tardío por el transporte de fosfato, mientras que el transporte de sodio y calcio está asociado tanto con la inducción temprana como con la tardía de la abscisión de fruto maduro.

### 4.3.3. Caracterización de genes relacionados con fitohormonas

Muchas rutas de fitohormonas como las de etileno, auxina, ABA y JA están involucradas en procesos de abscisión (Gonzalez-Carranza y Roberts, 2012). En este estudio, de entre los 116 genes expresados diferencialmente ( $P < 0,01$ , grupo I) relacionados con el metabolismo y señalización de fitohormonas (tablas 15, 16 y 17), aquellos relacionados con etileno (28 genes) y ABA (23 genes) fueron los más representados, seguidos por aquellos relacionados con auxina (16 genes), JA (15 genes) y SA (12 genes). Se encontraron pocos genes relacionados con PAs (8), BR (7), CQ (4) o GAs (3). Los patrones de expresión dentro de estas rutas fueron analizados posteriormente mediante agrupamientos jerárquicos, mostrados en las figuras 37, 38, 39, 40, 41 y 42. La expresión diferencial está indicada por una escala de color que refleja el coeficiente de variación. Las figuras resultantes con rutas coloreadas indican supuestos nodos de regulación transcripcional, a través de los perfiles de las tres muestras.

**Tabla 15.** Genes relacionados con etileno o poliaminas inducidos o reprimidos en la ZA del fruto durante la abscisión de melón. La tabla muestra el conteo total de lecturas para cada gen tras la normalización (RPKMx1000) en las 3 muestras: (a) separación pre-celular de la ZA (36 DPA), (b) separación celular parcial de la ZA (38 DPA, inducción temprana de abscisión), (c) separación celular casi completa (40 DPA, inducción de abscisión tardía).

UniProt ID	36 DPA	38 DPA	40 DPA	Descripción
<b>Etileno</b>				
B9S1K1	0	17.29	0	S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase = <i>Ricinus communis</i>
A7Q0V4	23.01	138.10	74.16	S-adenosylmethionine synthase 5 (AdoMet synthase 5) (EC 2.5.1.6) (Methionine adenosyltransferase 5) = <i>Vitis vinifera</i>
B9I615	30.50	144.66	51.41	Methionine synthase 2 = <i>Populus trichocarpa</i>
A9P822	751.70	900.51	663.26	S-adenosylmethionine synthase 1 (AdoMet synthase 1) (EC 2.5.1.6) (Methionine adenosyltransferase 1) (MAT 1) = <i>Populus trichocarpa</i>
B9SBC0	9.63	128.51	11.24	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. ACS = <i>Ricinus communis</i>
Q45RS3	0	59.22	19.28	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. ACS = <i>Vitis vinifera</i>
B9RBW1	0	6.59	0	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase = <i>Ricinus communis</i>
O82123	0	10.14	0	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase ACS1 = <i>Cucumis sativus</i>
D7T1X0	0	3.77	0	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. ACS = <i>Vitis vinifera</i>
Q9LN15	0	0	4.97	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase ACS8 = <i>Arabidopsis thaliana</i> . T13M22.3
D7TZK0	11.06	48.40	27.66	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase = <i>Vitis vinifera</i>
B9H7C6	45.19	99.27	8.07	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase = <i>Populus trichocarpa</i>
C7U1K1	24.41	151.80	0	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase = <i>Cucumis sativus</i>
O48631	0	39.27	0	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase = <i>Prunus armeniaca</i>
Q04644	26.20	31.44	0	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 1 (ACC oxidase 1) (EC 1.14.17.4) (Ethylene-forming enzyme) (EFE) (PMEL1) = <i>Cucumis melo</i>
B9RTK2	236.66	356.66	196.66	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase . ACO = <i>Ricinus communis</i>
B9RYX6	16.37	0	8.67	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase = <i>Ricinus</i>

Resultados y discusión

				<i>communis</i>
Q9C5K7	10.84	0	0	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase 2. ACO2. At1g06640 F12K11.27 F12K11.6
B9RKA0	0	0	12.98	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase = <i>Ricinus communis</i>
Q9SSY6	0	33.78	0	Ethylene receptor 1 (EC 2.7.13.3) (CS-ETR1) = <i>Cucumis sativus</i>
A8QYK9	48.67	85.61	13.90	Ethylene receptor. ETR2 = <i>Cucumis melo</i>
D1M862	0	1.53	0	Ethylene insensitive 2. EIN2 = <i>Prunus persica</i>
Q948P4	10.10	41.36	11.06	CmEIL1 = <i>Cucumis melo</i>
Q948P3	3.25	10.84	7.04	CmEIL2 = <i>Cucumis melo</i>
Q70AB2	0	5.29	0	Ethylene transcription factor. ERF1 = <i>Fagus sylvatica</i>
Q3L0R1	6.83	10.25	0	Ethylene-responsive element binding protein ERF2 = <i>Gossypium hirsutum</i>
Q2I2S8	230.88	821.10	62.69	Ethylene-responsive element-binding protein. ERF-6 = <i>Medicago truncatula</i>
D8VD38	0	1680.00	0	Ethylene response factor 11. ERF-11 = <i>Actinidia deliciosa</i>
Q8GWK2	0	3.11	0	AP2-like ethylene-responsive transcription factor At2g41710
Q9LTC4	0	22.22	0	MYB transcription factor 15. At3g23250
Q38950	4.54	31.80	0	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform (AtA beta) (PP2A. subunit A. beta) isoform). PP2AA2 DF1 At3g25800
P28186	72.53	103.39	15.43	Ras-related protein ARA-3. ARA-3. At3g46060 F12M12.30
Q6NPP4	1.90	6.03	4.21	Calmodulin-binding transcription activator 2 (Ethylene-induced calmodulin-binding protein c) (AtER66) (EICBP.c) (Signal-responsive protein 4). CMTA2 SR4 At5g64220 MSJ1.6
B9RYX6	16.37	0	8.67	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase. putative (EC 1.14.11.9) = <i>Ricinus communis</i>
Q9C5K7	10.84	0	0	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 2. At1g06640 F12K11.27 F12K11.6
Q7GC82	19.88	5.75	5.75	Cm-ERS1 protein (Ethylene receptor) = <i>Cucumis melo</i>
Q5S004	579.94	192.41	75.88	Ethylene response factor 1. ERF1 = <i>Cucumis sativus</i>
B9S948	55.87	40.46	0	Ethylene-responsive transcription factor ERF. putative = <i>Ricinus communis</i>
B9SZX0	49.10	0	0	Ethylene-responsive transcription factor ERF1B. putative = <i>Ricinus communis</i>
B9STH2	8.83	0	0	Ethylene-responsive transcription factor. putative = <i>Ricinus communis</i>
Q38882	4.52	0	0	Phospholipase D alpha 1 (AtPLDalpha1) (PLD alpha 1) (EC 3.1.4.4) (Choline phosphatase 1) (PLDalpha) (Phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase D 1). PLD1 ALPHA1 PLD1 At3g15730 MSJ11.13
Q6V5J8	79.28	45.30	22.65	AP2 transcription factor/ethylene response element = <i>Brassica oleracea</i>
B9T6G3	55.34	15.44	27.02	ERF/AP2 domain transcription factor RAP2.3. putative = <i>Ricinus communis</i>
Q9AYR8	68.96	19.70	0	Putative MADS-box protein. ERAF17 = <i>Cucumis sativus</i>
B9STH2	8.83	0	0	Ethylene-responsive transcription factor. putative = <i>Ricinus communis</i>
Q9FHW7	25.34	0	38.98	SKP1-like protein 1B (SKP1-like 2) (UFO-binding protein 2). SKP1B ASK2 UIP2 At5g42190 MJC20.30
<b>Poliaminas</b>				
B3Y023	38.16	227.12	57.01	Arginine decarboxylase (EC 4.1.1.19) = <i>Prunus persica</i>
B9SIY7	35.28	437.32	51.99	S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme (EC 4.1.1.50) = <i>Ricinus communis</i>
Q6KC47	18.33	207.11	0	S-adenosylmethionine decarboxylase (Fragment) = <i>Prunus persica</i>
Q9ZUB3	21.95	30.93	8.98	Spermidine synthase 1 (SPDSY 1) (EC 2.5.1.16) = SPDSYN1 At1g23820 F508.38
Q5F307	15.08	0	0	Arginine decarboxylase (EC 4.1.1.19). ADC1 = <i>Solanum lycopersicum</i>
B9MYV7	15.50	0	7.75	N-carbamoylputrescine amidase = <i>Populus trichocarpa</i>
A5BHF8	74.54	68.15	21.29	Spermidine/spermine synthase family = <i>Vitis vinifera</i>
B9RIK2	7.24	0	0	Spermidine synthase 1 = <i>Ricinus communis</i>

## Resultados y discusión

**Tabla 16.** Genes relacionados con auxina y ABA inducidos o reprimidos en la ZA del fruto durante la abscisión de melón. La tabla muestra el conteo total de lecturas para cada gen tras la normalización (RPKMx1000) en las 3 muestras: (a) separación pre-celular de la ZA (36 DPA), (b) separación celular parcial de la ZA(38 DPA, inducción temprana de abscisión), (c) separación celular casi completa (40 DPA, inducción de abscisión tardía).

UniProt ID	36 DPA	38 DPA	40 DPA	Descripción
<b>Auxina</b>				
D7SQJ6	0	20.75	0	Tryptophan synthase = <i>Vitis vinifera</i>
B9T4Y7	0	2.85	0	Aldehyde dehydrogenase = <i>Ricinus communis</i>
B9S6G9	0	12.21	6.78	Amine oxidase = <i>Ricinus communis</i>
B9GVN2	0	15.98	0	Iaa-amino acid hydrolase 11 = <i>Populus trichocarpa</i>
O04951	0	70.57	0	Serine/threonine-protein phosphatase PP2A-5 catalytic subunit (EC 3.1.3.16) (Protein phosphatase 2A isoform 5). PP2A5 At1g69960 F20P5.30 T17F3.1. Regulation of auxin polar transport
Q2UZS4	0	12.08	0	Auxin influx carrier-like protein 3. AUX1/ AIC3 = <i>Momordica charantia</i>
B8Y9B4	0	16.98	8.78	Transport inhibitor response protein. TIR1. auxin receptor = <i>Poncirus trifoliata</i>
Q9SSY2	17.84	92.01	96.71	Aux/IAA protein. CsIAA2 = <i>Cucumis sativus</i>
D7U0A4	0	10.98	0	Aux/IAA protein = <i>Vitis vinifera</i>
Q94JM3	0	2.32	0	Auxin response factor 2 (ARF1-binding protein) (ARF1-BP) (Protein MEGAINTEGUMENTA). ARF2 MNT At5g62000 MTG10.3
Q6L8U3	0	1.23	0	Auxin response factor 1. CsARF1 = <i>Cucumis sativus</i>
Q6L8U1	0	2.18	0	Auxin response factor 3. CsARF3 = <i>Cucumis sativus</i>
D7UCV0	0	3.84	0	Auxin response factor. ARF = <i>Vitis vinifera</i>
D7SMW0	0	3.11	0	Auxin response factor. ARF = <i>Vitis vinifera</i>
B9RA75	0	5.13	0	Auxin response factor. putative = <i>Ricinus communis</i>
B9IBX4	0	35.29	11.76	SAUR family protein. SAUR21 = <i>Populus trichocarpa</i>
O81829	0	10.89	0	Indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.5 (EC 6.3.2.-) (Auxin-responsive GH3-like protein 5) (AtGH3-5). GH3.5 At4g27260 M4I22.70
O82333	0	14.12	0	indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.1 (EC 6.3.2.-) (Auxin-responsive GH3-like protein 1) (AtGH3-1). GH3.1 At2g14960 T26I20.12
B9RUC8	0	18.88	0	Auxin-induced protein 5NG4. putative = <i>Ricinus communis</i>
B9T181	6.92	59.74	5.19	Auxin-induced in root cultures protein 12. putative = <i>Ricinus communis</i>
B9T5V3	0	19.60	19.60	Auxin-induced protein 5NG4. putative = <i>Ricinus communis</i>
D1MWZ6	427.77	494.44	308.33	Auxin-repressed protein. CitAuR = <i>Citrullus lanatus</i>
Q9LTC4	0	22.22	0	MYB transcription factor. At3g23250
Q71T11	3.68	0	0	Auxin efflux carrier. AEC3 = <i>Momordica charantia</i>
D7KJ74	18.99	0	0	Auxin efflux carrier family protein . ARALYDRAFT_313001 = <i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>Lyrata</i>
A9PH58	20.16	12.09	0	Aux/IAA protein = <i>Populus trichocarpa</i>
B9RTF5	20.94	0	0	Aux/IAA protein. IAA4= <i>Ricinus communis</i>
D7TBU1	12.34	0	0	Aux/IAA protein = <i>Vitis vinifera</i>
D7U0G0	13.69	0	5.70	Aux/IAA protein = <i>Vitis vinifera</i>
A4PSF1	1.99	0	0	Auxin response factor ARF: Transcriptional factor B3 = <i>Medicago truncatula</i>
Q03666	78.43	42.23	95.02	Glutathione S-transferase (EC 2.5.1.18) (Auxin-induced protein PCNT107) = <i>Nicotiana tabacum</i>
Q940X7	121.46	107.34	45.19	RING-box protein 1a (At-Rbx1;1) (Protein RING of cullins 1) (RBX1-2) (RBX1a-At). Cul3-RING ubiquitin ligase complex (SCF ubiquitin ligase complex). RBX1A ROC1 At5g20570 F7C8.160
Q9FHW7	25.34	0	38.98	SKP1-like protein 1B (SKP1-like 2) (UFO-binding protein 2). Ubl conjugation pathway. SKP1B ASK2 UIP2 At5g42190 MJC20.30
O04331	27.67	10.83	21.66	Prohibitin (Prohibitin 3). Atphb3 At5g40770/K1B16.2 At5g40770

Resultados y discusión

D7U0G0	13.69	0	5.70	Aux/IAA protein = <i>Vitis vinifera</i>
<b>ABA</b>				
B9RZD3	0	27.89	0	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase. putative (EC 1.17.1.2) . IspH = <i>Ricinus communis</i>
A8WBX7	0	3.15	0	Mevalonate diphosphate decarboxylase. MDC = <i>Solanum lycopersicum</i>
Q8RVK7	10.72	29.23	6.82	Farnesyl pyrophosphate synthase. FPPS = <i>Malus domestica</i>
D7U5I9	5.64	10.49	0	Farnesyl-diphosphate farnesyltransferase = <i>Vitis vinifera</i>
Q94ID7	0	10.81	0	Geranylgeranyl pyrophosphate synthase. chloroplastic (GGPP synthase) = <i>Hevea brasiliensis</i>
P49293	0	41.86	0	Phytoene synthase. chloroplastic (EC 2.5.1.32) (MEL5). PSY = <i>Cucumis melo</i>
D3JN88	0	39.27	5.30	Beta-carotene hydroxylase. Crtr-b2 = <i>Solanum phureja x Solanum tuberosum</i>
O81360	0	9.07	0	Zeaxanthin epoxidase. chloroplastic (EC 1.14.13.90) (PA-ZE) = <i>Prunus armeniaca</i>
B9S0Z6	0	40.08	0	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase. putative = <i>Ricinus communis</i>
Q9M6E8	0	4.87	0	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase NCED1. chloroplastic (EC 1.13.11.51) (PvNCED1). NCED1 = <i>Phaseolus vulgaris</i>
A0SE37	0	4.95	0	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 3. NCED3 = <i>Citrus clementina</i>
A0SE34	0	5.47	0	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 5. NCED5 = <i>Citrus clementina</i>
B9SBK0	0	21.50	0	Absciscic acid receptor PYR/PYL = <i>Ricinus communis</i>
B9ILA9	0	26.25	0	Protein phpsphatase 2C (PP2C) = <i>Populus trichocarpa</i>
B9R8Q9	0	16.36	0	Protein phpsphatase 2C (PP2C) = <i>Ricinus communis</i>
B9S5C5	0	16.84	0	Protein phpsphatase 2C (PP2C) = <i>Ricinus communis</i>
B9S5U9	0	25.49	0	Protein phpsphatase 2C (PP2C) = <i>Ricinus communis</i>
B9RIK1	0	3.78	0	Protein phpsphatase 2C (PP2C) = <i>Ricinus communis</i>
B9RNW5	0	15.11	68.02	SnRK2 putative = <i>Ricinus communis</i>
B9RVE0	0	15.54	10.10	SnRK2 putative = <i>Ricinus communis</i>
B9T650	0	12.46	0	SnRK2 putative = <i>Ricinus communis</i>
B9RPF8	0	95.23	11.20	Absciscic acid-insensitive 5-like protein 6. ABF3= <i>Ricinus communis</i>
Q8RXD3	0	7.52	0	E3 ubiquitin-protein ligase AIP2 (EC 6.3.2.-) (ABI3-interacting protein 2). AIP2 At5g20910 F22D1.80
Q38913	25.02	115.28	403.93	Extensin-1 (AtExt1) (AtExt4). EXT1 EXT4 At1g76930 F22K20.3
Q43133	9.10	0	0	Geranylgeranyl pyrophosphate synthase. chloroplastic/chromoplastic (GGPP synthase) (GGPS) = <i>Sinapis alba</i>
B9S473	12.75	0	0	Absciscic acid receptor PYR/PYL = <i>Ricinus communis</i>
Q9M3V1	6.45	0	13.72	Protein phpsphatase 2C (PP2C) (EC 3.1.3.16). pp2C1 = <i>Fagus sylvatica</i>
B9RNU7	5.54	0	0	Protein phpsphatase 2C (PP2C) = <i>Ricinus communis</i>
Q38882	4.52	0	0	Phospholipase D alpha 1 (AtPLDalpha1) (PLD alpha 1) (EC 3.1.4.4) (Choline phosphatase 1) (PLDalpha) (Phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase D 1). PLDALPHA1 PLD1 At3g15730 MSJ11.13
Q93VD6	80.35	0	0	Absciscic acid response protein Asr1 = <i>Cucumis melo</i>
O04331	27.67	10.83	21.66	Prohibitin (Prohibitin 3). Atphb3 At5g40770/K1B16.2 At5g40770
Q9M3V1	6.45	0	13.72	Protein phpsphatase 2C (PP2C) (EC 3.1.3.16). pp2C1 = <i>Fagus sylvatica</i>
B9RNW5	0	15.11	68.02	SnRK2 putative = <i>Ricinus communis</i>
P18064	0	0	22.62	Guanine nucleotide-binding protein alpha-1 subunit (GP-alpha-1). GPA1 At2g26300 T1D16.6

## Resultados y discusión

**Tabla 17.** Genes relacionados con GA, BR, CK, JA y SA inducidos o reprimidos en la ZA del fruto durante la abscisión de melón. La tabla muestra el conteo total de lecturas para cada gen tras la normalización (RPKMx1000) en las 3 muestras: (a) separación pre-celular de la ZA (36 DPA), (b) separación celular parcial de la ZA (38 DPA, inducción temprana de abscisión), (c) separación celular casi completa (40 DPA, inducción de abscisión tardía).

UniProt ID	36 DPA	38 DPA	40 DPA	Descripción
<b>BR</b>				
B9RLU0	0	24.56	9.09	Brassinosteroid LRR receptor kinase. putative. BRI1 = <i>Ricinus communis</i>
B9RUI5	0	13.84	4.42	BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-associated receptor kinase 1. putative. BAK1 = <i>Ricinus communis</i>
B9SC89	0	6.54	0	BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-associated receptor kinase 1. putative. BAK1 = <i>Ricinus communis</i>
Q9LR78	0	8.82	0	Serine/threonine-protein phosphatase BSU1 (Bri1 suppressor protein 1). BSU1 At1g03445 At1g03450 F21B7.7
Q9ZV88	0	19.48	0	BES1/BZR1 homolog protein 4. BEH4 At1g78700 F9K20.26
B9SGI1	7.36	12.61	0	BRASSINAZOLE-RESISTANT 1 protein. putative. BZR1 = <i>Ricinus communis</i>
C0IRH2	0	46.60	0	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 13 = <i>Actinidia deliciosa</i>
Q06BI5	26.71	0	0	Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 2. XTH2 = <i>Cucumis melo</i>
Q8GUQ5	0	0	1.93	Brassinosteroid LRR receptor kinase (EC 2.7.11.1) (Altered brassinolide sensitivity 1) (Systemin receptor SR160) (tBRI1) . CURL3 = <i>Solanum lycopersicum</i>
<b>JA</b>				
B9R7M7	0	7.07	0	Cytochrome P450. putative (EC 4.2.1.92) = <i>Ricinus communis</i>
B9SK95	25.00	32.40	30.55	12-oxophytodienoate reductase opr. putative (EC 1.3.1.42) = <i>Ricinus communis</i>
B9T1J4	0	7.57	0	Acyl-CoA dehydrogenase. putative (EC 1.3.3.6) = <i>Ricinus communis</i>
O65201	0	3.37	0	Acyl-coenzyme A oxidase 2, peroxisomal (AOX 2) (EC 1.3.3.6) (Long-chain acyl-CoA oxidase) (AtCX2). ACX2 At5g65110 MQN23.4
O65202	0	6.02	0	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1 (AOX 1) (EC 1.3.3.6) (Long-chain acyl-CoA oxidase) (AtCX1). ACX1 At4g16760 dl4405c FCAALL.119
B9RKN5	11.97	58.47	12.98	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. putative (EC 5.1.2.3) = <i>Ricinus communis</i>
B9RWL7	26.81	172.46	24.63	3-ketoacyl-CoA thiolase B. putative (EC 2.3.1.16) = <i>Ricinus communis</i>
Q56WD9	0	56.27	14.43	3-ketoacyl-CoA thiolase 2, peroxisomal (EC 2.3.1.16) (Acetyl-CoA acyltransferase 2) (Beta-ketothiolase 2) (Peroxisomal 3-oxoacyl-CoA thiolase 2) (Peroxisome defective protein 1). PED1 KAT2 At2g33150 F25I18.11
B0VXR3	0	6.32	0	JAR1-like protein. JAR6 = <i>Nicotiana attenuate</i>
D8V3L7	0	31.69	11.73	Plastid jasmonates ZIM-domain protein. JAZ putative = <i>Hevea brasiliensis</i>
B9S1E9	0	14.58	0	Transcription factor AtMYC2. putative (EC 1.3.1.74) = <i>Ricinus communis</i>
Q9LTC4	0	22.22	0	At3g23250 (MYB transcription factor 15)
Q38913	25.02	115.28	403.93	Extensin-1 (AtExt1) (AtExt4). EXT1 EXT4 At1g76930 F22K20.3
O22287	19.39	55.40	18.46	At2g39770/T5I7.7 (CYT1 protein) (GDP-mannose pyrophosphorylase) (Putative GDP-mannose pyrophosphorylase). cyt1 GMP1 At2g39770
B9S554	4.28	0	0	3-ketoacyl-CoA thiolase B. putative (EC 2.3.1.16) = <i>Ricinus communis</i>
B9ST81	74.34	61.95	14.86	Jasmonate ZIM domain-containing protein. JAZ putative = <i>Ricinus communis</i>
O80575	14.68	4.40	0	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase, chloroplast (DMRL synthase) (Lumazine synthase) (EC 2.5.1.9)



Resultados y discusión

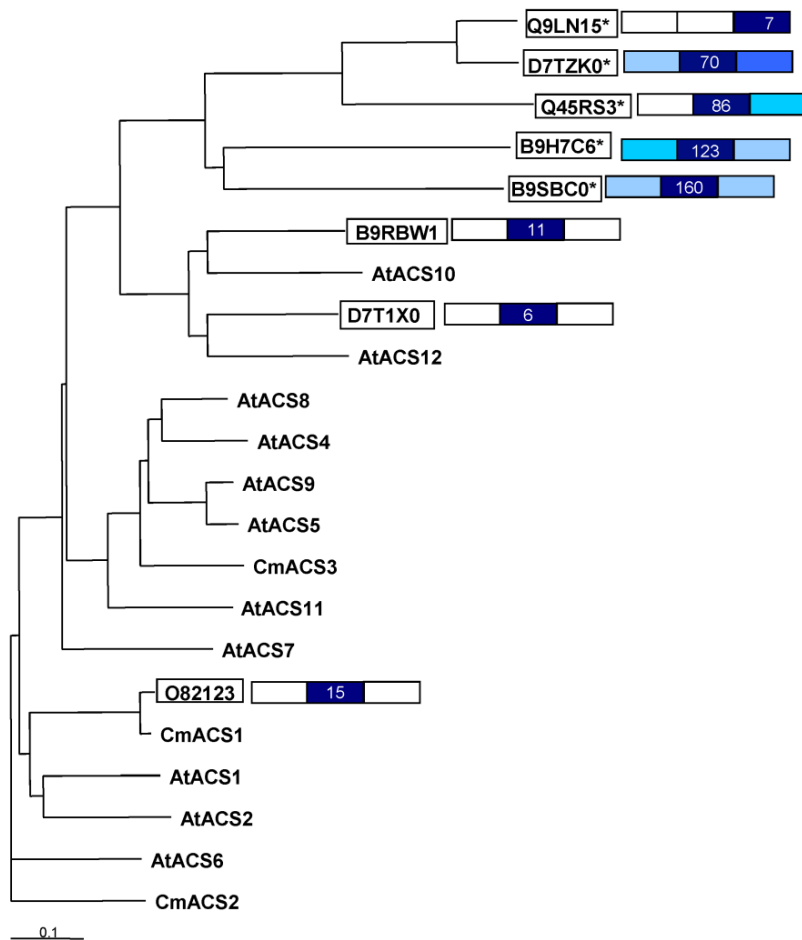
O04331	27.67	10.83	21.66	Prohibitin (Prohibitin 3). Atphb3 At5g40770/K1B16.2 At5g40770
Q9FNX8	0	0	1.79	Lipoxygenase 4. chloroplastic (AtLOX4) (EC 1.13.11.12) (LOX3-like protein). LOX4 LOX3 At1g72520 F28P22.29 T10D10.1
P43255	0	0	21.99	COP9 signalosome complex subunit 8 (CSN complex subunit 8) (Constitutive photomorphogenesis protein 9) (Protein FUSCA 7). CSN8 COP9 FUS7 At4g14110 d13095c
O49538	0	0	4.45	At5g65790 (MYB transcription factor 68) (Myb - related protein) (Transcription factor-like protein). F6H11.100 At5g65790
O04331	27.67	10.83	21.66	Prohibitin (Prohibitin 3). Atphb3 At5g40770/K1B16.2 At5g40770
B9R7M7	0	7.07	0	Cytochrome P450. putative (EC 4.2.1.92) = <i>Ricinus communis</i>
B9T1J4	0	7.57	0	Acyl-CoA dehydrogenase. putative (EC 1.3.3.6) = <i>Ricinus communis</i>
O65201	0	3.37	0	Acyl-coenzyme A oxidase 2. peroxisomal (AOX 2) (EC 1.3.3.6) (Long-chain acyl-CoA oxidase) (AtCX2). ACX2 At5g65110 MQN23.4
O65202	0	6.02	0	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1 (AOX 1) (EC 1.3.3.6) (Long-chain acyl-CoA oxidase) (AtCX1). ACX1 At4g16760 d14405c FCAALL.119
B9RKN5	11.97	58.47	12.89	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. putative (EC 5.1.2.3) = <i>Ricinus communis</i>
B9RWL7	26.81	172.46	24.63	3-ketoacyl-CoA thiolase B. putative (EC 2.3.1.16) = <i>Ricinus communis</i>
B9ST81	74.34	61.95	14.86	Jasmonate ZIM domain-containing protein. JAZ putative = <i>Ricinus communis</i>
D8V3L7	0	31.69	11.73	Plastid jasmonates ZIM-domain protein. JAZ putative = <i>Hevea brasiliensis</i>
B9S1E9	0	14.58	0	Transcription factor AtMYC2. putative (EC 1.3.1.74) = <i>Ricinus communis</i>
Q9LTC4	0	22.22	0	At3g23250 (MYB transcription factor 15)
O22287	19.39	55.40	18.46	At2g39770/T5I7.7 (CYT1 protein) (GDP-mannose pyrophosphorylase) (Putative GDP-mannose pyrophosphorylase). cyt1 GMP1 At2g39770
SA				
C5IJB4	10.14	0	0	Phenylalanine ammonia-lyase. PAL = <i>Litchi chinensis</i>
O04331	27.67	10.83	21.66	Prohibitin (Prohibitin 3). Atphb3 At5g40770/K1B16.2 At5g40770
A5BPT8	0	114.83	0	Phenylalanine ammonia-lyase. PAL = <i>Vitis vinifera</i>
A5YMH3	0	97.95	0	Phenylalanine ammonia-lyase. PAL = <i>Astragalus penduliflorus</i>
B9S0K2	0	485.52	111.11	Phenylalanine ammonia-lyase. PAL = <i>Ricinus communis</i>
O64963	0	85.54	0	Phenylalanine ammonia-lyase. PAL1 = <i>Prunus avium</i>
B9S3I0	0	3.95	0	Regulatory protein NPR1. putative = <i>Ricinus communis</i>
B9S7U9	37.26	18935.8 1	548.65	STS14 protein. putative (PR-1) = <i>Ricinus communis</i>
Q38913	25.02	115.28	403.93	Extensin-1 (AtExt1) (AtExt4). EXT1 EXT4 At1g76930 F22K20.3
Q3E919	0	0	5.92	At5g26920
Q9M6E7	0	0	10.16	UDP-glucose:salicylic acid glucosyltransferase. SA-GTase = <i>Nicotiana tabacum</i>
O49538	0	0	4.45	At5g65790 (MYB transcription factor 68) (Myb - related protein). F6H11.100 At5g65790
O04331	27.67	10.83	21.66	Prohibitin (Prohibitin 3). Atphb3 At5g40770/K1B16.2 At5g40770
Q38913	25.02	115.28	403.93	Extensin-1 (AtExt1) (AtExt4). EXT1 EXT4 At1g76930 F22K20.3
A5BPT8	0	114.83	0	Phenylalanine ammonia-lyase. PAL = <i>Vitis vinifera</i>
A5YMH3	0	97.95	0	Phenylalanine ammonia-lyase. PAL = <i>Astragalus penduliflorus</i>

## Resultados y discusión

<b>B9S0K2</b>	0	485.52	111.11	<b>Phenylalanine ammonia-lyase. PAL = <i>Ricinus communis</i></b>
<b>O64963</b>	0	85.54	0	<b>Phenylalanine ammonia-lyase. PAL1 = <i>Prunus avium</i></b>
<b>P45732</b>	0	133.79	30.30	<b>Phenylalanine ammonia-lyase. PAL17.1 = <i>Stylosanthes humilis</i></b>
<b>B9S3I0</b>	0	3.95	0	<b>Regulatory protein NPR1. putative = <i>Ricinus communis</i></b>
<b>B9S7U9</b>	37.26	18935.8 1	548.65	<b>STS14 protein. putative (PR-1) = <i>Ricinus communis</i></b>
<b>CQ</b>				
<b>B9RK75</b>	0	13.86	0	<b>Gulonolactone oxidase. putative (EC 1.5.99.12) = <i>Ricinus communis</i></b>
<b>Q0WR65</b>	0	10.25	0	<b>Cytokinin oxidase-like protein. At3g63440</b>
<b>D7TAZ7</b>	0	1.92	0	<b>Histidine kinase 2/3/4 (cytokinin receptor). HK putative = <i>Vitis vinifera</i></b>
<b>B9RMD2</b>	0	2.98	0	<b>Histidine kinase 2/3/4 (cytokinin receptor). HK putative = <i>Ricinus communis</i></b>
<b>B9RSW5</b>	47.61	75.75	19.48	<b>Histidine-containing phosphotransfer protein. AHP putative = <i>Ricinus communis</i></b>
<b>B9RMP7</b>	0	3.42	0	<b>Two-component sensor histidine kinase bacteria. putative. two-component response regulator ARR-B family = <i>Ricinus communis</i></b>
<b>D7TTG7</b>	0	90.36	0	<b>Two-component sensor histidine kinase bacteria. putative. two-component response regulator ARR-B family = <i>Vitis vinifera</i></b>
<b>Q8RUN2</b>	12.51	0	0	<b>Cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase LOG1 (EC 3.2.2.n1) (Protein LONELY GUY 1). LOG1 At2g28305 T1B3.18 T3B23.2</b>
<b>GA</b>				
<b>B9RZI6</b>	0	55.87	0	<b>Gibberellin 20 oxidase. putative (EC 1.14.11.11) = <i>Ricinus communis</i></b>
<b>B9T711</b>	0	2.93	0	<b>DELLA protein GAI. putative = <i>Ricinus communis</i></b>
<b>B9SP75</b>	11.49	19.15	6.02	<b>DELLA protein GAIP-B. putative = <i>Ricinus communis</i></b>
<b>B9RIU5</b>	3.25	24.39	7.58	<b>DELLA protein GAI. putative = <i>Ricinus communis</i></b>

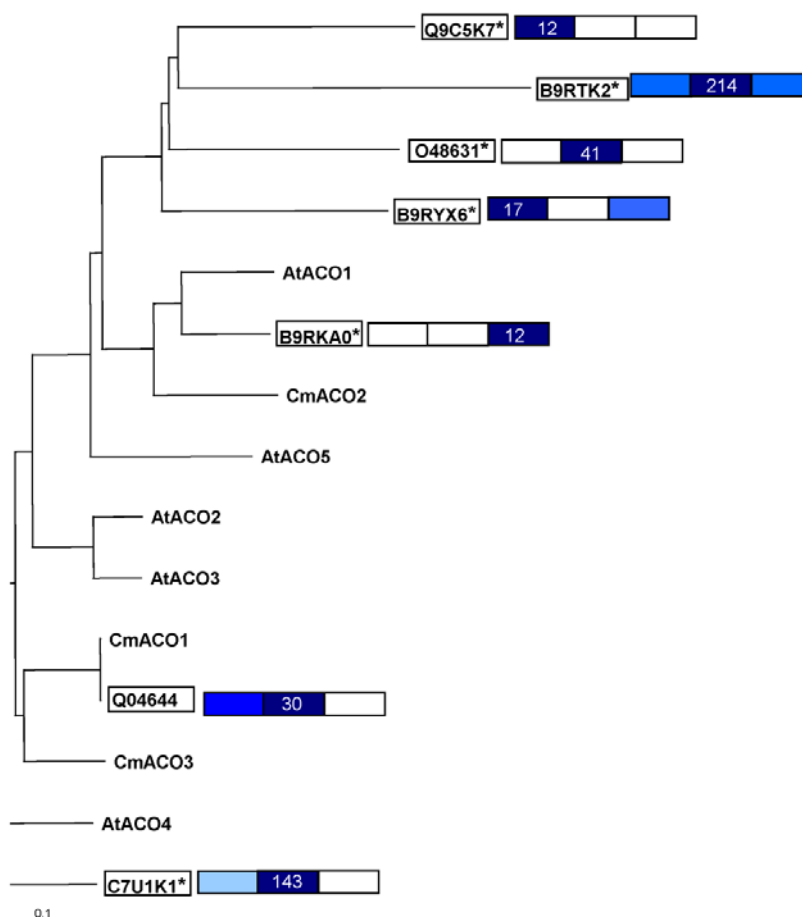
Ambas etapas en la inducción de la abscisión, temprana y tardía, en la ZA de melón, están caracterizadas aparentemente por una biosíntesis y señalización activa de etileno y ABA, aunque en la inducción temprana la expresión de más genes de respuesta a etileno o ABA se vio afectada en comparación a la fase tardía de la abscisión. En particular, dos genes diferentes de S-adenosilmetionina sintasa (*SAMS*: *SAMS1* y *SAMS5*), cuatro genes diferentes de *ACS* (Fig. 34), tres genes diferentes de *ACO* (Fig. 35), un gen *ETR1*, un gen *ETR2*, y dos genes diferentes *ERF* (*ERF*, *ERF11*) aumentaron durante la inducción temprana de la abscisión (cluster B) (Fig. 37), mientras que un gen de metionina sintasa 2, dos genes diferentes *ACS*, un gen *ACO* y dos genes *ERF* (*ERF6*, *ERF14*) aumentaron durante la inducción tardía de la abscisión (cluster C) (Fig. 37). Por tanto, parece que *ETR1*, *ETR2*, and *ERF11* están involucrados en la inducción temprana de la abscisión, mientras que *ERF6* y *ERF14* están involucrados en la inducción tardía de la abscisión de melón.

La aproximación basada en pirosecuenciación permitió la identificación de 24 secuencias que contenían el dominio AP2, y fueron retenidas para análisis filogenéticos posteriores (Fig. 36).



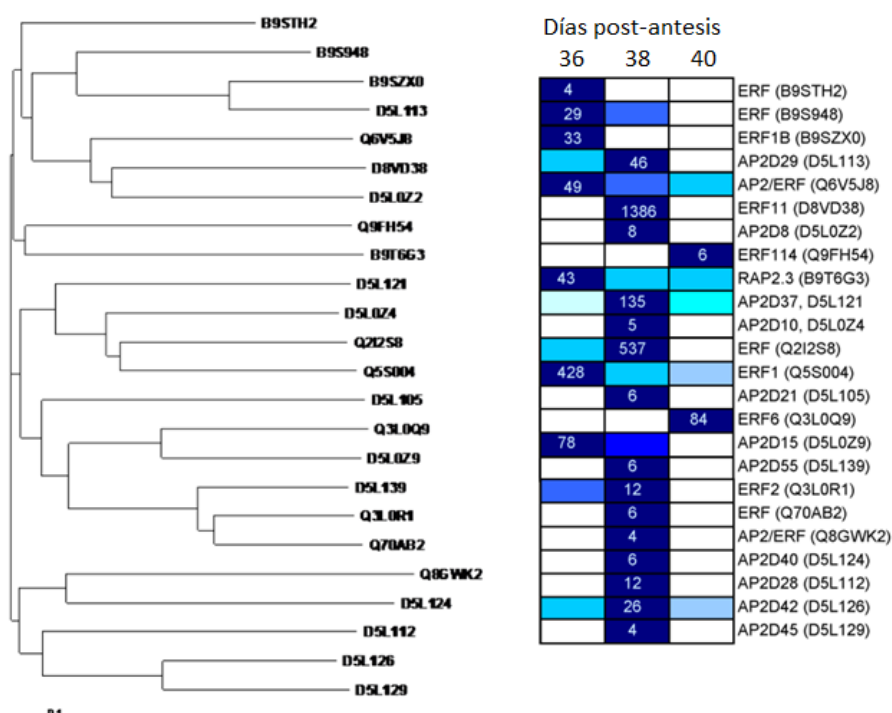
**Figura 34.** Análisis filogenético de ACS de melón con otros genes ACS. Las secuencias incluidas en este alineamiento son de melón (Cucurbit Genomics Database; <http://www.icugi.org/cgi-bin/ICuGI/EST/home.cgi?organism = melon>), y arabisopsis (<http://www.arabidopsis.org/>). Las proteínas ACS estudiadas de nuestro trabajo están adjuntas en una caja abierta. Las IDs UniProt seguidas por asteriscos indican transcritos que muestran variaciones significantes durante abscisión (grupo I). Los niveles de expresión génica a 36, 38 y 40 DPA se indican con barras de colores. Para la muestra que presenta el nivel máximo de expresión, la abundancia de transcritos normalizada se expresa como el número de transcritos por total de transcritos. Para las otras muestras, el nivel de expresión se indica como porcentajes de la máxima abundancia de transcritos normalizada del gen, como se describe en el código de colores desde 0% (blanco) a 100% (azul oscuro).

Basado en su patrón de expresión, el cual era alto en la ZA a una separación celular parcial, *ERF11* puede ser considerado un buen candidato para codificar un ERF involucrado en la regulación de la abscisión del fruto maduro. En contraste, ha sido descubierto que otros genes relacionados con la señalización de etileno, tales como *EIL2* (*EIN3-like*, *EIL*), están involucrados en la abscisión de fruto maduro de olivo (Parra-Lobato y Gomez-Jimenez, 2011), mientras que ha sido demostrado que *ETR4* y *CTR1* participan en las etapas tardías de la abscisión floral de tomate (Botton y cols., 2003). En este estudio, el aumento de genes que codifican componentes de biosíntesis y señalización de etileno antes de producirse la separación celular es consistente con los informes previos que describen que la abscisión de manzana está precedida por un incremento en la biosíntesis y sensibilidad a etileno (Zhu y cols., 2011).



**Figura 35.** Análisis filogenético de *ACO* de melón con otros genes *ACO*. Las secuencias incluidas en este alineamiento son de melón (Cucurbit Genomics Database; <http://www.icugi.org/cgi-bin/ICuGI/EST/home.cgi?organism = melon>), y arabisopsis (<http://www.arabidopsis.org/>). Las proteínas *ACO* estudiadas de nuestro trabajo están adjuntas en una caja abierta. Las IDs UniProt seguidas por asteriscos indican transcritos que muestran variaciones significantes durante abscisión (grupo I). Los niveles de expresión génica a 36, 38 y 40 DPA se indican con barras de colores. Para la muestra que presenta el nivel máximo de expresión, la abundancia de transcritos normalizada se expresa como el número de transcritos por total de transcritos. Para las otras muestras, el nivel de expresión se indica como porcentajes de la máxima abundancia de transcritos normalizada del gen, como se describe en el código de colores desde 0% (blanco) a 100% (azul oscuro)

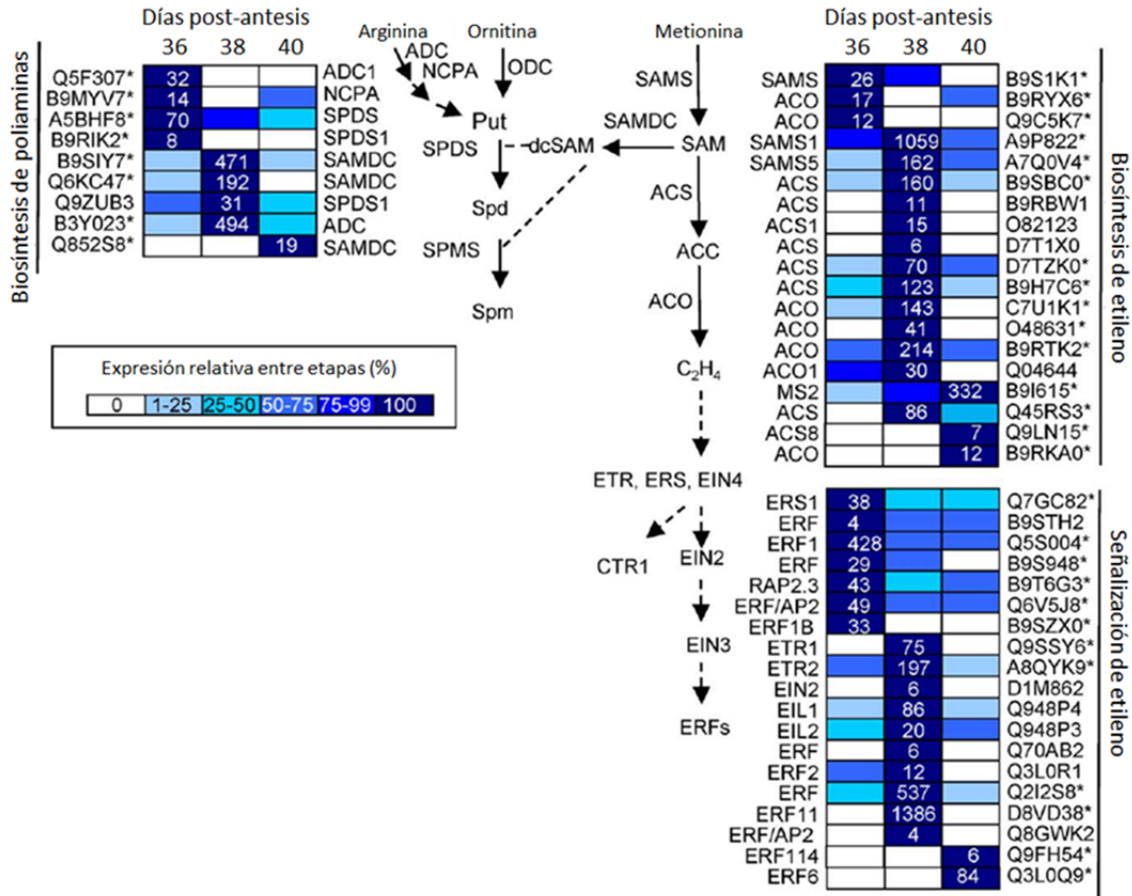
También fue observada la represión de genes relacionados con la biosíntesis y respuesta de etileno en la ZA de melón durante la abscisión (cluster A) (Fig. 37) un gen de SAMS, dos ACO, un ERS1, y cinco ERF (ERF1, ERF1B, ERF, ERF/RAP2.3 ERF/AP2). Ha sido demostrado que la mayoría de los ERFs encontrados en la ZA están inducidos por abscisión o tratamiento con etileno, incluyendo ERF1 y ERF2 de cítricos (Agustí y cols., 2009), ERF de manzana (Botton y cols., 2011), y ERF1b, ERF1c, ERF2 y ERF3 de tomate (Meir y cols., 2010). Sin embargo, la disminución de expresión de ERF1 y ERF1B en melón está probablemente asociada con la inducción temprana de la abscisión de melón.



**Figura 36.** Análisis filogenético de ERF de melón con otros genes AP2/ERF. Las secuencias incluidas en este alineamiento proceden de nuestro trabajo. Los niveles de expresión génica a 36, 38 y 40 DPA se indican con barras de colores. Para la muestra que presenta el nivel máximo de expresión, la abundancia de transcritos normalizada se expresa como el número de transcritos por total de transcritos. Para las otras muestras, el nivel de expresión se indica como porcentajes de la máxima abundancia de transcritos normalizada del gen, como se describe en el código de colores desde 0% (blanco) a 100% (azul oscuro)

Además, genes clave relacionados con la biosíntesis de PAs, incluyendo ADC, NCPA, SAMDC, y SPDS, mostraron una regulación temporal a través de las muestras estudiadas (Fig. 37). La disminución de un gen ADC1, un NCPA, y dos SPDS diferentes a 38 DPA en la ZA de melón concuerda con los resultados obtenidos en manzana durante la abscisión de fruto inducida por sombreado y por NAA (Zhu y cols., 2011). Sin embargo, otros genes relacionados con PA como un ADC y tres SAMDC, aumentaron posteriormente en la

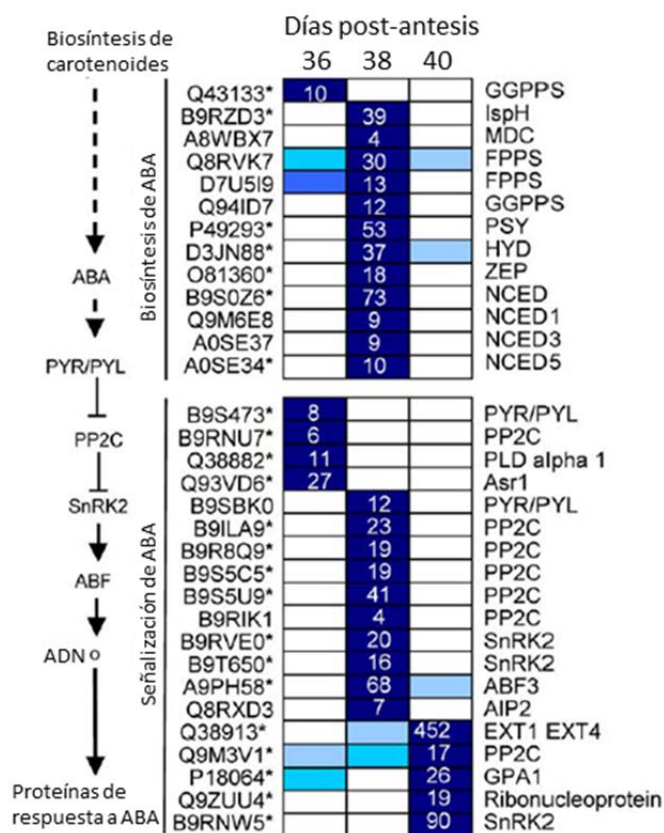
abscisión de melón, lo que concuerda con los datos de actividad de ADC de olivo durante la abscisión del fruto maduro (Gomez-Jimenez y cols., 2010), aunque en olivo se observó un descenso de la expresión de SAMDC durante la abscisión (Gil-Amado y Gomez Jimenez, 2012).



**Figura 37.** Perfil de expresión de genes relacionados con biosíntesis y señalización de etileno y biosíntesis de poliaminas, reconstruida a partir del transcriptoma obtenido por pirosecuenciación 454. Las IDs de UniProt con asterisco indican que ese transcrito mostró variaciones significativas durante la abscisión ( $P < 0,01$ , grupo I). Los niveles de expresión génica a 36, 38 y 40 DPA están indicados con barras coloreadas. Para la muestra que mostró el nivel máximo de expresión, la abundancia normalizada de transcritos, se expresó como el número de transcritos por total. Para las demás muestras, los niveles de expresión se indican como porcentajes de la máxima abundancia normalizada de un gen, como se describe en el código de color desde 0% (blanco) hasta el 100% (azul oscuro). Información adicional sobre los genes relacionados con hormonas se exponen en la tabla 14.

La ZA de melón sufre un gran incremento en la expresión relacionada con etileno y ABA simultáneamente durante la abscisión, lo que sugiere funciones reguladoras y/o interacciones para estas dos hormonas en la ZA de melón. Ha sido propuesto que el ABA podría percibir el estrés por nutrientes y así podría estar correlacionado con la activación de la abscisión asociada a etileno en la fructificación de cítricos (Gomez-Cadenas y cols., 2000), y con la abscisión inducida por sombra en frutos de manzano (Zhu y cols., 2011). En nuestro estudio, de los 8 genes expresados diferencialmente que están involucrados en la biosíntesis de ABA, 6 mostraron una mayor abundancia de transcritos durante la

inducción temprana de la abscisión de melón, lo que indica que los niveles de ABA probablemente aumenten a 38 DPA en la ZA (Fig. 38). Además, esta pronunciada inducción de genes de biosíntesis de ABA es seguida por una disminución posterior de transcritos. Al mismo tiempo, un transportador ABC de ABA de clase G (Kuromori y Shinozaki, 2010), ABCG25, que exporta ABA a través de la membrana plasmática, está inducido a 38 DPA, mientras que ABCG40, un importador de ABA se induce a 40 DPA (Fig. 44), lo que sugiere el control activo del transporte de ABA entre las células de la ZA durante la abscisión de melón. El metabolismo de ABA, por tanto, demuestra claramente una activación transcripcional coordinada durante la abscisión en la ZA de melón.

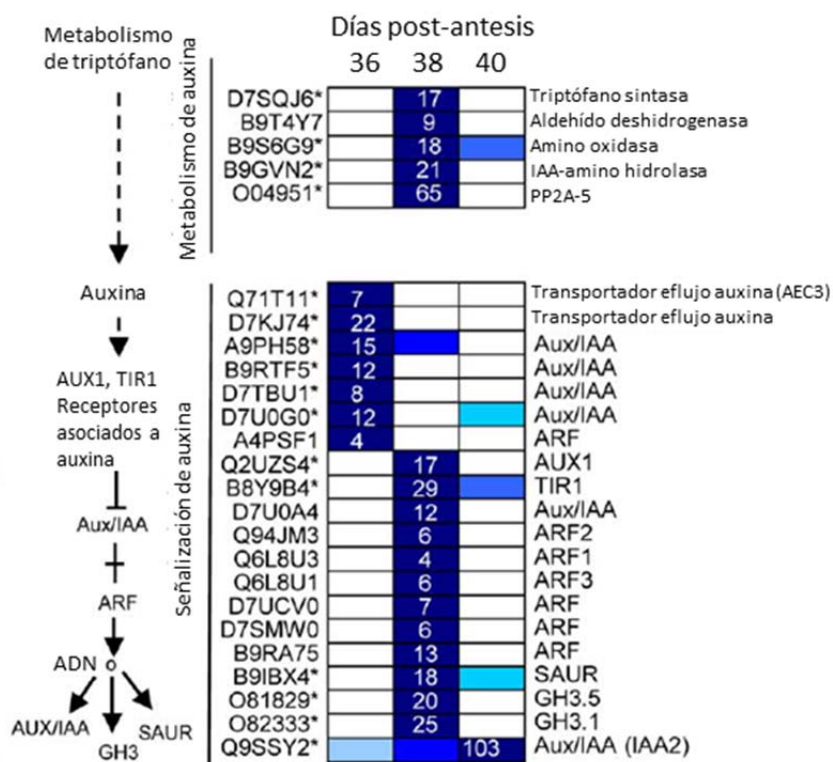


**Figura 38.** Perfil de expresión de genes relacionados con la biosíntesis y señalización de ABA en la ZA del fruto durante la abscisión de melón. Los IDs de UniProt seguidos por asterisco indican transcritos que muestran variaciones significativas durante la abscisión ( $P < 0,01$ , grupo I). Los niveles de expresión génica a 36, 38 y 40 DPA están indicados con barras coloreadas. Para la muestra que mostró el nivel máximo de expresión, la abundancia normalizada de transcritos, se expresó como el número de transcritos por total. Para las demás muestras, los niveles de expresión se indican como porcentajes de la máxima abundancia normalizada de un gen, como se describe en el código de color desde 0% (blanco) hasta el 100% (azul oscuro).. Información adicional sobre genes relacionados con hormonas se muestra la tabla 15.

En este análisis también se encontraron componentes de la señalización de ABA inducidos durante la inducción temprana y/o tardía de la abscisión. Cuatro PP2C (fosfatasa de tipo 2C), dos SnRK2 (subfamilia 2 o quinasas relacionadas con SNF1) y una ABF3 (factor

transcripcional de la subfamilia AREB/ABF) aumentaron exclusivamente durante la inducción temprana de la abscisión de melón, mientras que solo una PP2C aumentó durante la inducción tardía (Fig. 38). Además, se observó la disminución de expresión de genes relacionados con ABA al continuar la abscisión. Un PYR/PYL (receptor de ABA) y una PP2C disminuyeron durante la inducción temprana, mientras que cuatro PP2C, dos SnRK2 y una ABF3 disminuyeron en la ZA de melón durante la inducción tardía de la abscisión.

Estas diferencias en respuestas relacionadas con ABA sugieren que la señalización de ABA es más activa en la inducción temprana que en la tardía de la abscisión de fruto maduro de melón. Adicionalmente, solo un SnRK2 aumentó notablemente durante la inducción temprana y tardía de la abscisión, lo que indica que este SnRK2 podría ser comúnmente requerido para la completa activación de factores de transcripción AREB/ABF necesarios para la separación celular completa durante la abscisión de melón.



**Figura 39.** Perfil de expresión de genes relacionados con la biosíntesis y señalización de auxina en la ZA del fruto durante la abscisión de melón. Los IDs de UniProt seguidos por asterisco indican transcritos que muestran variaciones significativas durante la abscisión ( $P < 0,01$ , grupo I). Los niveles de expresión génica a 36, 38 y 40 DPA están indicados con barras coloreadas. Para la muestra que mostró el nivel máximo de expresión, la abundancia normalizada de transcritos, se expresó como el número de transcritos por total. Para las demás muestras, los niveles de expresión se indican como porcentajes de la máxima abundancia normalizada de un gen, como se describe en el código de color desde 0% (blanco) hasta el 100% (azul oscuro). Información adicional sobre genes relacionados con hormonas se muestra la tabla 15.

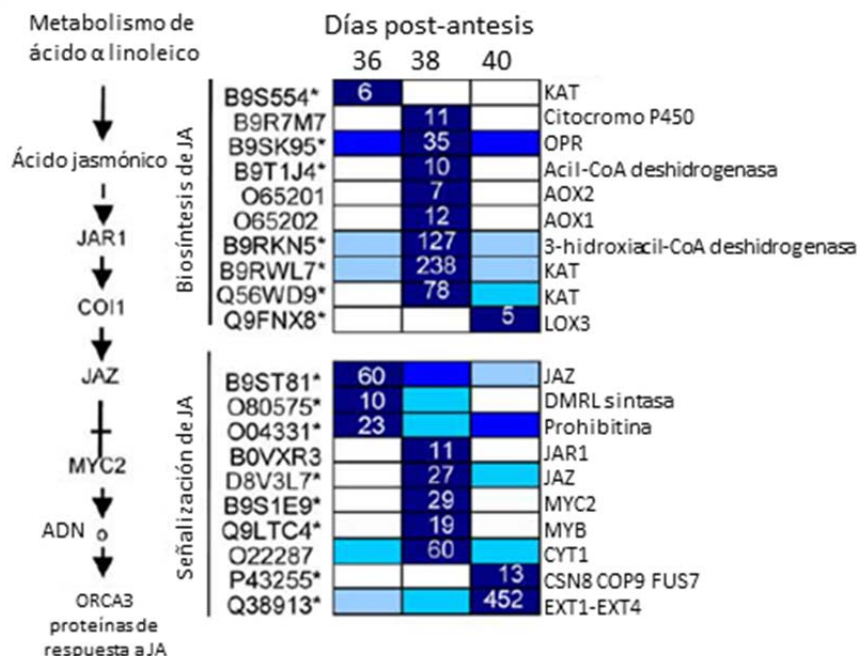


Dada la importancia de los procesos mediados por auxina en la abscisión (Dal Cin y cols., 2009), es necesaria más investigación para dilucidar el modo de acción de la señalización de auxina en la ZA. Se observó una divergencia en la expresión de genes relacionados con auxina en la inducción temprana de la abscisión respecto de la tardía. Solo un gen relacionado con auxina (IAA2) mostró un aumento durante la inducción tardía, mientras que 8 genes aumentaron durante la inducción temprana de la abscisión en melón (Fig. 39) El gen de la auxina-aminoácido hidrolasa el cual está involucrado en la homeostasis de la auxina, aumentó y disminuyó durante la inducción temprana y tardía de la abscisión respectivamente, por lo que la auxina-aminoácido hidrolasa podría producir concentraciones locales de auxina dentro de la ZA para promover la expansión celular con el fin de completar la separación celular.

Esto es consistente con otros estudios en abscisión, en los que se observó que los genes codificantes de proteínas homólogas de esta familia eran inducidos tras la eliminación de flores (Meir y cols., 2010) y la abscisión de frutos inducida por NAA (Zhu y cols., 2011). Sin embargo, se observó que los niveles de transcritos para las enzimas que conjugan auxina GH4.5 y GH3.1 aumentaban durante la inducción temprana de la abscisión de melón. Además, estos genes GH3.5 y GH3.1 mostraron una expresión inhibida en la ZA de melón durante la inducción tardía de la abscisión.

Muchos transcritos relacionados con el transporte y percepción de auxina también sufrieron incrementos durante la inducción temprana de la abscisión en melón. Investigaciones previas indicaron que el pico de etileno que precedía a la abscisión en manzanas inmaduras podría ser responsable del menor nivel de transcritos de un transportador de eflujo de auxina PIN1 en semillas, lo que lleva a una exportación reducida de auxina y a la inducción de abscisión de frutos inmaduros de manzana (Zhu y cols., 2011). En el estudio realizado, los niveles de transcritos para dos transportadores de eflujo de auxina (AEC3, AEC) disminuyeron en la inducción temprana de la abscisión, esta bajada de expresión indica que podría estar relacionada con una tasa reducida de transporte basipétalo de auxina en la ZA de melón y podría señalar el principio del proceso de abscisión, lo cual podría estar asociado con incrementos en la expresión de genes relacionados con etileno. Sin embargo, un transcrito que codifica un transportador de influjo de auxina like protein 3 (AUX1/AIC3) aumentó durante la inducción temprana de la abscisión de melón, lo que sugiere que participa en la regulación del influjo de auxina y en mantener la "fuerza de sumidero" en este tejido, de manera similar a los ortólogos de arabidopsis y tomate AtLAX3 y SILAX3, en los que se ha demostrado que crean sumideros

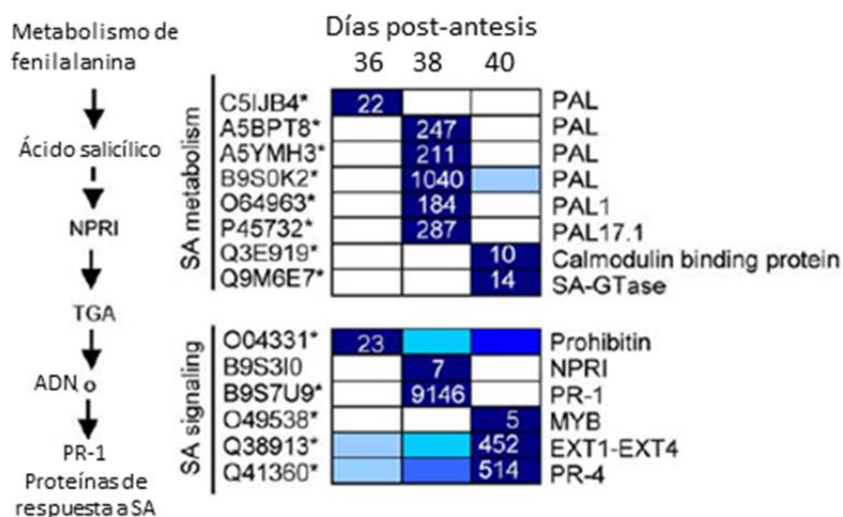
de auxina en células específicas (Vandenbussche y cols., 2010; Pattison y Catalá, 2012). Además, un gen de un receptor de auxina, TIR1 (TIR1/AFB, receptor nuclear) aumentó durante la inducción temprana de la abscisión.



**Figura 40.** Perfiles de expresión de genes relacionados con el metabolismo y señalización de JA en la ZA de frutos durante la abscisión de fruto maduro de melón. Los IDs de UniProt seguidos por asteriscos indican transcritos que muestran variaciones significativas durante la abscisión ( $P < 0,01$ , grupo I). Los niveles de expresión génica a 36, 38 y 40 DPA están indicados con barras coloreadas. Para la muestra que mostró el nivel máximo de expresión, la abundancia normalizada de transcritos, se expresó como el número de transcritos por total. Para las demás muestras, los niveles de expresión se indican como porcentajes de la máxima abundancia normalizada de un gen, como se describe en el código de color desde 0% (blanco) hasta el 100% (azul oscuro). Información adicional sobre los genes relacionados con hormonas se muestran en la tabla 16.

Los datos obtenidos indican que hay numerosos transcritos de respuesta a auxina. Las tres familias de genes de respuesta a auxina temprana, Aux/IAA (IAA2), GH3 (*GH3,5* y *GH3,1*), y SAUR, el cual contiene un motivo de unión al FT ARF, aumentaron durante la inducción temprana de la abscisión de melón. Solo un gen Aux/IAA, IAA2, mostró una expresión incrementada en la ZA de melón en ambas fases, inducción temprana y tardía de la abscisión, sugiriendo que IAA2 está probablemente asociado a la abscisión, y podría ser requerido para la separación celular completa durante la abscisión en la ZA de melón. En contraste, los genes IAA1 e IAA2 disminuyeron por decapitación en *Mirabilis jalapa*, lo que demostró una correlación entre la adquisición de competencia para responder a etileno en ZAs de hojas y tallo, y una declinación en la abundancia de transcritos de genes reguladores de auxina (Meir y cols., 2010). Adicionalmente, se detectaron numerosos genes regulados por auxina pertenecientes a Aux/IAA, los cuales disminuyeron durante la

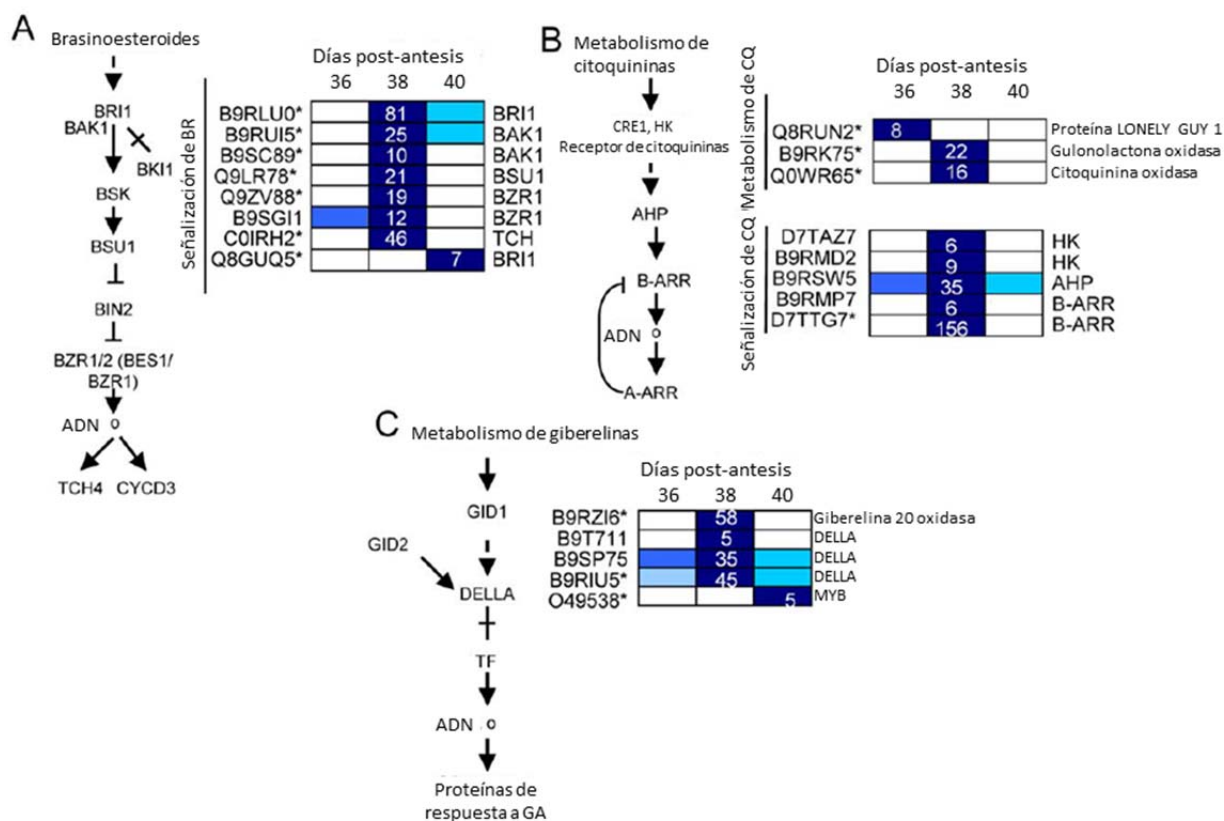
inducción temprana de abscisión. En la ZA de flores de tomate, la expresión disminuida de estos genes Aux/IAA es el resultado de una reducción de auxina tras la eliminación de flores, y no es ni específico de la ZA ni afectado por etileno (Webster, 1975). En este estudio, la modificación de la sensibilidad a auxina por disminución de los reguladores de respuesta a auxina, como Aux/IAAs, puede conducir a la abscisión del fruto maduro.



**Figura 41.** Perfiles de expresión de genes relacionados con el metabolismo y señalización de SA en la ZA de frutos durante la abscisión de fruto maduro de melón. Los IDs de UniProt seguidos por asteriscos indican transcritos que muestran variaciones significativas durante la abscisión ( $P < 0,01$ , grupo I). Los niveles de expresión génica a 36, 38 y 40 DPA están indicados con barras coloreadas. Para la muestra que mostró el nivel máximo de expresión, la abundancia normalizada de transcritos, se expresó como el número de transcritos por total. Para las demás muestras, los niveles de expresión se indican como porcentajes de la máxima abundancia normalizada de un gen, como se describe en el código de color desde 0% (blanco) hasta el 100% (azul oscuro). Información adicional sobre los genes relacionados con hormonas se muestran en la tabla 16.

En la inducción temprana de la abscisión de melón también se observó un aumento de expresión de genes relacionados con JA (Fig. 40) y SA (Fig. 41) 5 de los 7 genes expresados diferencialmente que están involucrados en la biosíntesis de JA fueron inducidos en la ZA de melón durante la inducción temprana. Esto también ha sido descrito en la abscisión de hojas en cítricos (Agustí y cols., 2009) y en la abscisión de estambres de Arabidopsis (Cai y Lashbrook, 2008). De manera similar, se observó un aumento de expresión de dos genes JAZ y un MYC2 en la ZA de melón durante la abscisión, lo que sugiere un incremento de niveles de JA y sensibilidad en su mediación en la abscisión de melón. Además, muchos genes relacionados con SA, tales como PAL, NPR1, PR-1 y PR-4 aumentaron su expresión durante la abscisión. Los datos de perfil génico indicaron que los transcritos de PR-1 y PR-4, los cuales son marcadores para la respuesta a SA (Pieterse y Van Loon, 2004), se incrementaron durante la inducción temprana de la abscisión de melón, mientras que un

tránsito de UDP-glucosa:SA glucosiltransferasa, el cual está involucrado en la conjugación de SA, se incrementó durante la inducción tardía de la abscisión de melón.



**Figura 42.** Perfiles de expresión de genes relacionados con la biosíntesis y señalización de BR (A), CK (B) y GA (C) en la ZA de frutos durante la abscisión del fruto maduro de melón. Los IDs de UniProt con asteriscos indican transcritos que muestran variaciones significativas durante la abscisión ( $P < 0,01$ , grupo I). Los niveles de expresión génica a 36, 38 y 40 DPA están indicados con barras coloreadas. Para la muestra que mostró el nivel máximo de expresión, la abundancia normalizada de transcritos, se expresó como el número de transcritos por total. Para las demás muestras, los niveles de expresión se indican como porcentajes de la máxima abundancia normalizada de un gen, como se describe en el código de color desde 0% (blanco) hasta el 100% (azul oscuro). Información adicional sobre los genes relacionados con hormonas se muestran en la tabla 16.

El aumento de la señalización de BR fue inesperado durante la abscisión de melón (Fig. 42). Aunque los BR son reguladores esenciales del crecimiento involucrados en muchos procesos fisiológicos (Gudesblat y Russinova, 2011), su papel en la regulación de la abscisión sigue sin ser determinado, ya que la información con respecto a los genes que regulan la señalización de BR en la ZA durante la abscisión es extremadamente limitada. Este trabajo provee el primer informe disponible que muestra el aumento de los componentes principales de la señalización de BR durante la abscisión, con énfasis particular en la inducción temprana de la abscisión. Observamos que un receptor quinasa BRI1, 2 correceptores BAK1, una fosfatasa BSU1 y un FT BES1/BZR1 (BES1/BZR1

proteína homóloga 4, BEH4 Atlg78700) aumentaron su expresión exclusivamente durante la inducción temprana de la abscisión de melón, mientras que solo un gen diferente del receptor BRI1 aumentó su expresión exclusivamente durante la inducción tardía de la abscisión, lo que sugiere que el aumento del receptor BRI1 podría ser requerido para la separación celular completa durante la abscisión. Así, la distribución temporal de la expresión de BRI1, BAK1, BSU1 y BEH4 indica que su acción coordinada regula la respuesta a BR en la ZA de melón durante la abscisión del fruto maduro.

Recientemente, ha sido demostrado que la proteína PP2A (proteína fosfatasa citoplasmática 2A) es responsable de desfosforilar a BZR1 y BZR2/BES1, incrementando así la forma activa de estos factores de transcripción y promoviendo la señalización de BR (Tang y cols., 2011). Se encontró un aumento de la expresión de dos genes PP2A (*PP2AA2DF1/At3g25800*, *PP2A5/At1g69960*), y un gen BEH4-like (BZR1) en la ZA de melón a los 38 DPA, lo que sugiere que el aumento del gen PP2A activa la expresión de genes de respuesta a BR en la ZA de melón en abscisión mediante la desfosforilación de BEH4. Además, experimentos recientes indican que PP2A también regula la biosíntesis de etileno regulando diferencialmente el intercambio entre las isoformas de ACS (Skottke y cols., 2011), lo que sugiere que la fosfatasa PP2A podría estar involucrada en el proceso de abscisión. Estos datos implican que la biosíntesis de etileno y la señalización por BR convergen a nivel transcripcional para activar sinérgicamente la abscisión de melón.

Por otro lado, se ha observado que BES1/BZR1 interactúan con otros factores de transcripción para activar sinérgicamente genes diana (Li y cols., 2009) y reclutar dos histonas demetiladas que contienen dominios jumoni, ELF6 y REF6 (Yu y cols., 2008) y un FT de elongación, IWS1 (Li y cols., 2010) para regular la expresión génica.

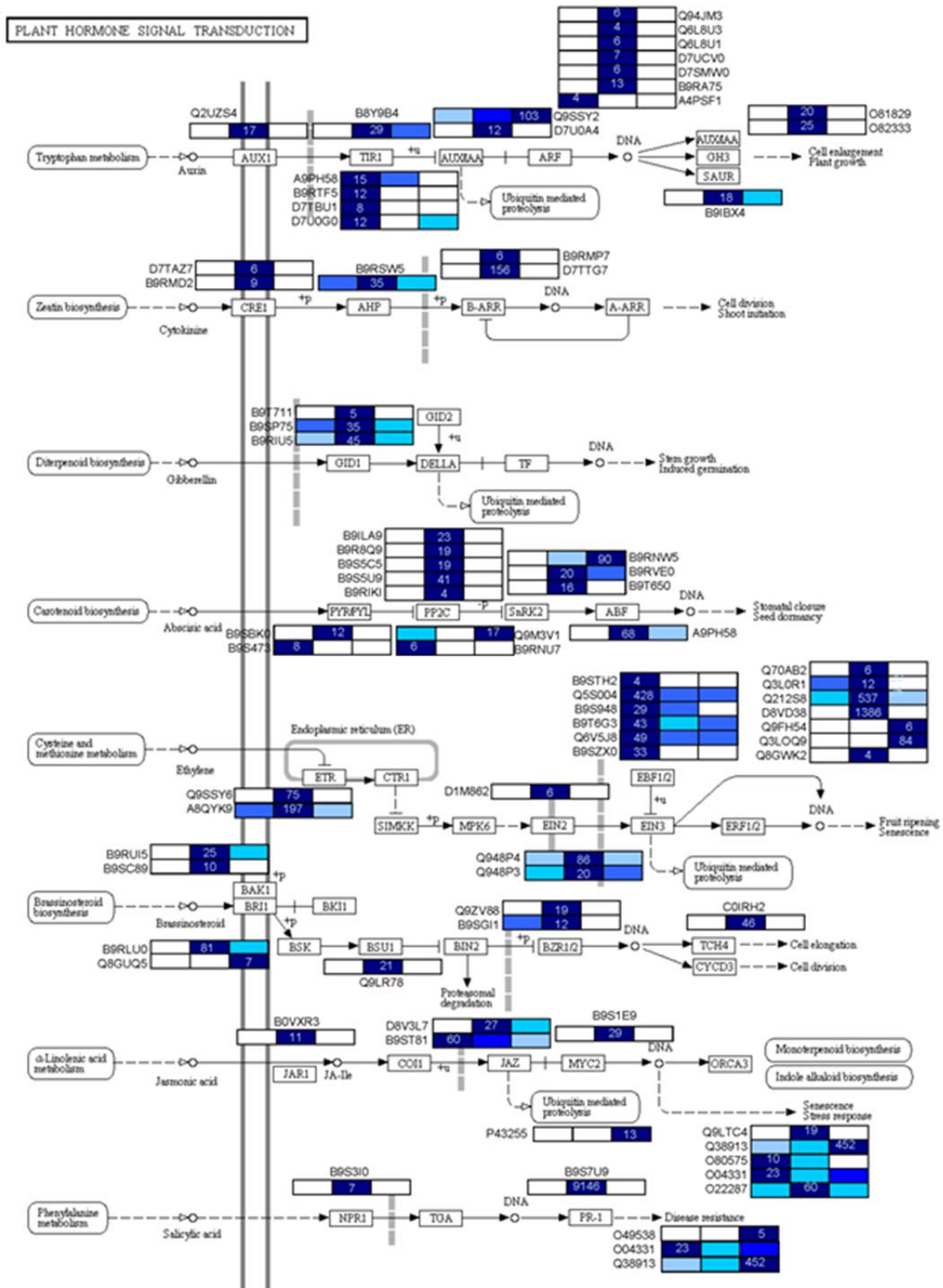
En general, ocurren muchos cambios significativos de abundancia de transcritos asociados a respuestas de BR en la ZA de melón, lo que sugiere una compleja respuesta coordinada de BR en este tejido. Por ejemplo, el gen TCH4 de Arabidopsis, el cual codifica una xiloglucano endotransglucosilasa/hidrolasa, aumenta su expresión por BRs (Iliev y cols., 2002). En este trabajo se encontró que la abscisión induce la expresión del gen TCH4 en la ZA de melón, lo cual podría reflejar un reclutamiento de actividad modificadora de pared celular en la ZA durante la inducción temprana de la abscisión. También se observó el aumento temprano del FT de elongación IWS1 durante la abscisión de melón. Basado en este escenario, una explicación plausible sería que la señalización de BR activada a través de BEH4 podría estar involucrada en el aumento de IWS1 mostrado durante la inducción temprana de la abscisión de melón. De manera notable, dos factores de transcripción

involucrados en respuestas a luz y a señalización de BR, HY5 y GATA2, aumentaron durante la inducción temprana de la abscisión paralelamente al FT BEH4, lo que sugiere su participación en la señalización de BR durante la abscisión de melón. Otro FT como FLOWERING LOCUS C (FLC), regulado por BRs durante el desarrollo reproductivo (Clouse, 2011), disminuyó durante la abscisión de melón, planteando la cuestión sobre si BR regula la expresión de FLC durante la abscisión de melón a través de un dímero BES1/REF6.

La interacción de la señalización de BR y auxina se conoce bien, y los estudios globales ChIP-chip revelaron que muchos FTs regulados por auxina son dianas de BZR1 aparte de los genes PIN involucrados en el transporte de auxina (Clouse, 2011). En este estudio, se muestra que la expresión génica de IAA2, GH3,5, GH3,1 y SAUR aumentaba durante la inducción temprana de la abscisión paralelamente al aumento de genes relacionados con BRs. En este sentido, no puede ser descartado que los BRs puedan ejercer un efecto regulador directo sobre la expresión de estos genes relacionados con auxina en la ZA de melón durante la inducción temprana de la abscisión. Además, muchos genes involucrados en la biosíntesis o señalización de GA, ABA, etileno, CQ y JA son dianas directas de BZR1 y BES1 (Clouse, 2011), lo que implica que además de genes diana específicos de BR, la señalización de BR afecta la actividad de la mayoría de otras hormonas en una variedad de maneras que podrían ayudar a integrar señales que conducen a la abscisión de melón.

En el caso de las GAs, nuestros datos sugieren que su señalización se encuentra negativamente regulada por GAI (proteína DELLA) durante la abscisión de melón (figura 42), un descubrimiento consistente con los datos de manzana durante la abscisión de fruto inmaduro (Botton y cols., 2011) y durante la abscisión inducida por sombra y NAA (Zhu y cols., 2011). Sin embargo, la activación de la biosíntesis de GA durante la abscisión de melón contrasta con los datos de la abscisión de fruto inmaduro de manzana (Botton y cols., 2011), lo que sugiere que un bajo nivel de GA en la ZA de fruto inmaduro y un alto nivel de GA en la ZA de fruto maduro podrían estar asociados con abscisión. Así, nuestro estudio indica que además de la participación de etileno, ABA, JA, y auxina en el control de los eventos de abscisión, otras hormonas como SA y BR, aparentemente participan en una intrincada red de interacción regulando la inducción temprana de la abscisión de melón. Un mapa representativo de KEGG para la señalización por hormonas vegetales durante la abscisión de melón se proporciona en la figura 43.

Resultados y discusión



**Figura 43.** Mapa metabólico de las rutas de transducción de señales de fitohormonas en la ZA de fruto de melón. Los niveles de expresión génica a 36, 38 y 40 DPA están indicados con barras coloreadas. Para la muestra que mostró el nivel máximo de expresión, la abundancia normalizada de transcritos, se expresó como el número de transcritos por total. Para las demás muestras, los niveles de expresión se indican como porcentajes de la máxima abundancia normalizada de un gen, como se describe en el código de color desde 0% (blanco) hasta el 100% (azul oscuro).

#### **4.3.4. Expresión génica relacionada con el transporte**

Se encontraron 103 genes con expresión diferencial relacionados con el transporte en la ZA de frutos (Fig. 44). Ocho transportadores de azúcares aumentaron a 38 DPA, mientras que un transportador de hexosas, un transportador de manitol y otro transportador de azúcar aumentaron a 40 DPA. Además, se detectó que 16 genes relacionados con el transporte de nitrógeno (transportadores de purina, de aminoácidos y de oligopéptidos entre otros) aumentaron a 38 DPA.

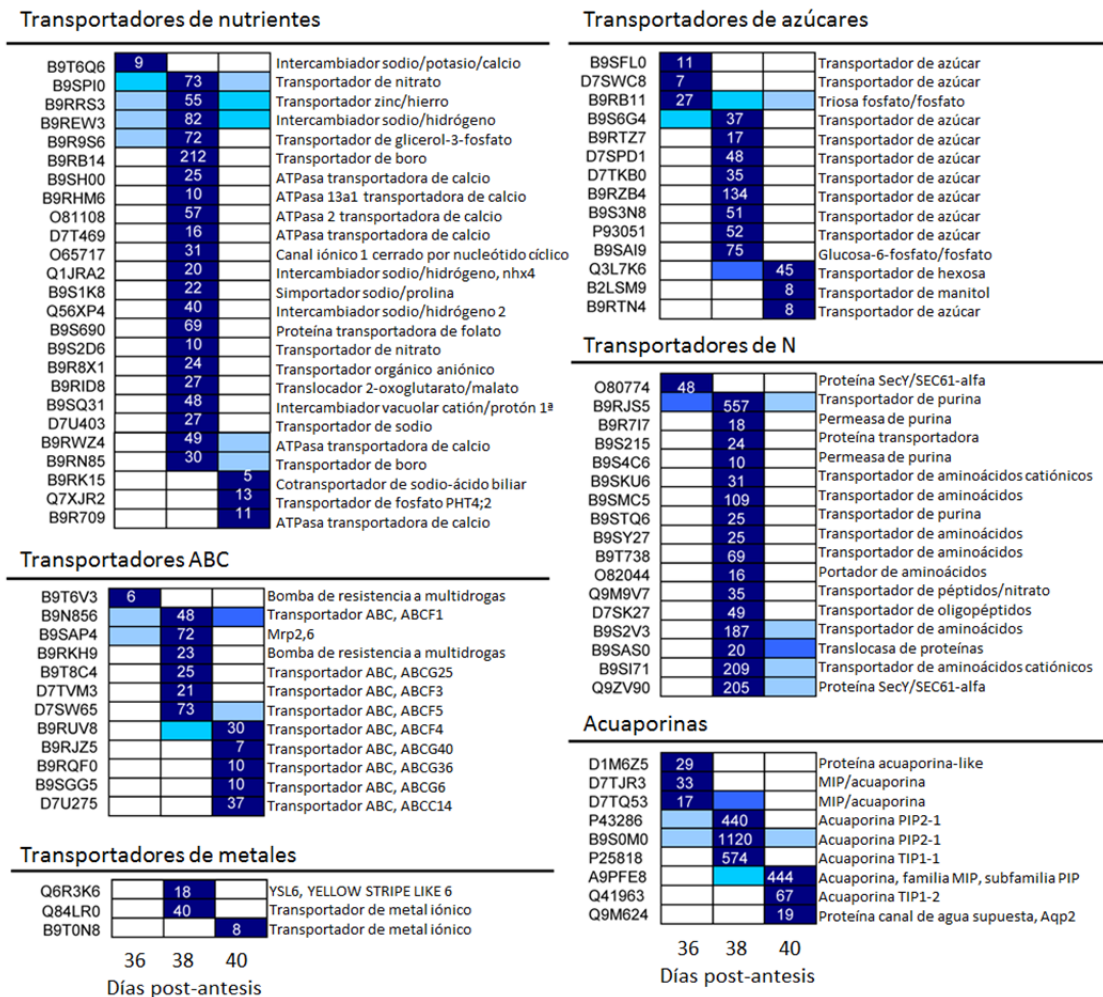
De 22 genes relacionados con el transporte de nutrientes que aumentaron a 38 DPA, dos están asociados con transporte de boro, 5 son transportadores calcio-ATPasas, dos intercambiadores sodio / hidrógeno, dos transportadores de nitrato, un transportador de folato, y uno transportador de zinc/hierro, mientras que un transportador calcio-ATPasa, un transportador fosfato y un cotransportador sodio-ácido biliar aumentaron a 40 DPA, indicando que la mayoría de estos genes de transportadores eran preferentemente expresados a 38 DPA. Estos resultados también parecen reflejar diferencias en el transporte en la ZA durante la inducción temprana y tardía de la abscisión; por ejemplo, el transporte temprano resulta principalmente realizado por la actividad génica de transportadores de boro y nitrato y el transporte tardío por transportadores fosfato, mientras que el transporte de sodio y calcio está asociado con ambas etapas de la abscisión.

Tránscritos de la familia ATP-binding cassette (ABC) también se acumularon de manera abundante a 38 y 40 DPA en la ZA de frutos. Entre estos, hay dos que codifican proteínas asociadas a resistencias multidrogas, que pertenecen al grupo de proteínas transportadoras ABC de clase B (ABCB), las cuales también funcionan en el transporte de auxina en diferentes especies de plantas (Verrier y cols., 2008). Este resultado podría significar que estas proteínas que aumentan, facilitan el eflujo dirigido de auxina desde las células de la ZA con el fin de establecer y el mantener el gradiente de auxina que regula la inducción temprana durante la abscisión.

Al mismo tiempo, otros transportadores ABC de la clase G transportan ABA (Kuromori y Shinozaki, 2010), ABCG25, un exportador de ABA a través de la membrana plasmática aumenta a 38 DPA, mientras que ABCG40, un importador de ABA, aumenta a 40 DPA, lo que sugiere un control activo del transporte de ABA entre las células de la ZA durante la abscisión de melón. Por tanto, este estudio provee información para identificar canales



candidatos y genes transportadores que posiblemente estén involucrados en la regulación de la abscisión de fruto maduro.



**Figura 44.** Perfil de expresión de familias génicas que codifican proteínas de transporte durante la abscisión de melón. Las secuencias fueron seleccionadas tras establecer un  $P < 0.01$  (grupo I). Los niveles de expresión génica a 36, 38 y 40 DPA se indican con barras de colores. Para la muestra que presenta el nivel máximo de expresión, la abundancia de transcritos normalizada se expresa como el número de transcritos por total de transcritos. Para las otras muestras, el nivel de expresión se indica como porcentajes de la máxima abundancia de transcritos normalizada del gen, como se describe en el código de colores desde 0% (blanco) a 100% (azul oscuro)

#### 4.3.5. Identificación de los factores de transcripción durante la inducción temprana y tardía de la abscisión del fruto maduro

De los 4.801 genes expresados diferencialmente en la ZA del fruto, 123 eran genes que codifican factores de transcripción (FT) de diversas familias ( $P < 0,01$ ), la mayoría de ellos con un patrón de inducción desde 36 a 38 DPA (tabla 18). En total, se encontraron 36

genes cuyas cantidades máximas fueron detectadas dentro del cluster A, 73 genes a 38 DPA dentro del cluster B y 15 genes a 40 DPA dentro del cluster C.

Dentro del cluster A, con máximos de transcripción a 36 DPA, el FT más abundante fue una proteína con dominio NAC encontrada en el subcluster A3 (tabla 18). De manera notable, había una proteína AP2/ERF (ERF1) que era abundante en el subcluster A2 (tabla 18). Las proteínas AP2/ERF fueron la clase de proteína más representada a 36 DPA, una dentro del subcluster A1, cuatro dentro del subcluster A2 y una dentro del subcluster A3, lo que sugiere una coordinación regulada de esta clase de FTs. Las proteínas MADS-box fueron la segunda clase más representada dentro del subcluster A2 (MADS2, ERAF17 y flowering locus C/FLC). La aproximación basada en pirosecuenciación identificó 7 secuencias que contenían el dominio conservado MADS, las cuales fueron utilizadas para posteriores análisis filogenéticos (Fig. 45).

En el cluster B, todos los transcritos para FTs fueron encontrados en el subcluster B1 (tabla 18), lo que sugiere que existe una coordinación transcripcional ajustada en la inducción temprana de la abscisión de melón. Las clases que están bien representadas en el cluster B incluyen 10 proteínas con *zinc finger* y 10 proteínas con dominio homeobox. Remarcablemente, solo 15 FTs fueron encontrados dentro del cluster C, lo que sugiere que ocurre una regulación restrictiva del transcriptoma en la inducción tardía de la abscisión de melón (tabla 18). En el cluster C, 14 de los 15 genes se encontraron dentro del subgrupo C1. Los FTs más abundantes fueron dos proteínas zinc finger y una proteína AP2/ERF (ERF6) encontradas dentro del subcluster C1 (tabla 18). Además, una proteína represora inducida por auxina (IAA2) fue incluida en el subcluster C2. Finalmente, no se encontró ningún gen para el subcluster C3 dentro del grupo I. Por tanto, la mayoría de los miembros de las familias MADS box y Aux/IAA fueron encontrados dentro del cluster A, y eran genes reprimidos durante la abscisión de melón, mientras que la mayoría de los miembros de las familias zinc finger, WRKY, basic leucine zipper (bZIP) y NAC fueron encontrados dentro de los cluster B o C, y fueron genes inducidos durante abscisión (tabla 18).

## Resultados y discusión

**Tabla 18.** Genes de factores de transcripción inducidos o reprimidos en la ZA del fruto durante la abscisión de melón. La tabla muestra el conteo total de lecturas para cada gen tras la normalización (RPKMx1000) en las 3 muestras: (a) separación pre-celular de la ZA (36 DPA), (b) separación celular parcial de la ZA (38 DPA, inducción temprana de abscisión), (c) separación celular casi completa (40 DPA, inducción de abscisión tardía).

UniProt ID	36 DPA	38 DPA	40 DPA	Descripción
<b>Cluster A</b>				
Subcluster A1				
D7TNK3	28.65	0	0	Nsd = <i>Vitis vinifera</i>
B9RMT1	4.56	0	0	F-box and wd40 domain protein. putative = <i>Ricinus communis</i>
B9SZX0	49.10	0	0	Ethylene-responsive transcription factor 1B. putative = <i>Ricinus communis</i>
D7T1G5	17.39	0	0	Leucine-zipper transcription factor. BZIP domain class transcription = <i>Vitis vinifera</i>
D9ZJF0	22.22	0	0	WRKY domain class transcription factor. (WRKY11) = <i>Malus domestica</i>
D7U8U5	24.39	0	0	BHLH domain class transcription factor. Basic helix-loop-helix (bHLH) domain = <i>Vitis vinifera</i>
D9ZIP0	52.40	0	0	BHLH domain class transcription factor. Basic helix-loop-helix (bHLH) domain. BHLH16 = <i>Malus domestica</i>
B3VTV7	12.46	0	0	R2R3 MYB60 transcription factor. MYB60 = <i>Vitis vinifera</i>
B9RTF5	20.94	0	0	Aux/IAA protein. IAA4 = <i>Ricinus communis</i>
D7TBU1	12.34	0	0	Aux/IAA protein = <i>Vitis vinifera</i>
D9ZIT8	18.51	0	0	Zinc finger(C2H2L28). C2H2L domain class transcription factor = <i>Malus domestica</i>
E0CRP8	7.47	0	0	Homeobox protein = <i>Vitis vinifera</i>
Q5D1M2	2.74	0	0	Class III HD-Zip protein 5 = <i>Populus trichocarpa</i>
D7TRM3	7.14	0	0	Homeobox protein = <i>Vitis vinifera</i>
D7TQQ8	9.55	0	0	E2F/DP family protein = <i>Vitis vinifera</i>
D7MC32	6.71	0	0	Transcription factor. ARALYDRAFT_493171 = <i>Arabidopsis lyrata</i>
Q8LLR1	19.12	0	0	MADS-box protein 3. MADS3 = <i>Vitis vinifera</i>
Subcluster A2				
D9ZJB2	9.22	7.38	10	SCL domain class transcription factor. SCL13 = <i>Malus domestica</i>
B9S948	55.87	40.46	0	Ethylene-responsive transcription factor. putative = <i>Ricinus communis</i>
B9RET1	12.85	4.81	0	Transcription regulator. putative = <i>Ricinus communis</i>
Q5S004	579.94	192.41	75.88	Ethylene response factor 1. ERF1 = <i>Cucumis sativus</i>
Q6V5J8	79.28	45.30	22.65	AP2 transcription factor/ethylene response element = <i>Brassica oleracea</i>
D5L0Z9	94.89	86.37	0	AP2 domain class transcription factor. AP2D15 = <i>Malus domestica</i>
B9RHG8	13.88	6.17	0	BHLH domain class transcription factor. Basic helix-loop-helix (bHLH) domain = <i>Ricinus communis</i>
B9SA09	53.90	7.09	0	BHLH domain class transcription factor. Basic helix-loop-helix (bHLH) domain = <i>Ricinus communis</i>
D1MDP4	19.04	6.34	0	MADS box protein. Flowering locus C. FLC = <i>Vitis vinifera</i>
Q4F8B3	22.57	19.92	0	MADS box protein. MADS2 = <i>Prunus persica</i>
Q9AYR8	68.96	19.70	0	MADS-box protein. ERAF17 = <i>Cucumis sativus</i>

## Resultados y discusión

Q9LHJ8	243.75	202.08	125.00	Zinc finger A20 and AN1 domain-containing stress-associated protein 5 (AtSAP5). SAP5 At3g12630 T2E22.6 T2E22.105
A9PH58	20.16	12.09	0	Aux/IAA protein = <i>Populus trichocarpa</i>
Subcluster A3				
B9T6G3	55.34	15.44	27.02	AP2 domain transcription factor RAP2.3. putative = <i>Ricinus communis</i>
D9ZIT4	19.68	0	7.38	Zinc finger (C2H2L24). C2H2L domain class transcription factor = <i>Malus domestica</i>
D7U0G0	13.69	0	5.70	Aux/IAA protein = <i>Vitis vinifera</i>
D7UCZ6	792.07	178.21	458.74	NAC-A/B (NAC-alpha/beta) domain (1); UBA domain (1) = <i>Vitis vinifera</i>
A5C5T1	12.01	0	6.00	Homeobox protein = <i>Vitis vinifera</i>
D7TIC9	57.33	0	12.00	Homeobox protein = <i>Vitis vinifera</i>
Cluster B				
Subcluster B1				
Q8LRL5	0	17.54	0	NAC domain protein. Nam-like protein 10. NH10 = <i>Petunia hybrida</i>
B9SYE3	0	18.31	0	CCAAT-binding transcription factor subunit A. putative = <i>Ricinus communis</i>
D7TKH6	0	35.25	0	CCAAT = <i>Vitis vinifera</i>
Q00LP6	0	18.29	0	GRAS2 = <i>Solanum lycopersicum</i>
B9SRA7	0	22.86	4.06	ARID Transcription factor = <i>Ricinus communis</i>
D3Y3E9	0	53.64	0	DRE transcription factor 1 = <i>Vitis pseudoreticulata</i>
B9S114	0	46.66	0	Transcription factor IWS1. putative = <i>Ricinus communis</i>
D0E574	11.82	89.83	49.64	NAP-like transcription factor = <i>Vitis vinifera</i>
B9RD55	0	1.43	0	Ccr4-not transcription complex. putative = <i>Ricinus communis</i>
Q9ZV88	0	19.48	0	BES1/BZR1 homolog protein 4. BEH4 At1g78700 F9K20.26
B9SPF4	8.91	178.25	0	Nut2. putative = <i>Ricinus communis</i>
D8VD38	0	1680.00	0	Ethylene response factor 11. ERF11 = <i>Actinidia deliciosa</i>
Q2I2S8	230.88	821.10	62.69	Ethylene-responsive element-binding protein. ERF-6 = <i>Medicago truncatula</i>
Q70AB2	0	5.29	0	Ethylene transcription factor = <i>Fagus sylvatica</i>
D5L113	17.46	66.95	0	AP2 domain class transcription factor. AP2D29 = <i>Malus domestica</i>
D7SVY0	0	43.12	0	HSF family protein = <i>Vitis vinifera</i>
A5BUH0	45.19	85.68	58.38	HSF family protein = <i>Vitis vinifera</i>
B9RP68	0	78.89	23.66	BZIP domain class transcription. Transcription factor hy5. putative = <i>Ricinus communis</i>
B9RPF8	0	95.23	11.20	BZIP domain class transcription = <i>Ricinus communis</i>
B9SU10	0	21.17	0	BZIP domain class transcription. Transcription factor RF2a = <i>Ricinus communis</i>
D7SU43	0	27.84	0	BZIP domain class transcription = <i>Vitis vinifera</i>
D7TIQ1	6.65	48.04	7.39	BZIP domain class transcription = <i>Vitis vinifera</i>
D7TX81	0	24.16	0	BZIP domain class transcription = <i>Vitis vinifera</i>
D7UCK3	0	46.51	10.07	BZIP domain class transcription = <i>Vitis vinifera</i>

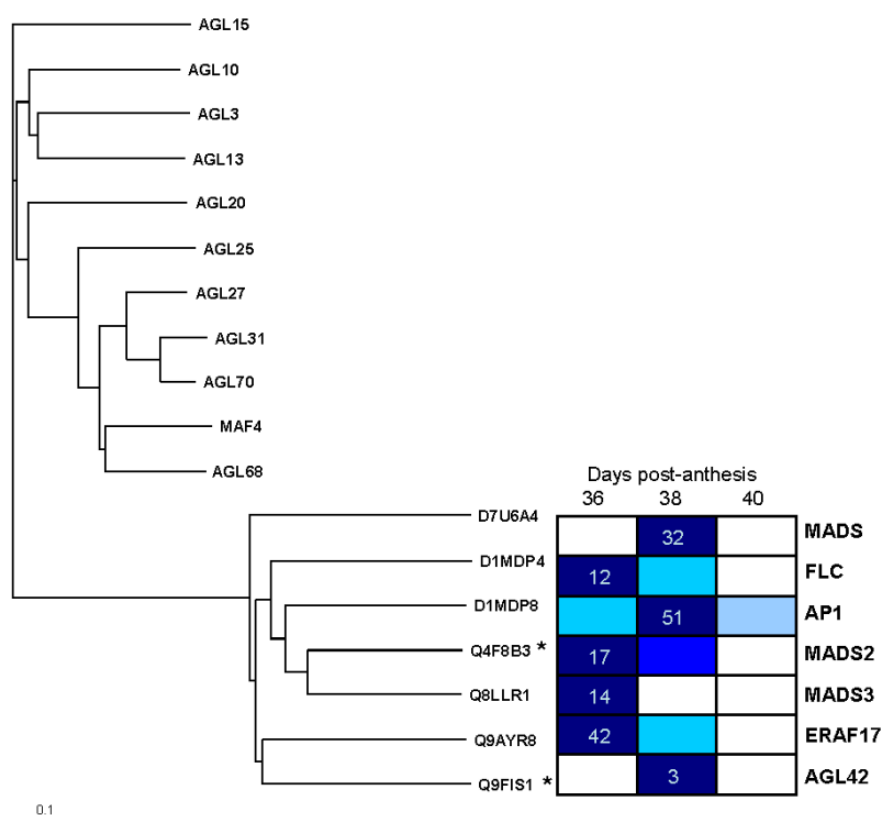
## Resultados y discusión

B2G284	0	9.95	0	WRKY family transcription factor (WRKY7) = <i>Vitis thunbergii</i>
B9RNB2	11.56	19.97	0	WRKY transcription factor = <i>Ricinus communis</i>
B9RXH5	0	15.51	2.87	WRKY transcription factor = <i>Ricinus communis</i>
B9SVK5	0	28.75	0	WRKY transcription factor = <i>Ricinus communis</i>
D9ZJF1	0	9.44	0	WRKY transcription factor. WRKY12 = <i>Malus domestica</i>
D9ZJG1	0	25.10	0	WRKY transcription factor. WRKY6 = <i>Malus domestica</i>
Q5IY47	0	11.19	0	WRKY transcription factor. WRKY2 = <i>Vitis vinifera</i>
Q6R7N3	0	19.10	0	WRKY transcription factor 30 = <i>Vitis aestivalis</i>
B9RBD1	20.63	214.28	20.63	BHLH domain class transcription factor. Basic helix-loop-helix (bHLH) domain = <i>Ricinus communis</i>
B9RKM4	0	27.54	0	BHLH domain class transcription factor. Basic helix-loop-helix (bHLH) domain = <i>Ricinus communis</i>
B9S1E9	0	14.58	0	BHLH domain class transcription factor. Transcription factor AtMYC2 = <i>Ricinus communis</i>
D7T2X6	0	24.39	0	BHLH domain class transcription factor. Basic helix-loop-helix (bHLH) domain = <i>Vitis vinifera</i>
E0CT50	0	263.00	14.06	BHLH domain class transcription factor. Basic helix-loop-helix (bHLH) domain = <i>Vitis vinifera</i>
Q9M0B9	0	37.03	0	BHLH transcription factor. At4g30410
D9ZJ66	0	25.07	0	MYB domain class transcription factor. MYB5 = <i>Malus domestica</i>
Q9LFL3	0	13.10	0	AT5g16880/F2K13_30 (TOM (Target of myb1)-like protein). F2K13_30 At5g16880
Q9LTC4	0	22.22	0	MYB transcription factor 15. At3g23250
D9ZJ82	130.24	188.74	81.67	MYBR domain class transcription factor. MYBR3 = <i>Malus domestica</i>
D7U6A4	0	46.98	0	MADS box protein = <i>Vitis vinifera</i>
D9ZIU5	0	20.83	0	C2H2L domain class transcription factor. C2H2L9 = <i>Malus domestica</i>
B9SL96	0	36.01	5.54	RING-type zinc finger protein. Makorin-1 = <i>Ricinus communis</i>
D7UCN8	0	10.07	9.06	RING-type zinc finger protein = <i>Vitis vinifera</i>
B9SCR6	0	32.94	11.62	Zinc finger protein = <i>Ricinus communis</i>
B9HUZ8	25.86	66.09	0	Zinc finger = <i>Populus trichocarpa</i>
D7TTH5	0	8.15	0	Zinc finger = <i>Vitis vinifera</i>
B9T724	0	21.35	0	Zinc finger. GATA transcription factor. putative = <i>Ricinus communis</i>
B9RPQ5	0	236.64	25.44	Zinc finger = <i>Ricinus communis</i>
A5BFH0	331.39	500.00	240.31	Zinc finger = <i>Vitis vinifera</i>
D7TG75	12.34	46.29	28.80	Zinc finger = <i>Vitis vinifera</i>
D9ZJA4	21.97	43.95	35.71	NAC domain class transcription factor. NAC5 = <i>Malus domestica</i>
A5YWA9	65.57	73.22	26.22	NAC domain protein. NAC = <i>Citrus sinensis</i>
B9RLW7	0	50.78	0	NAC domain-containing protein 21/22 = <i>Ricinus communis</i>
B9T364	54.91	147.39	0	NAC domain-containing protein = <i>Ricinus communis</i>
D7TXR6	200.00	220.83	137.50	NAC-A/B (NAC-alpha/beta) domain = <i>Vitis Vinifera</i>
D9ZJ03	35.75	58.82	34.60	HD domain class transcription factor. HD1 = <i>Malus domestica</i>

## Resultados y discusión

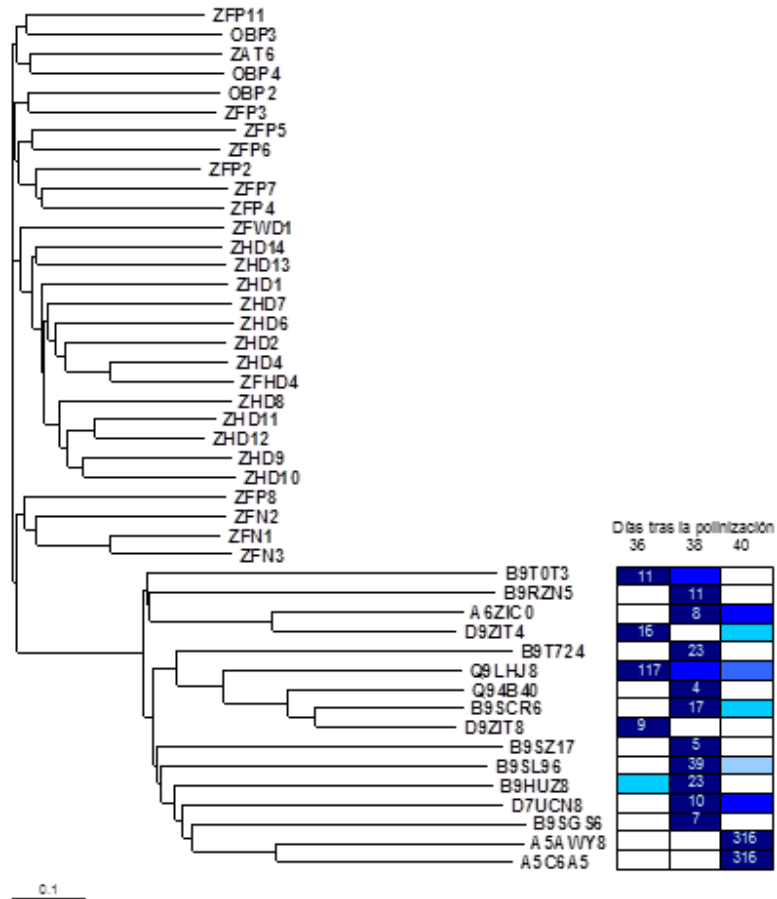
D9ZJ06	0	58.64	0	HD domain class transcription factor. HD12 = <i>Malus domestica</i>
B9SDI4	0	43.69	4.41	Bel1 homeotic protein = <i>Ricinus communis</i>
D7TM22	0	33.98	0	Bel1 homeotic protein. putative = <i>Vitis vinifera</i>
D7SV02	0	45.66	0	Bel1 homeotic protein. putative = <i>Vitis vinifera</i>
A5BGU8	0	205.61	0	Homeobox protein = <i>Vitis vinifera</i>
A5C9F3	0	54.10	17.39	Homeobox protein = <i>Vitis vinifera</i>
B9SVE1	0	173.28	18.05	Homeobox protein = <i>Ricinus communis</i>
D7TNU6	26.14	146.59	0	Homeobox protein = <i>Vitis vinifera</i>
D7TWR5	0	28.53	15.56	Homeobox protein = <i>Vitis vinifera</i>
B9SEE4	0	55.34	24.45	Transcription factor. putative = <i>Ricinus communis</i>
B9S5V4	0	16.23	0	Transcription factor. putative = <i>Ricinus communis</i>
B9RCK4	3.93	10.83	0	Transcription factor. putative = <i>Ricinus communis</i>
B9T2G9	0	16.62	0	Transcription factor. putative = <i>Ricinus communis</i>
Subcluster B2				
Subcluster B3				
Cluster C				
Subcluster C1				
B9RZW3	0	0	7.28	Tex protein-relatedtranscription accessory protein = <i>Ricinus communis</i>
D9ZJE1	0	0	5.29	TLP domain class transcription factor. TLP4 = <i>Malus domestica</i>
Q3L0Q9	0	0	106.87	Ethylene-responsive element binding protein ERF6 = <i>Gossypium hirsutum</i>
Q9FH54	0	0	8.06	Ethylene-responsive transcription factor ERF114= ERF114 At5g61890 K22G18.1
B9RNE6	0	0	18.51	BZIP domain class transcription. Ocs element-binding factor = <i>Ricinus communis</i>
D9ZJE6	0	0	14.02	WHY domain class transcription factor. WHY2 = <i>Malus domestica</i>
B9RIZ8	0	0	2.14	BHLH domain class transcription factor. Basic helix-loop-helix (bHLH) domain = <i>Ricinus communis</i>
B9S8Y5	0	0	3.19	R2r3-myb transcription factor = <i>Ricinus communis</i>
B9SYQ1	0	0	9.56	R2r3-myb transcription factor = <i>Ricinus communis</i>
O49538	0	0	4.45	MYB transcription factor 68. At5g65790 . F6H11.100 At5g65790
A5AWY8	0	0	79.01	Zinc finger protein. putative = <i>Vitis vinifera</i>
A5C6A5	0	0	70.55	Zinc finger protein. putative = <i>Vitis vinifera</i>
B9T3B9	0	0	8.10	Transcriptional activator. putative = <i>Ricinus communis</i>
D9ZJF5	6.84	6.84	26.39	WRKY transcription factor. WRKY16 = <i>Malus domestica</i>
Subcluster C2				
Q9SSY2	17.84	92.01	96.71	Aux/IAA protein. CslAA2 = <i>Cucumis sativus</i>

Al considerar todos los 2.209 genes inducidos y 2.592 genes reprimidos del conjunto de datos, obtuvimos 94 genes de FT inducidos y 89 reprimidos durante la abscisión del fruto maduro en dos experimentos: 67 genes de FT (el 33%) fueron inducidos a 38 DPA, y reprimidos a 40 DPA (FTs inducidos tempranamente), seis (3%) fueron reprimidos a 38 DPA e inducidos a 40 DPA (FTs inducidos tardíamente), uno (0,5%) fue inducido en 38 y 40 DPA y 13 (6,5%) fueron reprimidos en 37 DPA y 40 DPA (tabla 18). Además, solo unos pocos genes fueron inducidos o reprimidos tanto en la inducción temprana como en la tardía, sugiriendo así que ocurren eventos temporales específicos, y que la mayoría de los genes están fuertemente inducidos en la ZA de fruto durante la fase de inducción temprana de la abscisión de melón.



**Figura 45.** Análisis filogenético de genes MADS-box de melón con otros genes MADS. Las secuencias incluidas en este alineamiento son de nuestro trabajo y de arabidopsis (<http://www.arabidopsis.org/>). Las IDs UniProt seguidas por asteriscos indican transcritos que muestran variaciones significantes durante abscisión (grupo I). Los niveles de expresión génica a 36, 38 y 40 DPA se indican con barras de colores. Para la muestra que presenta el nivel máximo de expresión, la abundancia de transcritos normalizada se expresa como el número de transcritos por total de transcritos. Para las otras muestras, el nivel de expresión se indica como porcentajes de la máxima abundancia de transcritos normalizada del gen, como se describe en el código de colores desde 0% (blanco) a 100% (azul oscuro)

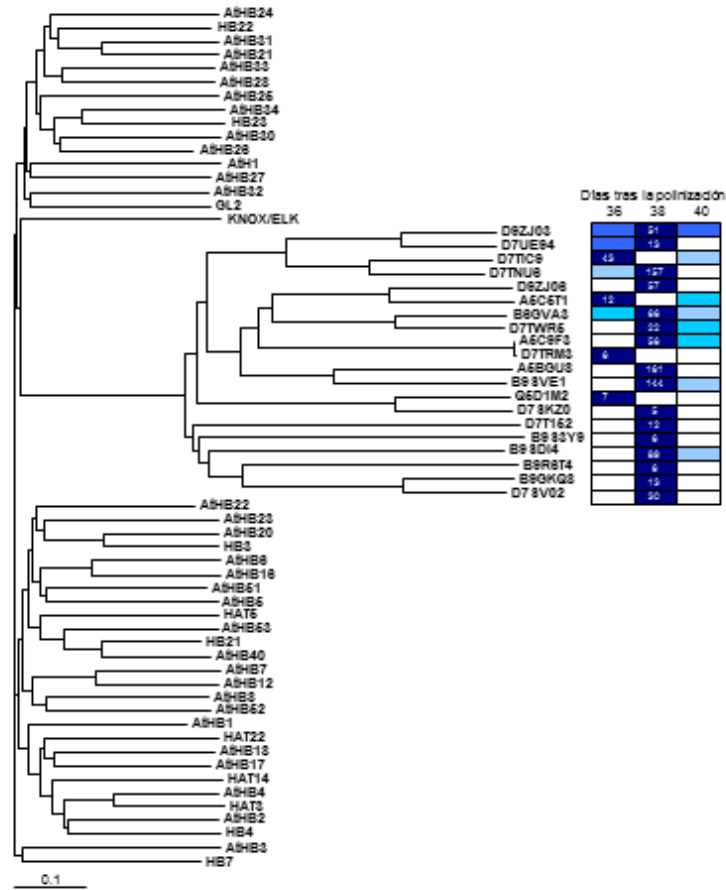
Resultados y discusión



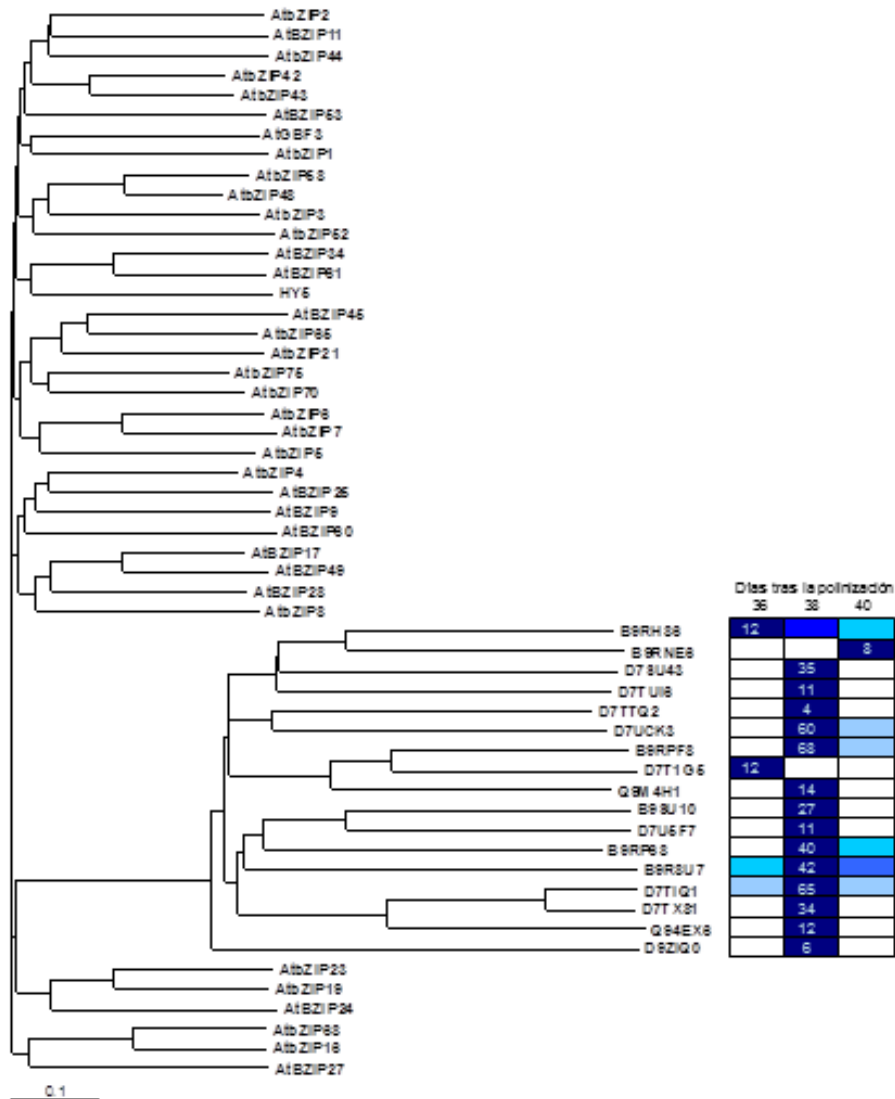
**Figura 46.** Análisis filogenético de genes zinc finger de melón con otros genes zinc finger. Las secuencias incluídas en este alineamiento son de nuestro trabajo y de arabidopsis (<http://www.arabidopsis.org/>). Las IDs UniProt seguidas por asteriscos indican transcritos que muestran variaciones significativas durante abscisión (grupo I). Los niveles de expresión génica a 36, 38 y 40 DPA se indican con barras de colores. Para la muestra que presenta el nivel máximo de expresión, la abundancia de transcritos normalizada se expresa como el número de transcritos por total de transcritos. Para las otras muestras, el nivel de expresión se indica como porcentajes de la máxima abundancia de transcritos normalizada del gen, como se describe en el código de colores desde 0% (blanco) a 100% (azul oscuro)



Resultados y discusión

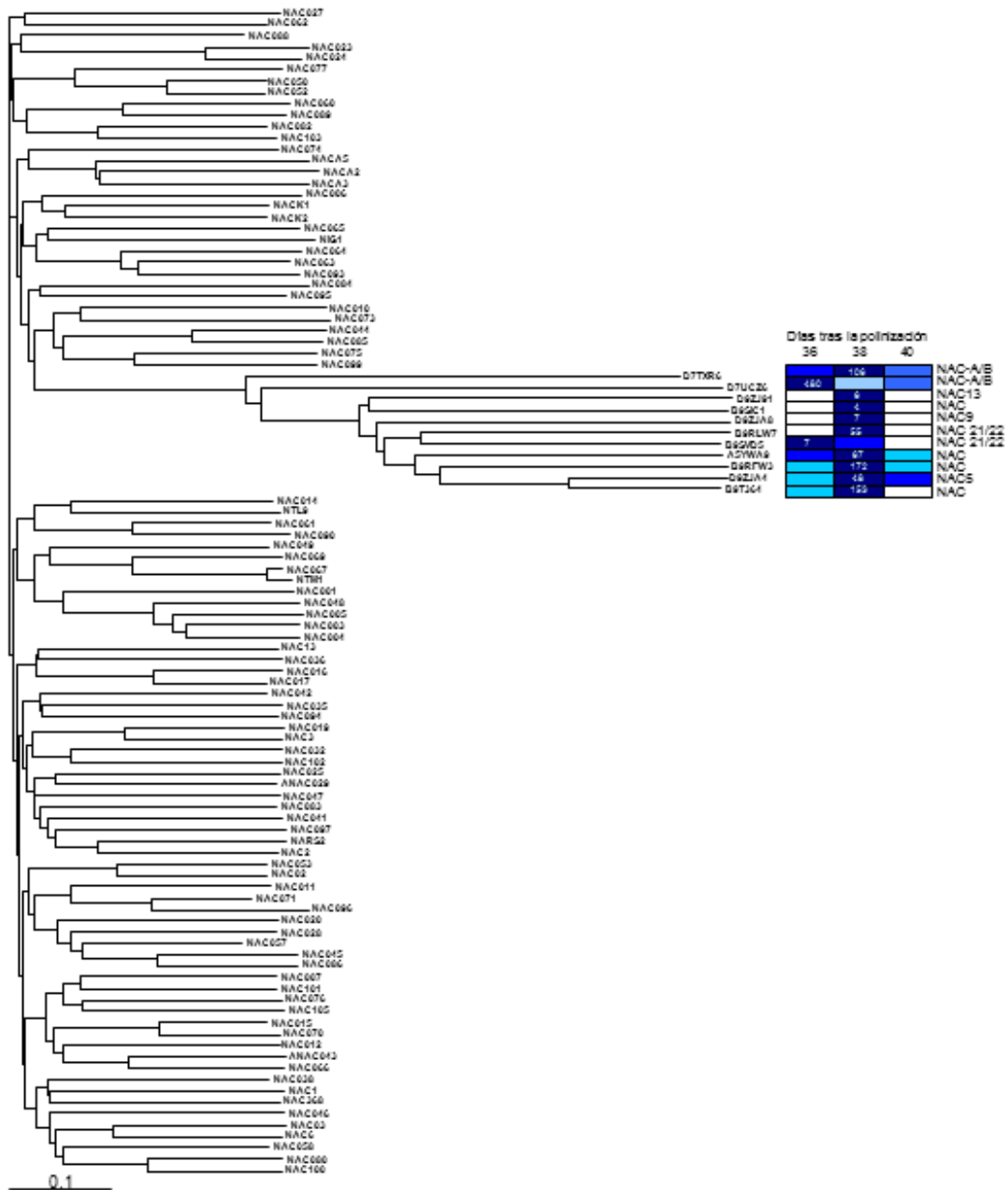


**Figura 47.** Análisis filogenético de genes homeobox de melón con otros genes homeobox. Las secuencias incluidas en este alineamiento son de nuestro trabajo y de arabidopsis (<http://www.arabidopsis.org/>). Las IDs UniProt seguidas por asteriscos indican transcritos que muestran variaciones significantes durante abscisión (grupo I). Los niveles de expresión génica a 36, 38 y 40 DPA se indican con barras de colores. Para la muestra que presenta el nivel máximo de expresión, la abundancia de transcritos normalizada se expresa como el número de transcritos por total de transcritos. Para las otras muestras, el nivel de expresión se indica como porcentajes de la máxima abundancia de transcritos normalizada del gen, como se describe en el código de colores desde 0% (blanco) a 100% (azul oscuro)

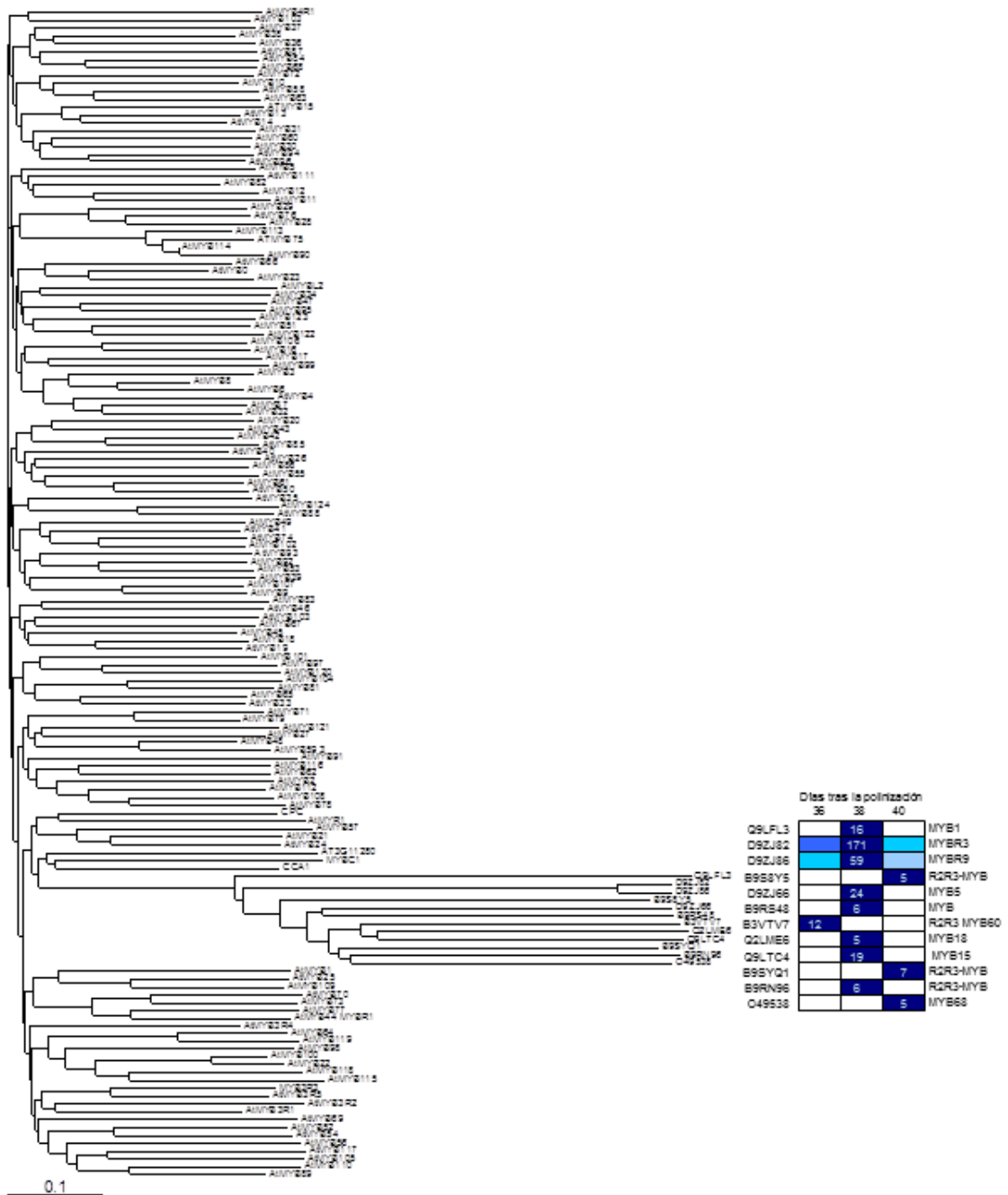


**Figura 48.** Análisis filogenético de genes bZIP de melón con otros genes bZIP. Las secuencias incluidas en este alineamiento son de nuestro trabajo y de arábidopsis (<http://www.arabidopsis.org/>). Las IDs UniProt seguidas por asteriscos indican transcritos que muestran variaciones significantes durante abscisión (grupo I). Los niveles de expresión génica a 36, 38 y 40 DPA se indican con barras de colores. Para la muestra que presenta el nivel máximo de expresión, la abundancia de transcritos normalizada se expresa como el número de transcritos por total de transcritos. Para las otras muestras, el nivel de expresión se indica como porcentajes de la máxima abundancia de transcritos normalizada del gen, como se describe en el código de colores desde 0% (blanco) a 100% (azul oscuro)

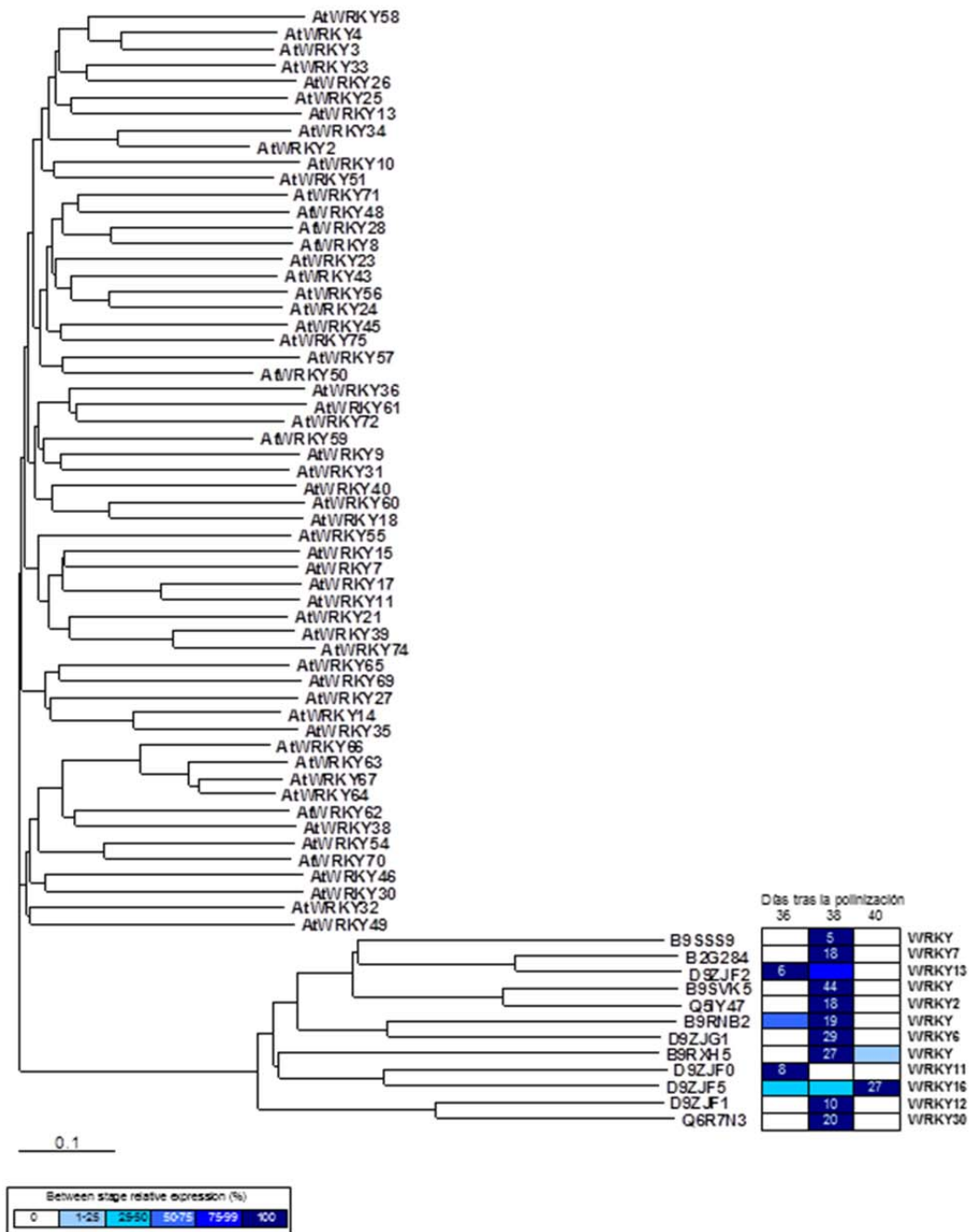
Resultados y discusión



**Figura 49.** Análisis filogenético de genes NAC de melón con otros genes NAC. Las secuencias incluidas en este alineamiento son de nuestro trabajo y de arabisopsis (<http://www.arabidopsis.org/>). Las IDs UniProt seguidas por asteriscos indican transcritos que muestran variaciones significantes durante abscisión (grupo I). Los niveles de expresión génica a 36, 38 y 40 DPA se indican con barras de colores. Para la muestra que presenta el nivel máximo de expresión, la abundancia de transcritos normalizada se expresa como el número de transcritos por total de transcritos. Para las otras muestras, el nivel de expresión se indica como porcentajes de la máxima abundancia de transcritos normalizada del gen, como se describe en el código de colores desde 0% (blanco) a 100% (azul oscuro)

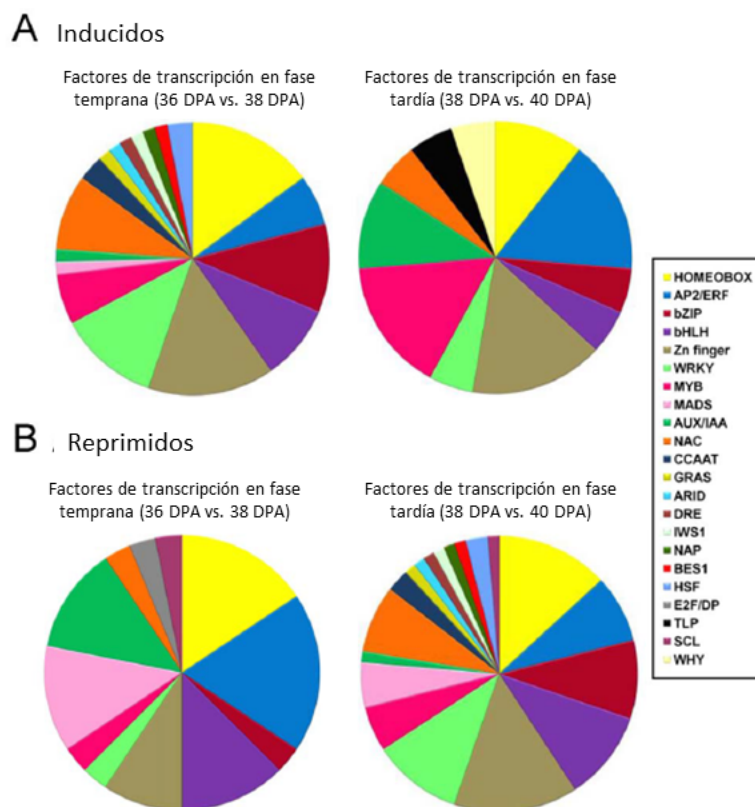


**Figura 50.** Análisis filogenético de genes MYB de melón con otros genes MYB. Las secuencias incluidas en este alineamiento son de nuestro trabajo y de arábidopsis (<http://www.arabidopsis.org/>). Las IDs UniProt seguidas por asteriscos indican transcritos que muestran variaciones significativas durante abscisión (grupo I). Los niveles de expresión génica a 36, 38 y 40 DPA se indican con barras de colores. Para la muestra que presenta el nivel máximo de expresión, la abundancia de transcritos normalizada se expresa como el número de transcritos por total de transcritos. Para las otras muestras, el nivel de expresión se indica como porcentajes de la máxima abundancia de transcritos normalizada del gen, como se describe en el código de colores desde 0% (blanco) a 100% (azul oscuro)



**Figura 51.** Análisis filogenético de genes WRKY de melón con otros genes WRKY. Las secuencias incluidas en este alineamiento son de nuestro trabajo y de arabidopsis (<http://www.arabidopsis.org/>). Las IDs UniProt seguidas por asteriscos indican transcritos que muestran variaciones significantes durante abscisión (grupo I). Los niveles de expresión génica a 36, 38 y 40 DPA se indican con barras de colores. Para la muestra que presenta el nivel máximo de expresión, la abundancia de transcritos normalizada se expresa como el número de transcritos por total de transcritos. Para las otras muestras, el nivel de expresión se indica como porcentajes de la máxima abundancia de transcritos normalizada del gen, como se describe en el código de colores desde 0% (blanco) a 100% (azul oscuro)

## Resultados y discusión



**Figura 52.** TFs de melón inducidos (A) o reprimidos (B) en la ZA de fruto durante la inducción temprana y tardía de la abscisión de melón. Información adicional sobre genes relacionados con FTs se presenta en el anexo 20

Entre los FTs inducidos de manera temprana, encontramos proteínas HSF, proteínas de unión a CCAAT, proteína ARID, proteína DRE, proteína Nut2, proteína NAP, BES1/BZR1 (proteína bHLH, BEH4), y proteína IWS1 a las que no se les había atribuido previamente funciones en abscisión. (tabla 18). Las familias más grandes de FT inducidos de manera temprana fueron las DZ (10 genes), WRKY (8 genes), y bZIP (7 genes), lo que implica que los FTs de estas familias podrían estar involucrados en activar la cascada transcripcional durante la abscisión. Sin embargo, dentro del conjunto de los 107 FTs conocidos o con predicción a inducirse o reprimirse durante la inducción tardía de la abscisión de melón, encontramos que solo 6 de los 20 genes exclusivamente inducidos a 40 DPA eran reprimidos a 38 DPA. Por tanto, puede decirse que los 6 genes inducidos: un AP2/ERF (RAP2,3), un zinc finger (C2H2L24), un Aux/IAA, un NAC (NAC-A/B) y dos proteínas homeobox, son firmes candidatos para posibles funciones en regulación de rutas que son activadas específicamente durante los eventos tardíos de la abscisión de melón.

Aunque se identificaron muchos tipos de FT durante la abscisión de melón, no se encontraron los tipos ARF ni KNOTTED-like homeobox (KNOX) entre los genes de FT que

se expresaban diferencialmente ( $P < 0,01$ ) en nuestros experimentos. Esto fue inesperado ya que muchos FTs ARF participan durante la abscisión de fruto inmaduro en manzana (Dal Cin y cols., 2009; Botton y cols., 2011), y muchos KNOX son importantes para regular la correcta sincronización de la separación de órganos florales mediante la limitación de células de la ZA (Shi y cols., 2011).

Sin embargo, los análisis de FT también revelaron algunas similitudes, como en el caso de las proteínas AP2/ERF, MYB, ZF, WRKY y NAC, presentes en estudios previos en abscisión de fruto inmaduro (Botton y cols., 2011; Dal Cin y cols., 2009), y que proporcionan una visión dentro de los procesos reguladores que ocurren durante la abscisión. Además, este estudio revela una mayor resolución de estos eventos. Por tanto, para el cluster A, enriquecido en las familias de FT AP2/ERF, Aux/IAA, y MADS-box, puede observarse que estos FTs son abundantes a 36 DPA en la ZA de frutos, y decrecen durante la inducción temprana de la abscisión de melón, pero se incrementan, disminuyen o permanecen sin cambios durante la fase de inducción tardía. En contraste, el cluster B está enriquecido en proteínas bZIP, homeobox, WRKY y DZ, mientras que el cluster C está enriquecido en la familia MYB. Por lo tanto, a pesar de que todos los cluster contienen miembros de muchas familias de FT, hay una diferencia clara y significativa en la proporción de familias en cada cluster, lo que implica un requerimiento de regulación específica temporal para la expresión de estos FTs.

Un total de 15 proteínas zinc finger en el análisis indican que esta clase de FTs es una de las más representadas en la ZA del fruto de melón. En realidad, un gen ZP, AtZFP2 (Cai y Lashbrook, 2008), presenta una senescencia floral y abscisión retrasadas, y se ha observado que AtZFP2 puede interactuar con DNA BINDING WITH ONE FINGER (AtDOF4.7) para suprimir la expresión de PGAZAT (Wei y cols., 2010). En nuestros datos, 10 de los 15 genes DZ (un C2H2L9, un GATA, 2 RING-ZF y 6 DZs no caracterizados) están entre los FTs inducidos inicialmente, y 3 de los 15 genes zinc finger (SAP5, C2H2L24, C2H2L28) están entre los FTs reprimidos inicialmente, lo que sugiere una acción coordinada de proteínas zinc finger en la regulación de la abscisión de melón.

Nuestros resultados también revelan el aumento de solo un gen MADS-box, y 10 genes homeobox (HD1, HD12, 3 BEL1 y otros 5 genes homeobox) a 38 DPA, lo cual sugiere una función en la regulación de la abscisión de melón. Además, nuestros análisis han revelado que 8 de los genes WRKY (WRKY2, WRKY6, WRKY7, WRKY12, WRKY30, entre otros) aumentan exclusivamente durante la inducción tardía de la abscisión de melón, lo cual es consistente con los estudios previos donde la expresión de algunos genes WRKY está

inducida durante la abscisión floral (Meir y cols., 2010), lo que sugiere que el primer incremento transitorio de genes WRKY es una respuesta a daños, mientras que el segundo incremento, podría estar involucrado en la regulación de una respuesta de defensa a patógenos.

En este contexto, entre los FTs bZIP aumentados a 38 DPA, los genes *HY5* y *RF2A* fueron reprimidos durante la inducción tardía de la abscisión de melón. *HY5* es conocido por mediar la respuesta a luz (Osterlund y cols., 2000), mientras que *RF2* y *RF2b* han sido identificados por sus funciones relacionadas potencialmente a respuesta o señalización a estreses bióticos o abióticos (Liu y cols., 2007). Sin embargo, es desconocido si estos genes median el proceso de abscisión. Previamente, se sugirió que tres genes bZIP tipo TGA estaban involucrados en abscisión y en la regulación de la expresión de genes relacionados con abscisión (Tucker y cols., 2002). Distintos perfiles de expresión de estos genes bZIP durante la abscisión indican que las proteínas bZIP pueden actuar como reguladores iniciales positivos en la señalización de este proceso.

Un análisis equivalente de los genes de FTs inhibidos identificados en ambos experimentos, proporcionó un resultado muy diferente. Mientras el 78% (73 de 94) del total de FTs inducidos mostró una expresión incrementada durante la inducción temprana de la abscisión, el 70% (86 de 122) del total de los FTs reprimidos mostró un descenso de expresión durante la etapa de inducción tardía.

Estos resultados parecen indicar que en la abscisión de melón se produce la represión de muchos FTs, pero, en la mayoría de casos, esta represión no es parte del programa endógeno de cambios tempranos en la expresión génica requerida para la abscisión. Sin embargo, en nuestro análisis paralelo de genes reprimidos, la mayoría de miembros de las familias MADS box y Aux/IAA fueron encontrados durante la inducción temprana de la abscisión, lo que sugiere que la represión de esta expresión de FTs participa en los eventos tempranos. Cuando comparamos los genes de FTs reprimidos durante la inducción temprana y tardía de la abscisión, encontramos la presencia de 13 FT reprimidos, incluyendo una proteína Aux/IAA, dos proteínas bHLH, tres proteínas AP2/ERF (*ERF1*, *AP2D15*, *ERF*), tres proteínas MADS box (*FLC*, *MADS2*, *ERAF17*), una proteína zinc finger (*SAP5*), una proteína SCL (*SCL13*) y un FT no caracterizado. Todos fueron comunes en ambas etapas en la ZA de frutos durante la abscisión, lo que sugiere que hay reguladores comunes entre la inducción temprana y tardía de este proceso. Así, parece probable que



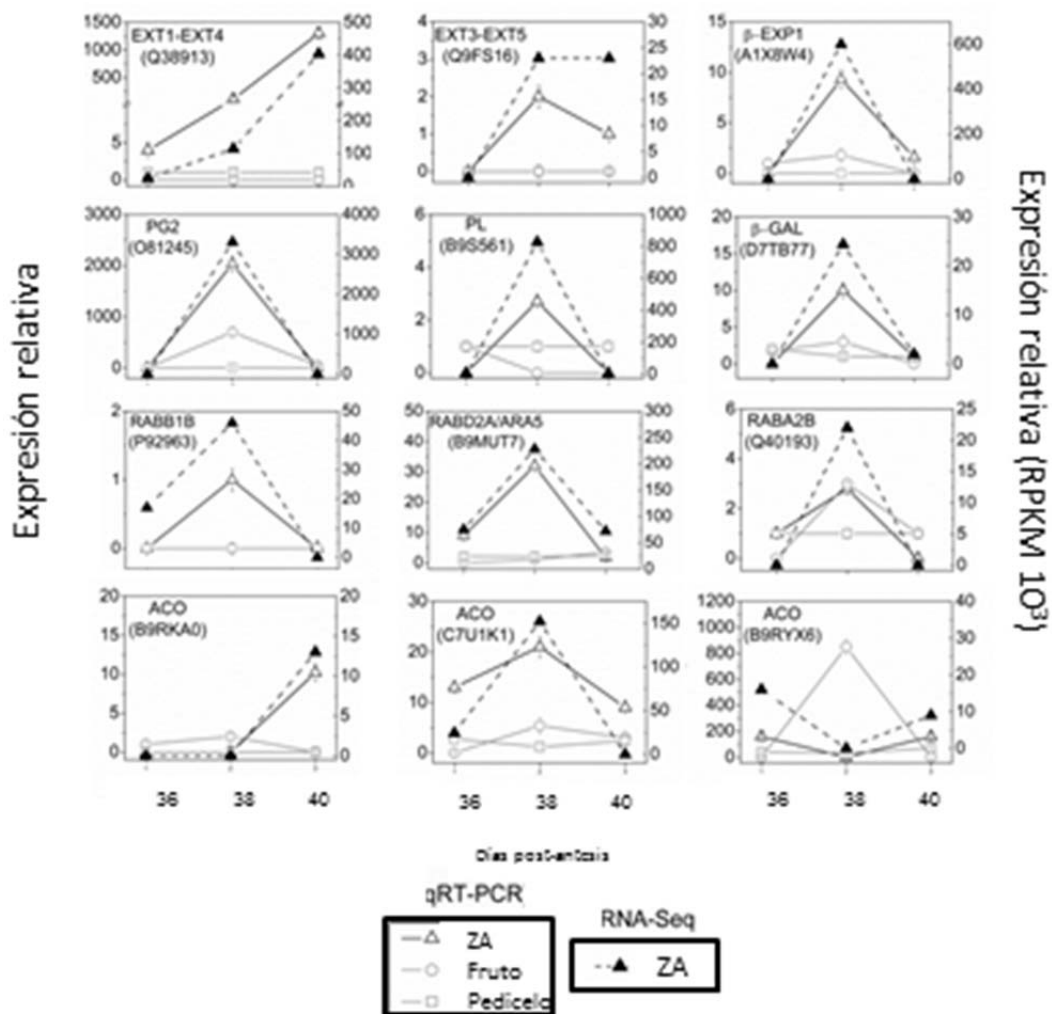
una batería de FTs reprimidos podría ser necesaria para coordinar la separación celular durante la abscisión de melón.

Como conclusión, este análisis provee información novedosa sobre los potenciales genes y rutas candidatos asociados con la abscisión. En la fase de inducción temprana, los genes activados están relacionados con un metabolismo de pared celular, tráfico de endomembranas, fosforilación de proteínas, biosíntesis y señalización de fitohormonas y flujos iónicos. Los eventos tempranos están potencialmente controlados por la represión de los FTs MADS-box, AP2/ERF y Aux/IAA, y la inducción de los FTs bZIP, homeobox, zinc finger, y WRKY, mientras que los eventos tardíos podrían estar controlados mayoritariamente por la inducción de los FTs MYB durante la inducción de la abscisión de melón.

De entre los FTs inducidos en fase temprana, a las proteínas HSF, las proteínas de unión a CCAAT, la proteínas ARID, DRE, Nut2, NAP, BES1/BZR1 (proteína bHLH, BEH4), y IWS1 no les habían sido descritas funciones en abscisión previamente. Actualmente, se conoce poco sobre los genes potenciales de la ZA que regulan la abscisión en fruto carnoso. Por tanto, nuestro perfil de expresión génica será muy útil para dilucidar las redes de regulación de genes de la abscisión, lo cual podría guiar a nuevas estrategias para la mejora de cultivos.

#### **4.3.6. Confirmación de los patrones de expresión génica durante la abscisión de fruto maduro de melón**

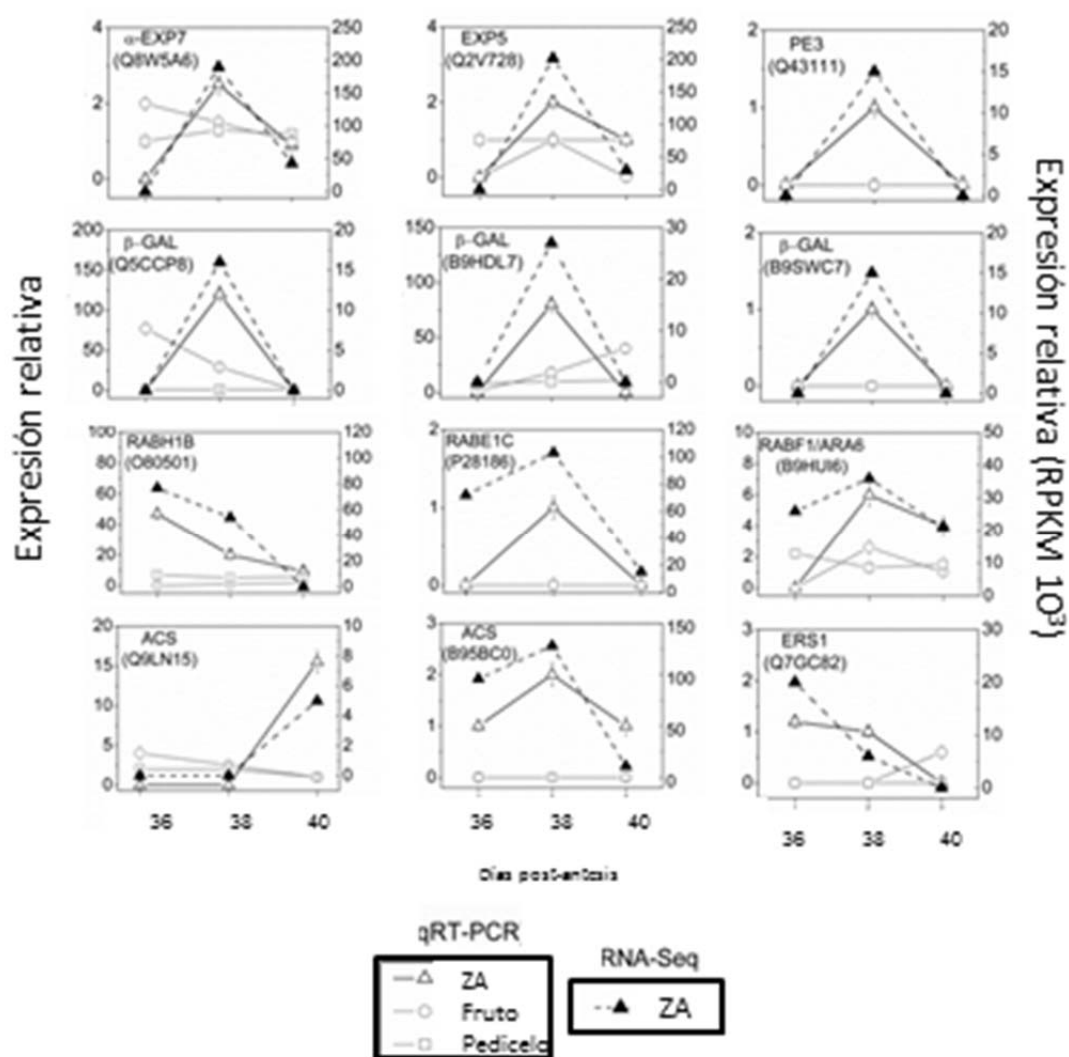
Para verificar los resultados del análisis de pirosecuenciación, se realizó un análisis qRT-PCR de los genes en los que está enriquecida la ZA durante la inducción de la abscisión. Los 47 genes seleccionados se muestran en las Figs. 53, 54, 55 y 56. De entre los transcritos asociados con abscisión, los genes que codifican enzimas claves involucradas en el metabolismo de pared celular, tal como PE3 (Q43111),  $\beta$ -EXP1 (A1X8W4),  $\alpha$ -EXP7 (Q8W5A6), EXP5 (Q2V728), PL (B9S561), PG2 (O81245) y  $\beta$ -GALs (D7TB77, B9HDL7, Q5CCP8, B9SWC7) fueron inducidos a 38 DPA y reprimidos a 40 DPA en la ZA, lo cual era idéntico a los resultados obtenidos de RNA-seq. También validamos la expresión incrementada de genes EXT1-EXT4 (Q38913) y EXT3-EXT5 (Q9FS16) a 38 DPA, así como la expresión incrementada del gen EXT1-EXT4 a 40 DPA.



**Figura 53.** Confirmación de los patrones de expresión génica aumentados o disminuidos durante la abscisión de melón. Análisis qRT-PCR de 16 genes seleccionados (EXT1-EXT4, EXT3-EXT5,  $\beta$ -EXP1, PG2, PL,  $\beta$ -GAL, RABB1B, RABD2A/ARA5, RABA2B, y 3 ACOs) en varios tejidos de melón a 36, 38 y 40 DPA: ZA (- $\Delta$ -), pedicelo (próximo, no ZA - $\square$ -) y mesocarpo del fruto (distal, no ZA - $\circ$ -). Análisis de niveles de transcritos de genes mediante RT-PCR cuantitativa. Los genes y sus primers se muestran en el anexo 21. Los valores de expresión relativa fueron normalizados, tomando el valor menor de expresión como 1. Los datos representan los valores medios ( $\pm$ SEs) de experimentos duplicados a partir de tres muestras biológicas independientes. Las líneas discontinuas (- $\blacktriangle$ -) muestran perfiles de expresión de genes en la ZA de melón según fueron reconstruidos a partir del transcriptoma obtenido por pirosecuenciación 454. Las líneas discontinuas indican el total de lecturas contadas en RPKMx1000 para cada gen tras la normalización a través de las muestras: ZA a 36, 38 y 40 DPA

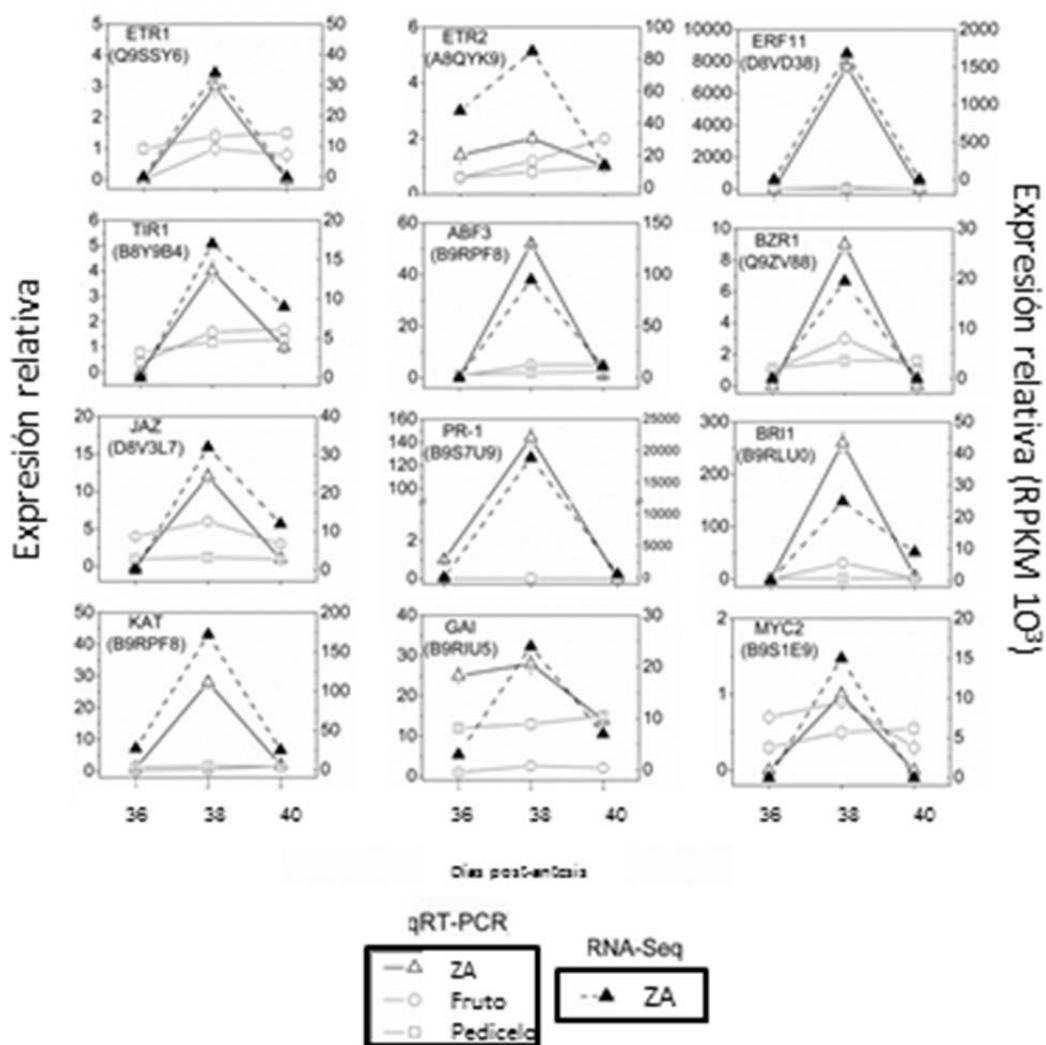
De manera similar confirmamos la expresión incrementada de genes que codifican enzimas involucradas en el tráfico de vesículas, y en el metabolismo de fitohormonas y señalización, tales como RabA2b (Q40193), RabB1b (P92963), RabE1c (P28186), RabD2a/ARA5 (B9MUT7), RabF1/ARA6 (B9HUI6), un ACS (B95BC0), un ACO(C7U1K1), ETR1 (Q9SSY6), ETR2 (A8QYK9), ERF11 (D8VD38), ADC (B3Y023), IAA2 (Q9SSY2), GH3.5 (O81829), TIR1 (B8Y9B4), ABF3 (B9RPF8), NCED (B9S0Z6), SnRK (B9RVE0), KAT (B9RPF8), JAZ (D8V3L7), MYC2 (B9S1E9), NPR1 (B9S3I0), PAL (B9SOK2), PR-1 (B9S7U9),

BRI1(B9RLU0), BAK1 (B9RUI5), BZR1 (Q9ZV88), y ARRB (D7TTG7) a 38 DPA, así como los genes reprimidos RabH1b (O80501) y un ACO (B9RYX6) a 38 DPA en la ZA. El nivel de expresión de una ACS (Q9LN15), una ACO (B9RKA0), y IAA2 a 40 DPA se incrementó, lo cual era consistente con los resultados de RNA-seq. Por otro lado, los resultados revelaron una represión de un gen DZ, SAP5, durante la inducción de la abscisión, lo cual era idéntico a los resultados de RNA-seq. Por tanto, los resultados qRT-PCR eran consistentes con los datos de pirosecuenciación, indicando que los resultados obtenidos del análisis de pirosecuenciación eran efectivos.

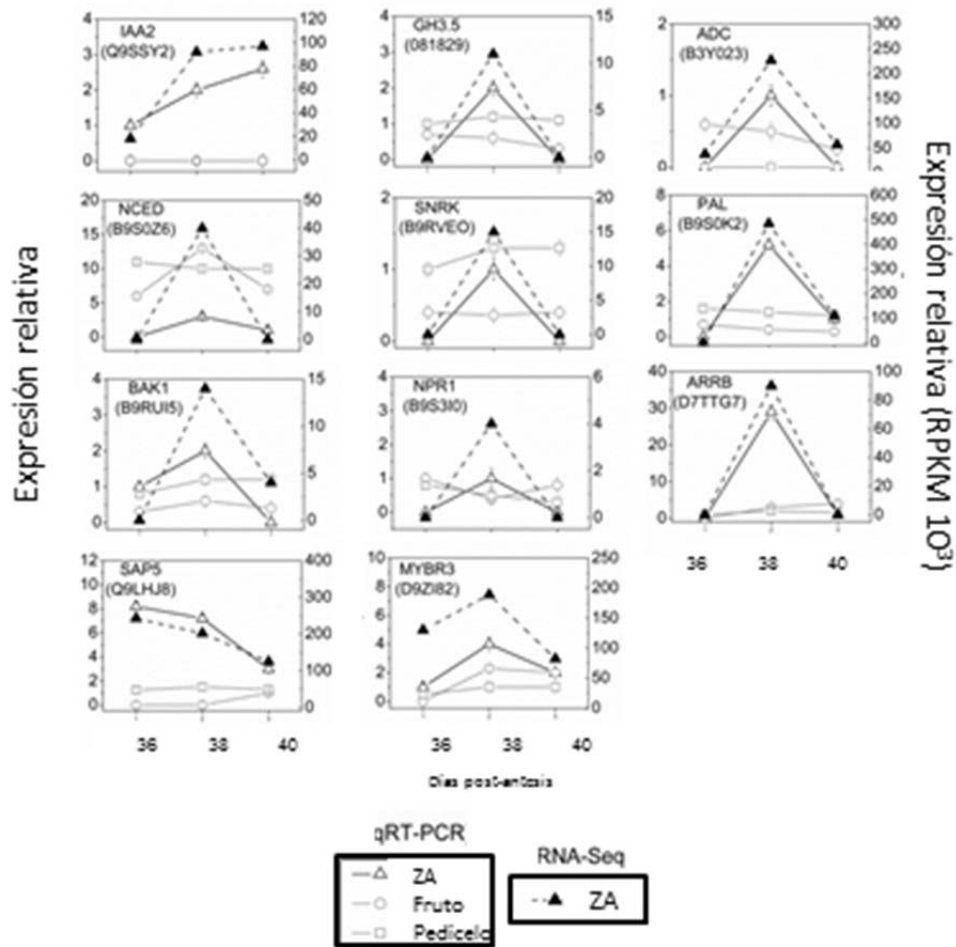


**Figura 54.** Confirmación de los patrones de expresión génica aumentados o disminuidos durante la abscisión de melón. Análisis qRT-PCR de 16 genes seleccionados ( $\alpha$ -EXP7,  $\alpha$ -EXP5, PE3, 3  $\beta$ -GALs, RABH1B, RABE1C, RABF1/ARA6, 2 ACSs, y ERS) en varios tejidos de melón a 36, 38 y 40 DPA: ZA ( $\Delta$ ), pedicelo (próximo, no ZA  $\square$ ) y mesocarpo del fruto (distal, no ZA  $\circ$ ). Análisis de niveles de transcritos de genes mediante RT-PCR cuantitativa. Los genes y sus primers se muestran en el anexo 21. Los valores de expresión relativa fueron normalizados, tomando el valor menor de expresión como 1. Los datos representan los valores medios ( $\pm$ SEs) de experimentos duplicados a partir de tres muestras biológicas independientes. Las líneas discontinuas ( $\blacktriangle$ ) muestran perfiles de expresión de genes en la ZA de melón según fueron reconstruidos a partir del transcriptoma obtenido por pirosecuenciación 454. Las líneas discontinuas indican el total de lecturas contadas en RPKMx1000 para cada gen tras la normalización a través de las muestras: ZA a 36, 38 y 40 DPA

Además, se comprobó la especificidad de tejido de estos genes usando qRT-PCR, lo cual confirmó su enriquecimiento en la ZA. Demostramos que el patrón de expresión en la ZA de algunos genes realizada por qRT-PCR es diferente del patrón de expresión en tejidos adyacentes (pedicelo o mesocarpo) (Figs 53, 54, 55 y 56). De hecho, la mayoría de los transcritos se acumularon más en la ZA, lo que sugiere la participación de estos genes en los eventos de abscisión.



**Figura 55.** Confirmación de los patrones de expresión génica aumentados o disminuidos durante la abscisión de melón. Análisis qRT-PCR de 16 genes seleccionados (ETR1, ETR2, ERF11, TIR1, ABF3, BZR1, JAZ, PR-1, BRI1, KAT, GAI, MYC2) en varios tejidos de melón a 36, 38 y 40 DPA: ZA (-Δ-), pedicelo (próximo, no ZA -□-) y mesocarpo del fruto (distal, no ZA -○-). Análisis de niveles de transcritos de genes mediante RT-PCR cuantitativa. Los genes y sus primers se muestran en el anexo 21. Los valores de expresión relativa fueron normalizados, tomando el valor menor de expresión como 1. Los datos representan los valores medios ( $\pm$ SEs) de experimentos duplicados a partir de tres muestras biológicas independientes. Las líneas discontinuas (-▲-) muestran perfiles de expresión de genes en la ZA de melón según fueron reconstruidos a partir del transcriptoma obtenido por pirosecuenciación 454. Las líneas discontinuas indican el total de lecturas contadas en RPKMx1000 para cada gen tras la normalización a través de las muestras: ZA a 36, 38 y 40 DPA



**Figura 56.** Confirmación de los patrones de expresión génica aumentados o disminuidos durante la abscisión de melón. Análisis qRT-PCR de 16 genes seleccionados (IAA2, GH3.5, ADC, NCED, SNRK, PAL, BAK1, ARR1, SAP5, MYBR3) en varios tejidos de melón a 36, 38 y 40 DPA: ZA (-Δ-), pedicelo (próximo, no ZA -□-) y mesocarpo del fruto (distal, no ZA -○-). Análisis de niveles de transcritos de genes mediante RT-PCR cuantitativa. Los genes y sus primers se muestran en el anexo 21. Los valores de expresión relativa fueron normalizados, tomando el valor menor de expresión como 1. Los datos representan los valores medios ( $\pm$ SEs) de experimentos duplicados a partir de tres muestras biológicas independientes. Las líneas discontinuas (-▲-) muestran perfiles de expresión de genes en la ZA de melón según fueron reconstruidos a partir del transcriptoma obtenido por pirosecuenciación 454. Las líneas discontinuas indican el total de lecturas contadas en RPKMx1000 para cada gen tras la normalización a través de las muestras: ZA a 36, 38 y 40 DPA

En conclusión, este análisis provee una nueva información para los genes candidatos y rutas asociadas con la inducción temprana de la abscisión en frutos carnosos. En la inducción temprana de la abscisión de melón, los genes activados están relacionados con el metabolismo de pared celular, el tráfico endomembrana, la fosforilación de proteínas, la biosíntesis y señalización de hormonas vegetales y el flujo iónico. Los eventos tempranos están potencialmente controlados por la represión de los FTs MADS-box, AP2/ERF, y Aux/IAA y la inducción de los FTs bZIP, ZF homeobox, y WRKY, mientras que los eventos tardíos podrían estar controlados principalmente por la inducción de FTs MYB durante la inducción de la abscisión.

De entre los FTs inducidos en fase temprana, las proteínas HSF, proteínas de unión a CCAAT, proteína ARID, proteína DRE, proteína Nut2, proteína NAP, BES1/BZR1 (proteína bHLH, BEH4), y proteína IWS1 no han tenido funciones descritas previamente en abscisión. Por el momento se conoce poco sobre los genes potenciales de la ZA regulando la abscisión en fruto carnoso. Por lo tanto, el perfil de expresión génica aportado será muy útil para dilucidar las redes de genes reguladores de la abscisión de fruto maduro en fruto carnoso.

## **CAPÍTULO 4:**

### **ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE TRANSPORTADORES ABC DURANTE LA MADURACIÓN Y POSTCOSECHA DEL FRUTO**

La familia de transportadores ABC es una de las familias proteicas más numerosas, con una gran diversidad funcional entre sus miembros. Las funciones de muchos transportadores pertenecientes a esta familia son aún desconocidas en plantas, y por tanto, en melón. En este trabajo se analizó la expresión de transcritos de varios genes ABC: ABCB25, ABCC2, ABCC4, ABCD1, ABCD2, ABCE2, ABCF1, ABCF3, ABCF4, ABCF5, ABCG23, ABCI6 y ABCI17, (tabla 19). Casi todos los transcritos presentaron una longitud similar de entre 400 a 600 pares de bases aproximadamente, con la excepción de CmABCF1, que resultó tener una longitud aún mayor. Se realizó un BLAST con el objetivo de encontrar las secuencias presentes en otras especies con mayor homología posible. Todos los transcritos resultaron poseer una alta homología con genes de *Cucumis sativus*, especie muy cercana filogenéticamente al melón. Esto indica que podría existir una similitud funcional además de estructural entre sus proteínas.

Los transportadores estudiados representan a todas las subfamilias encontradas en plantas hasta la actualidad (Verrier y cols., 2008). Con el objetivo de investigar su expresión, se realizaron diversos análisis mediante qRT-PCR, utilizando primers específicos de cada uno (Tabla 2). Se estudió la expresión en diferentes tejidos de la planta de melón, así como de la pulpa del fruto a diferentes momentos del proceso de maduración y tras la cosecha. Además, se realizó un alineamiento de secuencias de las proteínas de melón estudiadas junto con proteínas ABC identificadas hasta la fecha en *Arabidopsis thaliana* y posteriormente, un análisis filogenético.

#### **4.4.1. Análisis filogenético de proteínas ABC**

Con el objetivo de estudiar el nivel de semejanza entre las proteínas ABC analizadas en melón y aquellas pertenecientes a *Arabidopsis*, se realizó un alineamiento de secuencias y un árbol filogenético (Fig. 57) mediante el software MEGA6.0. Para ello, se utilizaron las 13 secuencias de proteínas ABC de *Cucumis melo*, y 131 secuencias de proteínas conocidas en *Arabidopsis thaliana* (Verrier y cols., 2008).

**Tabla 19.** Relación de proteínas ABC de melón estudiadas en primera columna, longitud en pares de bases en segunda columna y proteína con mayor homología de otras especies en la tercera columna.

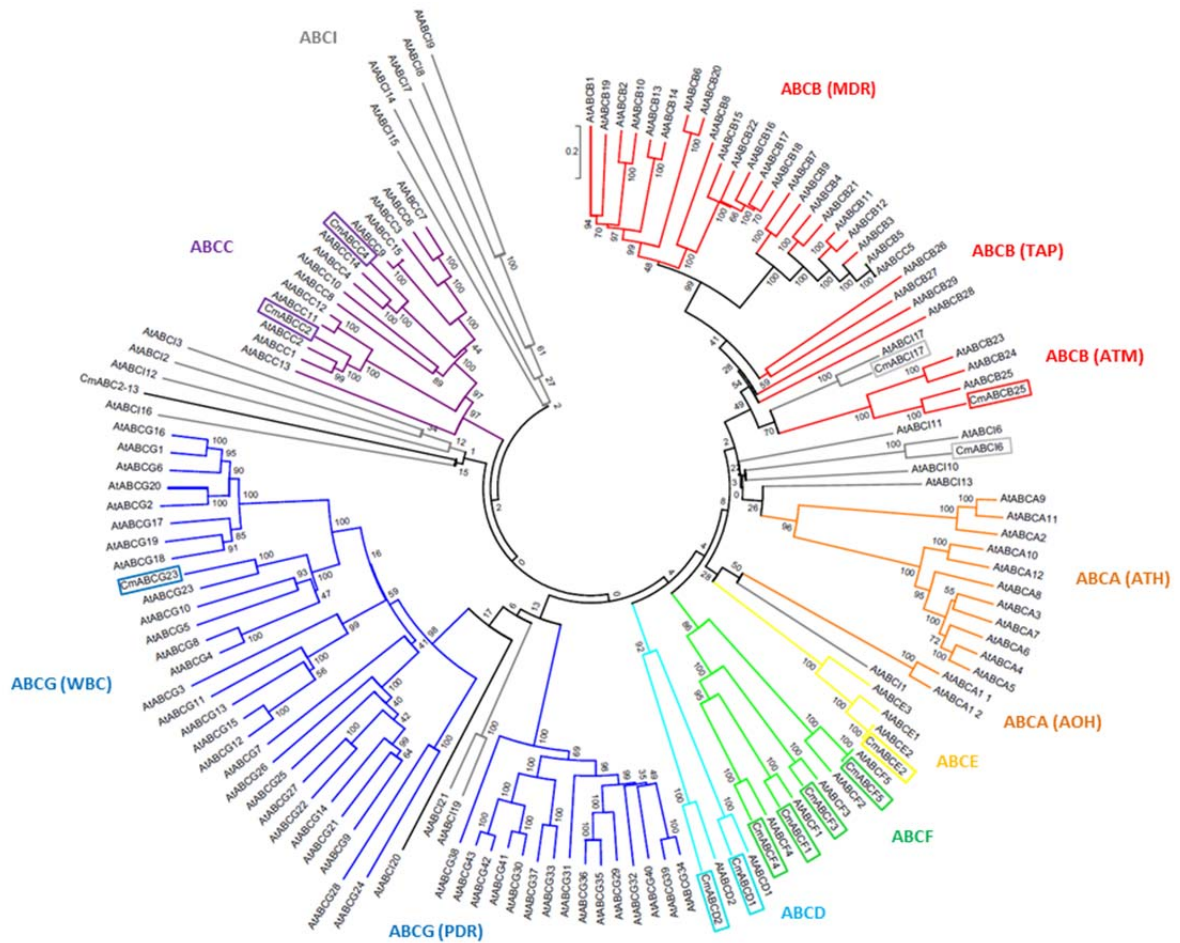
Nombre	Pares de bases	Homología
<b>CmABCB25</b>	658	ABCB25 - <i>Cucumis sativus</i> 94%
<b>CmABCC2</b>	430	ABCC2 - <i>Cucumis sativus</i> 95%
<b>CmABCC4</b>	580	ABCC4 - <i>Cucumis sativus</i> 98%
<b>CmABCD1</b>	674	ABCD1 - <i>Cucumis sativus</i> 96%
<b>CmABCD2</b>	512	ABCD2 - <i>Cucumis sativus</i> 97%
<b>CmABCE2</b>	593	ABCE2 - <i>Cucumis sativus</i> 98%
<b>CmABCF1</b>	829	ABCF1 - <i>Cucumis sativus</i> 91%
<b>CmABCF3</b>	562	ABCF3 - <i>Cucumis sativus</i> 94%
<b>CmABCF4</b>	605	ABCF4 - <i>Cucumis sativus</i> 96%
<b>CmABCF5</b>	467	ABCF5 - <i>Cucumis sativus</i> 97%
<b>CmABCG23</b>	533	ABCG23 - <i>Cucumis sativus</i> 98%
<b>CmABCI6</b>	613	ABCI6 - <i>Cucumis sativus</i> 98%
<b>CmABCI17</b>	568	ABCI17 - <i>Cucumis sativus</i> 97%

El análisis agrupó a las proteínas en las 8 subfamilias de transportadores ABC en las que se clasifican actualmente, de acuerdo con las subfamilias en las que fueron clasificadas en animales: ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF, ABCG y ABCI. No ha sido encontrado ningún miembro de la subfamilia ABCH en plantas (Nguyen y cols., 2014). Los miembros de cada subfamilia fueron agrupados juntos, aunque llama la atención la dispersión de los miembros de la subfamilia ABCI, que formaron varios subgrupos en localizaciones separadas. Algunas de las subfamilias se encuentran a su vez divididas en grupos menores, esto es debido a que dentro de estas subfamilias existen grupos de similitud estructural o funcional entre algunos miembros. Clasificaciones anteriores de proteínas ABC en plantas se realizaron en base a estos subgrupos, anteriores a la utilización del sistema de subfamilias ABCA-ABCI, por lo que no es extraño encontrar nomenclaturas diferentes para muchas de las proteínas estudiadas (Verrier y cols., 2008).

Estructuralmente existen diferencias importantes entre las diferentes subfamilias de proteínas ABC. A grandes rasgos, las subunidades de las familias ABCA, ABCB, ABCC y ABCD presentan la conocida como configuración “hacia delante” con el dominio transmembrana precediendo al dominio de unión a nucleótidos (TMD-NBD), los miembros de la subfamilia ABCG, por el contrario, presentan una configuración reversa (NBD-TMD), mientras que los miembros solubles de las familias ABCE y ABCF consisten únicamente en dos dominios NBDs. Por último, la familia ABCI engloba a genes que codifican un solo dominio, pudiendo ser TMD, NBD u otros dominios accesorios (Verrier y cols., 2008). Esta podría ser la razón de su dispersión en el árbol filogenético (Fig. 57).



La subfamilia ABCA, señalada en color naranja en el árbol (Fig. 57) cuenta con 13 miembros identificados hasta la fecha en Arabidopsis. En el árbol puede visualizarse la división entre los subgrupos AOH (ABC one homologue) en el que solo se encuentra AtABCA1, un transportador de tamaño completo, y ATH (ABC two homologue) en el que se encuadran las demás, siendo transportadores de medio tamaño (Kang y cols., 2011). De esta subfamilia no fue analizado ningún miembro de melón.



**Figura 57.** Árbol filogenético mostrando relaciones previstas entre las proteínas ABC de melón analizadas en este trabajo y la familia ABC de Arabidopsis thaliana. Se analizaron 13 proteínas ABC de melón y 131 de Arabidopsis. Cada subfamilia se encuentra marcada con un color diferente. Los valores numéricos indican distancias evolutivas previstas

De la subfamilia ABCB, señalada en color rojo en el árbol filogenético, se utilizaron las 29 secuencias de miembros identificados en Arabidopsis. Los miembros de esta subfamilia se dividen en tres subgrupos: MDR (multi-drug resistance) con transportadores de tamaño completo, TAP (transporter associated with antigen processing) y ATM (ABC transporter of mitochondria) ambos conteniendo transportadores de medio tamaño (Kang y cols.,

2011). En el árbol filogenético (Fig. 57) se observa como dentro de la familia ABCB se forman dos grupos diferentes dependiendo de la estructura de tamaño completo o medio tamaño de los componentes. La proteína de melón de esta subfamilia estudiada fue CmABCB25. Al realizar el alineamiento y árbol filogenético se observó que poseía una gran homología con la proteína homóloga AtABCB25 de *Arabidopsis*, perteneciendo ambas al subgrupo ATM junto con las proteínas AtABCB23 y AtABCB24. La proteína AtABCB25 era nombrada anteriormente como ATM3 (Verrier y cols., 2008), y parece estar encargada de transportar cPMP (piranopterina cíclica monofosfato) desde la mitocondria al citosol en el proceso de biosíntesis del cofactor de molibdeno, estando relacionada, por tanto, con la biosíntesis y funcionamiento de proteínas Fe-S (Teschner y cols., 2010). Los mutantes *atm3* presentan enanismo, clorosis y morfología alterada de hojas y núcleo (Kushnir y cols., 2001) así como una actividad reducida de proteínas Fe-S (Bernard y cols., 2009).

En el estudio de la subfamilia ABCC, señalada de color púrpura en el árbol filogenético (Fig. 57) se utilizaron las 15 secuencias de *Arabidopsis* identificadas hasta la fecha y dos de melón: CmABCC2 y CmABCC4. Todos los miembros de la familia ABCC son de tamaño completo y no hay subdivisiones en otros grupos, aunque anteriormente sus miembros eran conocidos como MRP (multidrug resistance associated protein) (Kang y cols., 2011). Las proteínas de melón utilizadas fueron agrupadas muy próximas a sus homólogas de *Arabidopsis* en el árbol, lo que indica una semejanza estructural y una posible semejanza funcional. La proteína AtABCC2 era anteriormente nombrada como AtMRP2, se localiza en el tonoplasto y se ha relacionado con el transporte de la fitohormona ABA en su forma conjugada glucosil éster de ABA (ABA-GE) hacia el interior de la vacuola (Burla y cols., 2013) también se encarga del transporte de conjugados con glutatión así como de otros aniones anfipáticos como *Bn-NCC-1* (linearized tetrapyrrole *Brassica napus* nonfluorescent chlorophyll catabolite 1), un producto de la degradación de la clorofila (Lu y cols., 1997; Lu y cols., 1998; Tomassini y cols., 1998). AtABCC4, también conocida anteriormente como AtMRP5 está implicada en la regulación de la apertura de estomas, siendo posible también que pudiera participar en el transporte de folatos (Klein y cols., 2004).

La subfamilia ABCD en *Arabidopsis*, señalada en el árbol filogenético con azul claro (Fig. 57), cuenta con dos miembros: AtABCD1 de tamaño completo y AtABCD2 de medio tamaño. Los miembros de esta familia eran conocidos anteriormente como PMP (peroxisomal membrane protein) (Kang y cols., 2011). De melón fueron analizadas las proteínas CmABCD1 y CmABCD2, resultando en que cada una de ellas quedó agrupada con

su homóloga en dos grupos distintos. En Arabidopsis, la proteína AtABCD1 participa en el transporte de sustratos (ésteres de acil-CoAs) hacia el interior de los peroxisomas, permitiendo que se desarrollen procesos como la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y la biosíntesis y degradación de moléculas derivadas de lípidos (Theodoulou y cols., 2006; Wanders y cols., 2007; Nyathi y cols., 2010). Los mutantes de esta proteína presentaron efectos en varios procesos del desarrollo tales como germinación, establecimiento de plántulas, fertilidad, crecimiento de raíces y senescencia inducida por oscuridad (Footit y cols., 2002; Zolman y cols., 2001; Theodoulou y cols., 2005; Pinfield-Wells y cols., 2005; Footit y cols., 2006; Footit y cols., 2007; Carrera y cols., 2007; Kunz y cols., 2009; Slocombe y cols., 2009; Kanai y cols., 2010). Por otro lado, la proteína AtABCD2 no ha sido tan estudiada y por el momento se desconoce su función, aunque si ha sido localizada en la membrana de los cloroplastos (Geisler, M. 2014).

La subfamilia ABCE se encuentra señalada en color amarillo en el árbol filogenético (Fig. 57). Esta subfamilia era conocida anteriormente como RLI (RNase L inhibitor)(Verrier y cols., 2008). Para el análisis se utilizaron las 3 secuencias de Arabidopsis disponibles y una de melón, CmABCE2, que fue agrupada junto a su homóloga, AtABCE3. Esta subfamilia está formada por proteínas solubles que no poseen dominio TMD y por tanto, no transportan sustratos a través de membranas. Algunas proteínas pertenecientes a esta subfamilia participan en procesos como traducción de proteínas o silenciamiento de ARN (Braz y cols., 2004; Sarmiento y cols., 2006). Las proteínas de esta subfamilia poseen un dominio N-terminal de ferredoxina (4Fe4S) habitual en proteínas que interactúan con ácidos nucleicos (Bairoch, A, 1992).

La subfamilia ABCF se encuentra señalada en verde en el árbol filogenético (Fig. 57). Esta familia era también conocida como GCN (General Control Non-repressible), y está formada por proteínas solubles al igual que la subfamilia ABCE, ya que tampoco poseen dominios TMD (Verrier y cols., 2008). Se analizaron cuatro secuencias de melón: CmABCF1, CmABCF3, CmABCF4 y CmABCF5 y cinco de Arabidopsis. Esta subfamilia comprende el mayor grupo de proteínas ABC solubles en esta especie. En levaduras se ha observado que un miembro de esta familia llamado GCN20 está implicado en detectar la disponibilidad de aminoácidos a través de la modulación de una kinasa asociada a la reacción de unión de aminoacil-tRNA (Vázquez de Aldana y cols., 1995). En arroz, se ha observado que la proteína OsABCF5 está relacionada con la respuesta a estreses como sequía o salinidad (Nguyen y cols., 2014). En Arabidopsis, se encontró que la proteína AtABCF3 participa en el control de traducción de proteínas asociado a estrés (Zeng y cols., 2011), por tanto,

parece que miembros de esta subfamilia podrían participar en procesos de control de traducción.

La subfamilia ABCG es especialmente numerosa en plantas, se encuentra señalada de color azul oscuro en el árbol filogenético (Fig. 57). Como se mencionó anteriormente, los miembros de esta subfamilia comparten la característica especial de poseer una orientación reversa de sus dominios (Verrier y cols., 2008). Dentro de esta subfamilia existen dos subgrupos que eran clasificados anteriormente como dos familias distintas: WBC (White-Brown Complex) con transportadores de medio tamaño y PDR (Pleiotropic Drug Resistance), con miembros de tamaño completo (Kang y cols., 2011). En el árbol filogenético puede observarse como ambos subgrupos forman clusters diferentes dentro de la misma familia. En este caso se realizó el análisis con la proteína CmABCG23 de melón y 43 secuencias de *Arabidopsis*. Se observó como CmABCG23 se encuadra dentro del subgrupo WBC junto a su homóloga en *Arabidopsis*, AtABCG23. La función de la proteína AtABCG23 no es conocida, y dentro del subgrupo WBC existen miembros con funciones diversas, por ejemplo, AtABCG11 y AtABCG12 son necesarios para la exportación de lípidos de cutícula (Pighin y cols., 2004; Bird y cols., 2007), mientras que AtABCG19 confiere resistencia a kanamicina (Mentewab y cols., 2005).

La subfamilia ABCI, señalada de color gris en el árbol filogenético (Fig. 57) presenta una gran diversidad estructural entre sus miembros, ya que cada uno contiene un dominio TMD, NBD o un dominio accesorio diferente (Kang y cols., 2011). Esto provoca que en el árbol filogenético los miembros de esta subfamilia se posicionen en varios grupos separados. Para realizar este estudio se utilizaron 21 secuencias proteicas de *Arabidopsis* y dos de melón, CmABCI6 y CmABCI17. Cada una de las proteínas de melón se posicionó junto a su homóloga de *Arabidopsis*. La proteína AtABCI6 ha sido localizada en cloroplastos en *Arabidopsis*, y se ha observado que es necesaria para la embriogénesis, estando involucrada en la biogénesis y reparación de clusters Fe-S dañados por estrés oxidativo (Xu y cols., 2004). La proteína AtABCI17 (denominada también como AtSTAR1) está relacionada con la detoxificación de Aluminio y la regulación de la floración (Huang y cols., 2010). En arroz, la proteína STAR1 (que presenta solo un dominio NBD) se conjuga con STAR2 (que presenta solo un dominio TMD) para ser funcional. Se encargan de transportar UDP-glucosa y de este modo modifican la pared celular para detoxificar aluminio. El mecanismo concreto es aún desconocido (Huang y cols., 2009).

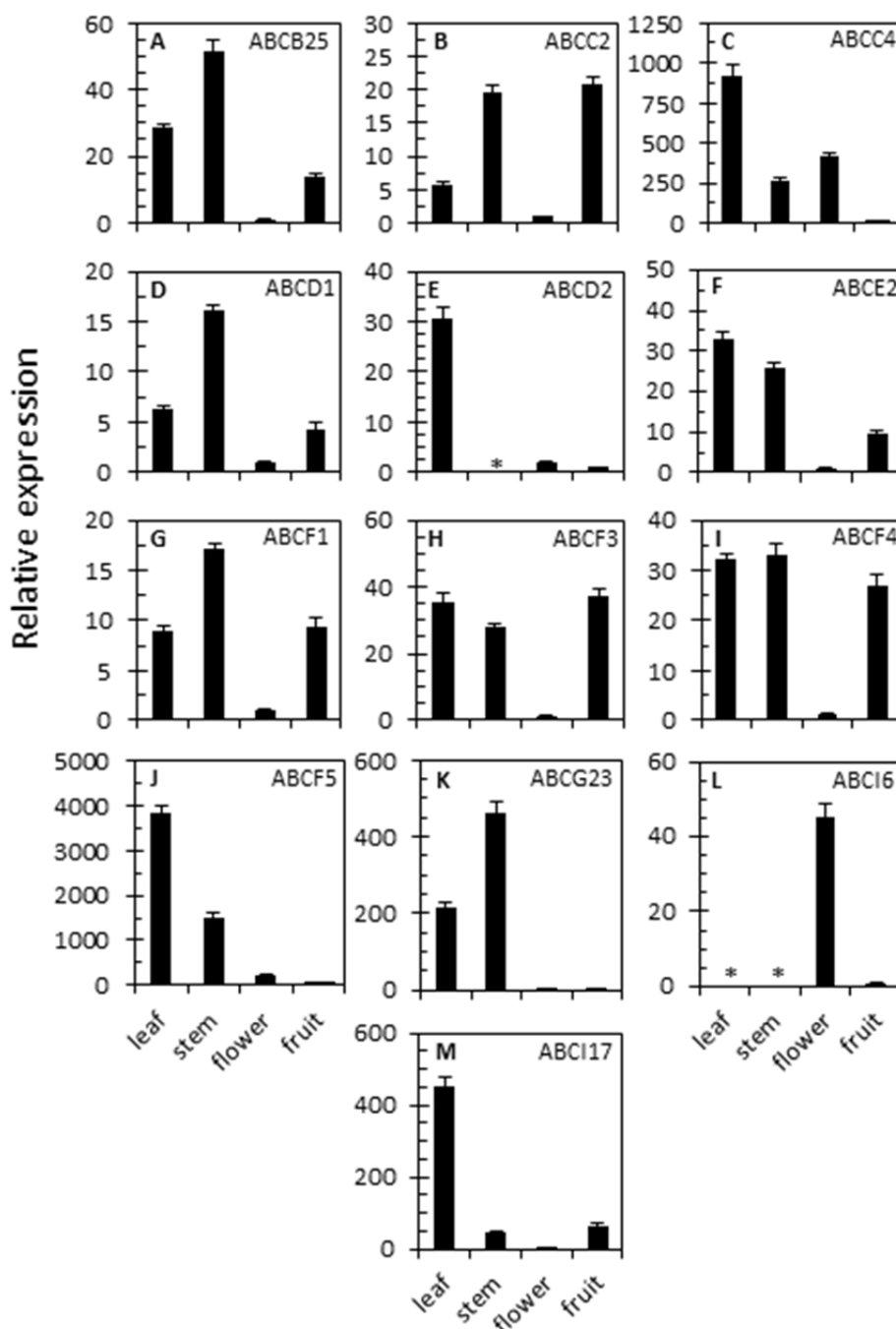
El análisis filogenético realizado entre las proteínas ABC estudiadas de melón y las proteínas identificadas de *Arabidopsis* mostró que las proteínas analizadas en este estudio se asemejan a sus proteínas homólogas de la planta modelo. Esto proporciona una primera idea sobre la estructura de dichas proteínas analizadas, y también, sobre las posibles funciones que podrían desempeñar en melón.

#### **4.4.2. Expresión de transportadores ABC en diferentes tejidos de melón**

Se realizó un análisis de expresión de los diferentes transportadores ABC en distintos tejidos de la planta de melón: tallo, hojas, flores y fruto (Fig 58). Este análisis permitió conocer en qué lugares de la planta son más expresados los genes correspondientes a las proteínas bajo estudio, y si presentan una expresión diferencial relacionada con algún tejido específico. De manera general, se encontró expresión de todas las proteínas en casi todos los tejidos, aunque la mayoría de ellas presentó algún tipo de preferencia por algún tejido o tipo de tejido en concreto. Más específicamente, CmABCB25 presentó una mayor expresión en el tallo, observándose también una expresión notable en la hoja, mientras que esta era menor en el fruto y bastante disminuida en flores. Por tanto, esta proteína parece poseer una expresión preferencial por tejidos vegetativos. En arroz, se ha observado que OsABCB25 también presenta una alta expresión en tejidos vegetativos (Nguyen y cols., 2014), mientras que en *Arabidopsis* se ha encontrado una alta expresión de AtABCB25 en raíces (Bovet y cols., 2005).

La expresión de CmABCC2 resultó ser similarmente alta en fruto y tallo, y baja en el tejido de hojas y flores. En comparación, la proteína ZmABCC2 presentó una alta expresión en tejidos vegetativos de maíz, concretamente hojas y raíces (Pang y cols., 2013). Por otro lado, la expresión de CmABCC4 resultó ser bastante más elevada en el tallo que en hojas y flores, donde también se observó cierta expresión, mientras que comparativamente, en fruto resultó estar bastante disminuida. En maíz, ZmABCC4 ha sido encontrado con una mayor expresión en tejidos vegetativos mientras que en *Arabidopsis* ha mostrado una alta expresión en hojas (Pang y cols., 2013). El transcrito CmABCD1 presenta un patrón de expresión muy similar al de CmABCB25, con una expresión elevada en hojas, algo menor en tallo y fruto, y muy disminuida en flores. De igual manera, OsABCD1 también se encontró con una alta expresión en tejidos vegetativos en arroz (Nguyen y cols., 2014), y ZmABCD1 mostró una expresión preferencial en hoja de maíz (Pang y cols., 2013). CmABCD2 presentó una expresión muy preferencial en hojas, siendo esta muy disminuida en flores y frutos en comparación y no fue detectada en el tallo. ZmABCD2 mostró, en

consonancia, una alta expresión en tejidos vegetativos de maíz (Pang y cols., 2013). Se encontró una expresión generalmente preferencial de CmABCE2 en tejidos vegetativos, siendo esta más alta que la expresión encontrada en frutos, que era comparativamente menor, y estando aún más disminuida en flores.



**Figura 58.** Expresión de genes ABC en diferentes tejidos de melón, representada como expresión relativa en tejido: hoja, tallo, flor masculina y fruto. Los asteriscos indican expresión no detectada.

En arroz se observó una alta expresión de OsABCE2 en la mayoría de tejidos (Nguyen y cols., 2014), y de igual manera, se observó una expresión ubicua de ZmABCE2 en maíz (Pang y cols., 2013). CmABCF1 mostró un patrón de expresión muy similar al observado en CmABCB25 y CmABCD1, con una elevada expresión en tallo, algo menor en hojas y frutos y bastante menor en flores. En maíz, se ha observado una expresión ubicua de ZmABCF1 (Pang y cols., 2013). Las proteínas CmABCF3 y CmABCF4 presentaron unos niveles de expresión similares, con una elevada expresión en hoja, tallo y fruto y notablemente menor en flores. Una alta expresión de las proteínas ZmABCF3 y ZmABCF4 también fue encontrada en hojas de maíz (Pang y cols., 2013). Por otro lado, CmABCF5 mostró una preferencia por tejidos vegetativos, presentando una mayor expresión en hojas, siendo algo menor en tallo y considerablemente menor en los tejidos reproductivos. En maíz, ZmABCF5 también mostró una mayor expresión en hoja (Pang y cols., 2013). CmABCG23 presentó una alta expresión en tallo, siendo algo menor en hojas y considerablemente baja tanto en fruto como flor, esto indica una preferencia de expresión de esta proteína por tejidos vegetativos. ZmABCG23, mostró una expresión preferencial en hojas, concordando con lo observado en Arabidopsis, donde su posible papel en la regulación de apertura de estomas indica una elevada expresión en hojas en relación con otros tejidos (Pang y cols., 2013; Kang y cols., 2011). CmABCI6 mostró una expresión muy localizada en flores, siendo mucho menor en frutos y no detectable ni en hoja ni tallo. Esto contrasta con lo observado tanto en maíz, como en arroz donde se encontró una alta expresión de este transportador en hojas (Pang y cols., 2013; Nguyen y cols., 2014), lo que sugiere que podría desempeñar una actividad diferente en la planta de melón. Por último, la proteína CmABCI17 mostró una alta expresión en hoja, siendo notablemente menor en los demás tejidos. También se observó una alta expresión de OsABCI17 en hoja de arroz (Nguyen y cols., 2014).

De manera general, la mayoría de las proteínas analizadas mostró una mayor expresión en tejidos vegetativos (hojas y tallo): CmABCB25, CmABCC4, CmABCD1, CmABCD2, CmABCE2, CmABCF5, CmABCG23 y CmABCI17. En otros transportadores como CmABCC2, CmABCF3 y CmABCF4 no se observó una diferencia tan clara, mientras que únicamente en el caso de CmABCI6 se encontró una clara mayor expresión en tejido reproductivo (flores). En muchos casos, una misma proteína presentó una alta expresión en distintos tejidos, lo que sugiere que sus funciones se encuentran relacionadas con procesos básicos celulares. El análisis de expresión en los diferentes tejidos permitió conocer si la expresión de las proteínas estudiadas se encontraba muy vinculada con algún tejido en concreto, o si por el contrario, presentaban una expresión más ubicua. Mediante la comparación con la

expresión de proteínas homólogas en otras especies, se puede conocer si los patrones de expresión se encuentran muy conservados, o si por el contrario, varían entre diferentes especies. Esta comparación se realizó principalmente con maíz y arroz, debido a los amplios estudios de expresión de proteínas ABC realizados en estas especies. Generalmente, los patrones de expresión coincidieron o fueron muy similares, aunque también se encontraron algunas excepciones como en el caso de ABCC2, ABCE2, ABCF1, ABCI6, lo que indica que podrían existir, aunque no necesariamente, una diferencia de funciones.

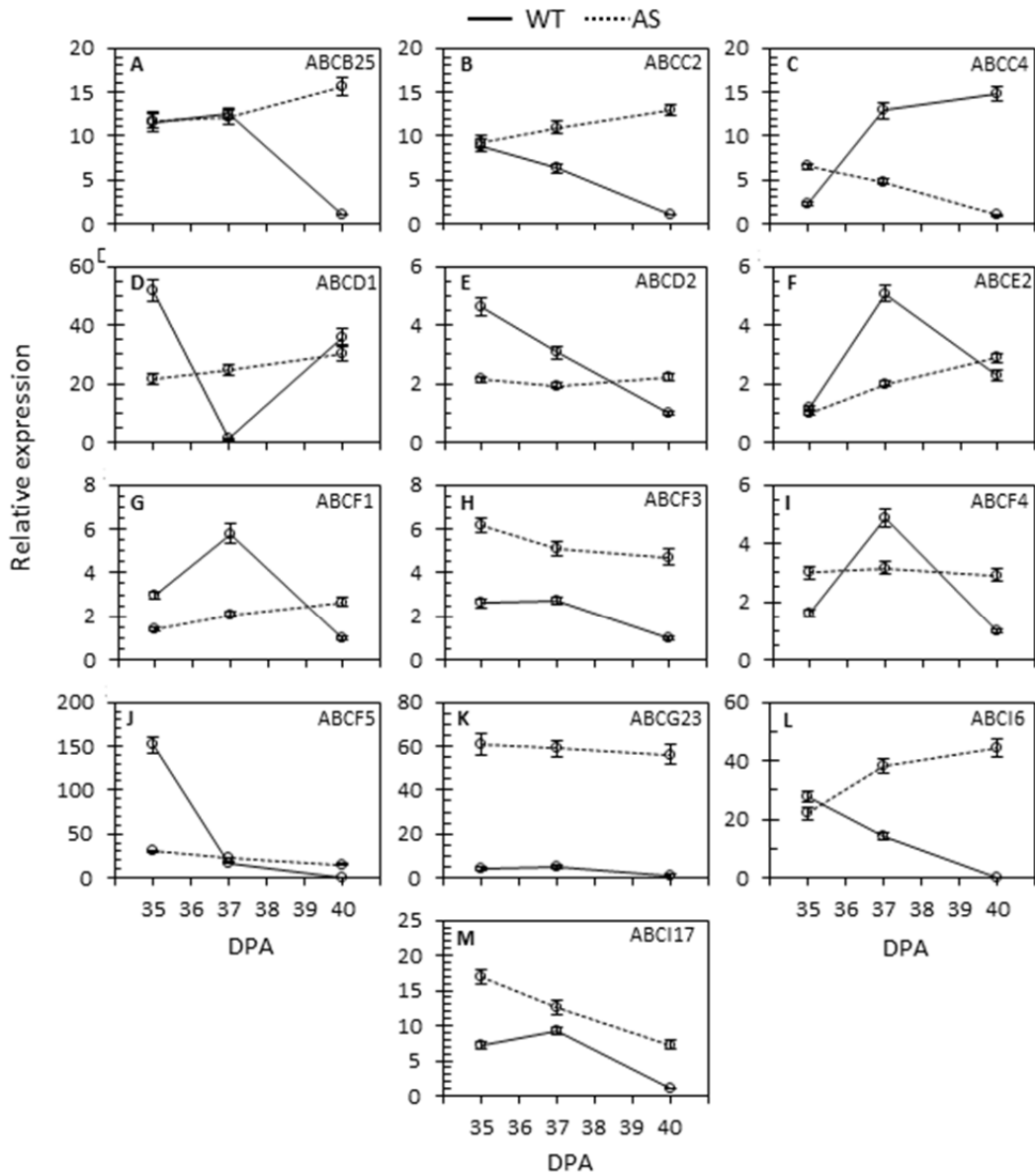
#### **4.4.3. Análisis de la expresión de transportadores ABC durante la maduración del fruto**

La expresión de los transportadores ABC de melón fue analizada en muestras de pulpa de sus frutos. Se tomaron muestras a distintos momentos del proceso de maduración: a 35, 37 y 40 DPA, con el objetivo de analizar variaciones y su evolución durante el proceso. Además, se realizaron análisis de la pulpa de frutos de melón provenientes de una planta transformada con un constructo antisentido de ACC oxidasa. Esta enzima cataliza el último paso en la ruta biosintética del etileno, y en el caso de la planta transformada, la actividad de esta enzima se encuentra suprimida. Como consecuencia, la producción de etileno se reduce drásticamente, bloqueando el proceso de maduración (Ayub y cols., 1996). Comparar la expresión de las proteínas ABC entre ambas muestras puede ayudar a dilucidar la posible implicación de estas proteínas en maduración, y si su regulación como expresión relativa respecto al tiempo de maduración del fruto en DPA.

En la figura 59 se muestra la evolución de los niveles de expresión relativa de cada gen tanto en el melón silvestre como en el melón ACO antisentido. De manera general, en las muestras de melón silvestre estudiadas puede observarse una tendencia en la que se produce un descenso de la expresión, ya que en todos los casos menos en los de CmABCC4 y CmABCE2, el nivel de expresión es menor a 40 DPA que a 35 DPA. En otros casos como CmABCB25, CmABCC2, CmABCD2, CmABCF1, CmABCF3, CmABCF5, CmABCI6 y CmABCI17, esta tendencia se observa con más claridad, aunque algunos de ellos sufren un aumento de expresión alrededor de los 37 DPA (CmABCB25, CmABCF1, CmABCF3, CmABCF4 y CmABCI17). CmABCB25 mantiene su expresión desde 35 a 37 DPA, para descender posteriormente de una manera progresiva hasta 40 DPA. Esta misma tendencia es seguida por CmABCF3 y CmABCG23, aunque de una manera mucho más suave.



CmABCC2, CmABCD2 y CmABCI6 mantienen una tendencia de descenso desde 35 hasta 40 DPA de una manera continua.



**Figura 59.** Expresión de genes ABC en frutos de melón, representada como expresión relativa a distintas etapas del proceso de maduración (35, 37 y 40 DPA). La línea continua corresponde a muestras de melón silvestre, la línea discontinua corresponde a muestras del melón ACO antisentido.

Por otro lado, CmABCC4 aumenta su expresión desde 35 a 37 DPA para seguir aumentando más ligeramente hasta 40 DPA. CmABCD1 presenta una tendencia singular, sufre un gran descenso desde 35 a 37 DPA para volver a aumentar a 40 DPA. En ninguno de los otros transcritos se observa un aumento de expresión tras una disminución. CmABCE2 sufre una evolución opuesta, junto con CmABCF1, CmABCF4 y CmABCI17, en la

que se produce primero un pico de expresión hacia los 37 DPA para descender posteriormente a los 40 DPA. Por último, CmABCF5 sufre un brusco descenso desde los 35 DPA hasta los 37 DPA, para seguir descendiendo más lentamente hasta los 40 DPA.

Al observar la evolución seguida por los mismos transcritos en las muestras de melón ACO antisentido no se observó una tendencia general. En el caso de CmABCB25, CmABCC2, CmABCD1, CmABCE2, CmABCF1 y CmABCI6 puede observarse como el nivel de expresión sufre un aumento progresivo a lo largo del proceso. Por el contrario, CmABCC4, CmABCF3, CmABCF5, CmABCG23 y CmABCI17 mostraron un descenso progresivo desde 35 a 40 DPA. Los cambios en expresión en estas muestras eran continuos y más graduales que los producidos en las muestras de melón silvestre.

Al comparar la evolución de los mismos transcritos entre el melón silvestre y el melón ACO antisentido, se observan distintos comportamientos: CmABCC2, CmABCC4 y CmABCI6 disminuyen en la muestra silvestre, mientras que en la muestra de melón ACO antisentido sufren el progreso opuesto, al aumentar continuamente hasta 40 DPA. Lo mismo con alguna ligera diferencia parece suceder con CmABCB25 y CmABCD2. Por el contrario, en el caso de CmABCF3, CmABCF5, CmABCG23 y CmABCI17 los transcritos siguieron la misma evolución a grandes rasgos en ambas muestras, descendiendo durante el proceso de maduración. Cabe destacar la diferencia de tendencia en tres: CmABCE2, CmABCF1 y CmABCF4. En ellos se produce un pico en el nivel de expresión de la muestra silvestre, inexistente en la muestra de melón ACO antisentido. Esta diferencia podría indicar que la expresión de dichos transcritos podría encontrarse inducida por etileno alrededor de los 37 DPA. El caso de CmABCD1 es opuesto al descrito anteriormente. En la muestra silvestre, este transcrito sufre una disminución de expresión sobre los 37 DPA, mientras que en el melón ACO antisentido no se produce dicho descenso. Esto sugiere que su expresión podría estar sujeta a una represión por parte del etileno en el proceso de maduración del fruto. En *Arabidopsis*, como se mencionó anteriormente, se ha observado que AtABCD1 participaba en el metabolismo de ácidos grasos (Theodoulou y cols., 2006; Wanders y cols., 2007; Nyathi y cols., 2010). Durante la maduración de melón, la producción de aromas volátiles a partir de ácidos grasos cobra especial importancia, por lo que la regulación de este gen podría ser parte implicada en este proceso.

La expresión de los genes que aparentemente podrían estar regulados por etileno fue encontrada con mayor nivel en tejidos vegetativos como en hojas y tallo (Fig. 58) aunque

en todos ellos, era notable también la expresión en el fruto, lo que sugiere que podrían participar en procesos regulados de manera diferente en cada tejido.

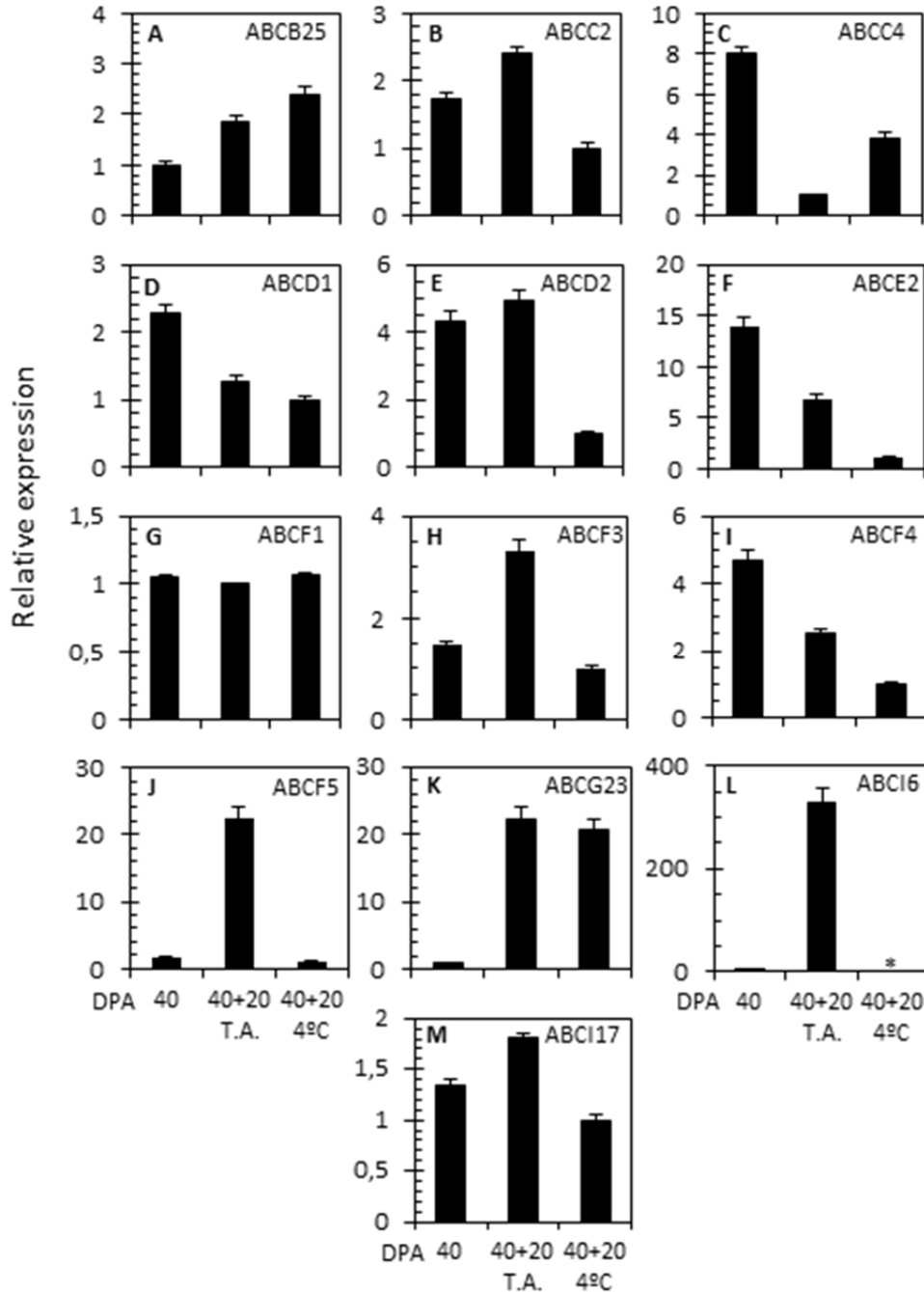
#### **4.4.4. Análisis de expresión de transportadores ABC en post-cosecha.**

Se realizó un análisis de expresión de los genes ABC en una etapa posterior a la maduración, cuando el fruto ha sido separado de la planta, conocida como etapa post-cosecha. Durante este periodo, se dan una serie de procesos que afectan a la calidad y vida útil de los frutos, se producen cambios en el color, la firmeza, el contenido en azúcares (Portela y Cantwell, 1998), y en la cantidad y tipo de aromas volátiles (Beaulieu, 2006). Este análisis nos permite conocer el comportamiento y la expresión de los genes ABC durante dicha etapa y aporta una primera idea sobre su posible implicación en los procesos que ocurren en ella. Para ello se analizó la expresión de cada gen ABC a 20 días tras el momento de la cosecha, que se produjo a 40 DPA. Esta expresión fue comparada entre dos conjuntos de frutos, unos conservados a temperatura ambiente, y otros conservados a 4°C durante el mismo periodo de tiempo. Los resultados del análisis se muestran en la figura 60.

De manera general, se observaron varios tipos de comportamiento. Por un lado, en algunos casos, el nivel de expresión de algunos genes descendió desde los 40 DPA hacia los 40+20 DPA. Este es el caso de CmABCC4, CmABCD1, CmABCE2 y CmABCF4. Al comparar con los datos obtenidos de los frutos conservados a 4°C, no todos fueron afectados de la misma manera. El descenso de expresión en CmABCC4 se moderó bastante, en CmABCD1, por el contrario, parecía algo menor, aunque sin mucha diferencia, en CmABCE2 si se observó una mayor disminución, al igual que en CmABCF4. Otra tendencia seguida por varios genes, fue la de aumento de expresión durante la etapa poscosecha, esto puede observarse en el caso de CmABCB25, CmABCC2, CmABCD2, CmABCF3, CmABCF5, CmABCG23, CmABCI6 y CmABCI17. Al comparar la expresión con las muestras tomadas a partir de frutos a 4°C, se observaron diferentes comportamientos. Solo en el caso de CmABCB25, el aumento de expresión fue mayor, mientras que para la mayoría de los demás, el tratamiento a 4°C supuso un descenso de expresión, a niveles iguales o menores a la expresión observada a 4°C, observable en CmABCC2, CmABCD2, CmABCF3, CmABCF5, CmABCI6 con una expresión no detectada y CmABCI17. CmABCF1 fue el único gen que presentó una expresión invariable en las tres muestras, lo que sugiere que podría participar en algún proceso celular básico.

La mayoría de genes sufrieron un cambio de expresión durante el periodo poscosecha, lo que podría significar que quizás participan en algunos de los procesos que ocurren en

dicha etapa, sobre todo los que aumentan su expresión, ya que un descenso de expresión era esperado debido al descenso de funciones fisiológicas celulares que ocurren progresivamente tras la separación del fruto de la planta.



**Figura 60.** Expresión de diferentes genes ABC en diferentes muestras de frutos, frutos a 40 DPA, frutos conservados a temperatura ambiente durante 20 días tras recogida a 40 DPA, y frutos conservados a 4°C durante 20 días tras la recogida. La expresión se indica como expresión relativa respecto a cada una de las muestras. Los asteriscos indican expresión no detectada

### *Resultados y discusión*

El tratamiento poscosecha a 4°C tuvo un efecto considerable en la expresión de algunos genes como es el caso de CmABCC2, CmABCD2, CmABCE2, CmABCF5 o CmABCI6, en el que provocó una expresión muy diferente de la encontrada en frutos que se conservaron a temperatura ambiente. Esto sugiere que la expresión de dichos genes podría directa o indirectamente regulada por la temperatura. El conocimiento de las funciones específicas que realizan estos transportadores en el proceso de maduración supondría entender la relación que suponen en cuanto a la longitud de la vida útil y calidad poscosecha de los frutos. Además, permitiría conocer el efecto de la temperatura en la conservación de frutos de melón, siendo de gran importancia para la industria alimentaria.



## Conclusiones





## Conclusiones

---

1. La abscisión del fruto maduro en melón se produce en el plano de fractura situado entre la parte proximal de la ZA (pedicelo) y la parte distal (mesocarpo). La ZA del fruto maduro en melón está formada por 30-35 capas celulares.
2. El análisis mediante 454 pirosecuenciación de la ZA del fruto maduro mostró que en una etapa temprana de inducción de la abscisión predomina una mayor inducción de genes, mientras que en la etapa tardía se observa una mayor represión génica.
3. Durante la abscisión del fruto maduro en melón, aumentaron fuertemente miembros de las familias de poligalacturonasas (PG), pectinliasas (PL), endoglucanasas (EG), así como  $\beta$ -1,3-glucanasa,  $\beta$ -glucosidasa, y  $\beta$ -galactosidasa, en la inducción temprana, por lo que podrían participar en los eventos de desorganización de la pared celular en dicha etapa. En la fase de inducción tardía de la abscisión se observó un aumento de expresión de pectinesterasas (PE), expansinas (EXP),  $\alpha$ -glucosidasa y extensinas (EXT) por lo que podrían realizar funciones de desorganización y separación celular.
4. En la etapa temprana de inducción de la abscisión se observó una inducción de genes relacionados con endo y exocitosis. Entre ellos: kinesinas, Rab-GTPasas, tubulina, syntaxinas o ATPasas de tipo V.
5. El estudio de expresión de genes relacionados con las fitohormonas mostró que la mayoría de genes expresados diferencialmente estaban relacionados con etileno, ácido abscísico (ABA), jasmonatos (JA) y auxina, aunque en menor medida también se encontraron otros relacionados con salicilatos (SA) y brasinoesteroides (BR).
6. Los eventos tempranos de abscisión están potencialmente regulados por la represión de factores de transcripción MADS-box, AP2/ERF y Aux/IAA, y la inducción de homeobox, dedos de zinc, bZIP y WRKY. Los eventos tardíos de abscisión, por el contrario estarían bajo la regulación de factores de transcripción MYB.
7. El análisis de expresión de transportadores ABC durante la maduración de melón expuso la posible participación de CmABCE2, CmABCF1, CmABCF4 y CmABCD1 en dicho proceso, así como su probable regulación por la fitohormona etileno.

## *Conclusiones*

## Conclusions

---

1. The fruit AZ is formed by 30-35 cell layers. The abscission occurs in the fracture plane, which is located between the proximal side of the AZ (pedicel) and the distal side (mesocarp).
2. 454 Pyrosequencing analysis of the AZ at different stages of the MFA showed that in an early stage, the up-regulation of genes is predominant. By contrast, a greater down-regulation of genes takes place in a late stage of the MFA.
3. This study showed that in an early stage of the MFA, several genes related with cell wall metabolism were strongly up-regulated: polygalacturonases (PG), pectin lyases (PL), endoglucanases (EG),  $\beta$ -1,3-glucanase,  $\beta$ -glucosidase,  $\gamma$   $\beta$ -galactosidase. It suggests that they could play roles in cell wall loosening at that stage. During the late induction of the MFA, an increased expression of pectinesterases (PE), expansins (EXP),  $\alpha$ -glucosidase and extensins (EXT) was observed. This suggests that they probably are involved in cell wall loosening and cell separation in this stage.
4. During the early induction of abscission, an up-regulation of genes related to endo and exocytosis was observed. Some of them were: kinesins, Rab-GTPases, tubulins, syntaxins and V-type ATPases. Moreover an induction of boron and nitrate was found in the early stage, and an induction of the phosphate transport was observed during the late stage of MFA.
5. The expression analysis of genes related with plant hormones showed that most of the genes differentially expressed were related with the metabolism or signaling of ethylene, abscisic acid, jasmonates and auxine. They were also found to a lesser extent some genes differentially expressed related with salicylates and brassinoesteroids
6. The early events of the MFA are potentially regulated by repression of transcription factors: MADS-box, AP2/ERF and Aux/IAA and by induction of homeobox, zinc fingers, bZIP and WRKY. On the other hand, the late events of the MFA would be under the regulation of MYB transcription factors
7. The expression analysis of ABC transporters during melon fruit ripening showed the possible participation of CmABCE2, CmABCF1, CmABCF4 and CmABCD1 in this process, and its likely regulation by the plant hormone ethylene.



## Bibliografía



## Bibliografía

---

- Abeles, F.B., Morgan, P.G., Salveit, M.E.** 1992. Ethylene in Plant Biology, seconded. Academic Press, San Diego.
- Adamczyk, B.J., Lehti-Shiu, M.D., Fernandez, D.E.** 2007. The MADS domain factors AGL15 and AGL18 act redundantly as repressors of the floral transition in Arabidopsis, *Plant J.* 50: 1007–1019.
- Addicott, F.T.** 1982. Abscission, University of California Press, Berkeley.
- Addicott, F.T., Lynch, R.S.** 1951. Acceleration and retardation of abscission by indoleacetic acid, *Science* 114: 688–689.
- Addicott, F.T., Lynch, R.S., Carns, H.R.** 1955. Auxin gradient theory of abscission regulation, *Science* 121: 644–645.
- Agusti, J., Merelo, P., Cercos, M., Tadeo, F.R., Talón, M.** 2009. Comparative transcriptional survey between laser-microdissected cells from laminar abscission zone and petiolar cortical tissue during ethylene-promoted abscission in citrus leaves. *BMC Plant Biol* 9: 127.
- Agustí, J., Merelo, P., Cercos, M., Tadeo, F.R., Talon, M.** 2008. Ethylene-induced differential gene expression during abscission of citrus leaves, *J. Exp. Bot.* 59: 2717–2733.
- Agustí, J., Zapater, M., Iglesias, D.J., Cercós, M., Tadeo, F.R., Talón, M.** 2007- Differential expression of putative 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenases and abscisic acid accumulation in water stressed vegetative and reproductive tissues of citrus, *Plant Sci.* 172: 85–94.
- Alba, R., Payton, P., Fei, Z. J., McQuinn, R., Debbie, P., Martin, G. B., et al.** 2005. Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. *Plant Cell* 17: 2954–2965.
- Alburquerque, N., Egea, J., Burgos, L., Martínez-Romero, D., Valero, D., Serrano, M.** 2006. The influence of polyamines on apricot ovary development and fruit set. *Ann. appl. Biol.* 149: 27-33.
- Alexander, L., Grierson, D.** 2002. Ethylenebiosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening, *J. Exp. Bot.* 53: 2039–2055.
- Alferez, F., Singh, S., Umbach, A.L., Hockema, B., Burns, J.K.** 2005. Citrus abscission and Arabidopsis plant decline in response to 5-chloro-3-methyl-4-nitro-1H-pyrazole are mediated by lipid signalling, *Plant Cell Environ.* 28: 1436–1449
- Alferez, F., Zhong, G.Y., Burns, J.K.** 2000. A citrus abscission agent induces anoxia- and senescence-related gene expression in Arabidopsis, *J. Exp. Bot.* 58: 2451–2462.
- Anjard, C., and Loomis, W.F.** 2002. Evolutionary Analyses of ABC Transporters of *Dictyostelium discoideum*. *Eukaryotic Cell* 1: 643-652

- Armitage, A. M.** 1989. Promotion of fruit ripening of ornamental peppers by ethephon. *HortScience* 24:962–964.
- Aubert, C., Bourger, N.** 2004. Investigation of volatiles in Charentais Cantaloupe melons (*Cucumis melo* var. *cantalupensis*). Characterization of aroma constituents in some cultivars, *J. Agric. Food Chem.* 52: 4522–4528.
- Audic, S., Claverie, J.M.** 1997. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res* 7: 986-995.
- Ayub, R., Guis, M., Ben Amor, M., Gillot, L., Roustan, J.P., Latché, A., Bouzayen, M., Pech, J.C.** 1996. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits, *Nat. Biotechnol.* 14: 862–866.
- Aziz, A.** 2003. Spermidine and related-metabolic inhibitors modulate sugar and amino acid levels in *Vitis vinifera* L.: possible relationships with initial fruitlet abscission, *J. Exp. Bot.* 54: 355–363.
- Aziz, A., Brun, O., Audran, J.C.** 2001. Involvement of polyamines in the control of fruitlet physiological abscission in grapevine (*Vitis vinifera*). *Physiol. Plant.* 113: 50-58.
- Badiyan, D., Wills, R.B.H., Bowyer, M.C.** 2004. Use of a nitric oxide donor compound to extend the vase life of cut flowers, *HortScience* 39: 1371–1372.
- Baena-Gonzalez, E., Sheen, J.** 2008. Convergent energy and stress signaling, *Trends Plant Sci.* 13: 474–482.
- Bairoch, A.** 1992 PROSITE: a dictionary of sites and patterns in proteins. *Nucleic Acids Res* 20 S2013-SZ018
- Bangerth, F.** 2000. Abscission and thinning of young fruit and their regulation by plant hormones and bioregulators, *Plant Growth Regul.* 31: 43–59.
- Bar-Dror, T., Dermastia, M., Kaldnik, A., Znidaric, M.T., Novak, M.P., Meir, S., Burd, S., Philosoph-Hadas, S., Ori, N., Sonogo, L., Dickman, M.B., Lers, A.** 2011. Programmed cell death occurs asymmetrically during abscission in tomato, *Plant Cell* 23: 4146–4163.
- Barry, C. S., Blume, B., Bouzayen, M., Cooper, W., Hamilton, A. J., Grierson, D.** 1996. Differential expression of the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. *Plant J.* 9: 525–535. doi: 10.1046/j.1365-313X.1996.09040525.x
- Barry, C. S., Giovannoni, J. J.** 2006. Ripening in the tomato green-ripe mutant is inhibited by ectopic expression of a protein that disrupts ethylene signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 7923–7928. doi: 10.1073/pnas.0602319103
- Barry, C. S., McQuinn, R. P., Chung, M. Y., Besuden, A., Giovannoni, J. J.** 2008. Amino acid substitutions in homologs of the STAY-GREEN protein are responsible for the green-flesh and chlorophyll retainer mutations of tomato and pepper. *Plant Physiol.* 147: 179–187. doi: 10.1104/pp.108.118430



- Bauchot, A.D., Mottram, D.S., Dodson, A.T., John, P.** 1998. Effect of aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase antisense gene on the formation of volatile esters in Cantaloupe Charentais melon (cv. Védrantais), *J. Agric. Food Chem.* 46: 4787–4792.
- Beaulieu, J. C.** 2006. Volatile changes in cantaloupe during growth, maturation, and in stored fresh-cuts prepared from fruit harvested at various maturities. *Journal of the American Society for the Horticultural Science*, 131: 127–139.
- Becraft, P.W., Bongard-Pierce, D.K., Sylvester, A.W., Poething, R.S., Freeling, M.** 1999. The liguleless-1 gene acts tissue specifically in maize leaf development, *Dev. Biol.* 141: 220–232.
- Belfield, E.J., Ruperti, B., Roberts, J.A., McQueen-Mason, S.** 2005. Changes in expansin activity and gene expression during ethylene-promoted leaflet abscission in *Sambucus nigra*, *J. Exp. Bot.* 56: 817–823.
- Bemer, M., Karlova, R., Ballester, A., R., Tikunov, Y., M., Bovy, A., G., Wolters- Arts, M., et al.** 2012. The tomato FRUITFULL homologs TDR4/FUL1 and MBP7/FUL2 regulate ethylene-independent aspects of fruit ripening. *Plant Cell* 24: 4437–4451. doi: 10.1105/tpc.112.103283
- Ben Amor, M., Flores, B., Latché, A., Bouzayen, M., Pech, J.C., Romojaro, F.** 1999. Inhibition of ethylene biosynthesis by antisense ACC oxidase RNA prevents chilling injury in Charentais cantaloupe melons, *Plant Cell Environ.* 22: 1579–1586.
- Ben-Cheikh, W., Perez-Botella, J., Tadeo, F.R., Talon, M., Primo-Millo, E.** 1997. Pollination increases gibberellin levels in developing ovaries of seeded varieties of citrus, *Plant Physiol.* 114: 557–564.
- Beno-Moualem, D., Gusev, L., Dvir, O., Pesis, E., Meir, S., Lichter, A.** 2004. The effects of ethylene, methyl jasmonate and 1-MCP on abscission of cherry tomatoes from the bunch and expression of endo-1,4- $\beta$ -glucanases, *Plant Sci.* 167: 499–507.
- Bernard, D.G., Cheng, Y., Zhao, Y., and Balk, J.** 2009. An allelic mutant series of ATM3 reveals its key role in the biogenesis of cytosolic iron-sulfur proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 151: 590–602.
- Bird, D., Beisson, F., Brigham, A., Shin, J., Greer, S., Jetter, R., Kunst, L., Wu, X., Yephremov, A., and Samuels, L.** 2007. Characterization of *Arabidopsis* ABCG11/WBC11, an ATP binding cassette (ABC) transporter that is required for cuticular lipid secretion. *Plant J.* 52: 485–498.
- Blakeslee, J. J., Bandyopadhyay, A., Lee, O. R., Mravec, J., Tipapiwatanakun, B., Sauer, M., Makam, S. N., Cheng, Y., Bouchard, R., Adamec, J.** 2007. Interactions among PIN-FORMED and P-glycoprotein auxin transporters in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 131–147
- Blanusa, T., Else, M.A., Atkinson, C.J., Davies, W.J.** 2005. The regulation of sweet cherry fruit abscission by polar auxin transport. *Plant Growth Regul.* 45: 189–198.

**Bleecker, A.B., Patterson, S.E.** 1997. Last exit: senescence, abscission, and meristem arrest in *Arabidopsis*. *PlantCell* 9: 1169-1179.

**Bottcher, C., Keyzers, R. A., Boss, P. K., Davies, C.** 2010. Sequestration of auxin by the indole-3-acetic acid-amino synthase GH3-1 in grape berry (*Vitis vinifera* L.) and the proposed role of auxin conjugation during ripening. *J. Exp. Bot.* 61: 3615-3625. doi: 10.1093/jxb/erq174

**Botton, A., Eccher, G., Forcato, C., Ferrarini, A., Begheldo, M., Zermiani, M., Moscatello, S., Battistelli, A., Velasco, R., Ruperti, B., Ramina, A.** 2011. Signaling pathways mediating the induction of apple fruitlet abscission, *Plant Physiol.* 155: 185-208.

**Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J.** 1999. Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci* 1999; 140:103-25

**Bovet, L., Feller, U., Martinoia, E.** 2005. Possible involvement of plant ABC transporters in cadmium detoxification: a cDNA submicroarray approach. *Environment International* 3: 263-267.

**Bower, J., Holdford, P., Latché, A., Pech, J.C.** 2002. Culture conditions and detachment of the fruit influence the effect of ethylene on the climacteric respiration of the melon, *Postharvest Biol. Technol.* 26: 135-146.

**Braz, A.S.K., Finnegan, J., Waterhouse, P., and Margis, R.** 2004. A plant orthologue of RNase L inhibitor (RLI) is induced in plants showing RNA interference. *J. Mol. Evol.* 59: 20-30.

**Brown, K.M.** 1997. Ethylene and abscission, *Physiol. Plant* 100: 567-576.

**Brownfield, L., Doblin, M., Fincher, G. B., Bacic, A.** 2009. Biochemical and molecular properties of biosynthetic enzymes for (1,3)- $\beta$ -glucans in embryophytes, chlorophytes and rhodophytes. *Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides*. Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-373971-1.00008-X>

**Brumelli, D.A., Hall, B.D., Bennett, A.B.** 1999. Antisense suppression of tomato endo- 1,4-beta-glucanase Cel2 mRNA accumulation increases the force required to break fruit abscission zones but does not affect fruit softening, *Plant Mol. Biol.* 40: 615-622.

**Bukovac, M.J.** 1979. Machine-harvest of sweet cherries: effect of ethephon on fruit removal and quality of the processed fruit, *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 104: 289-294.

**Burla B., Pfrunder S., Nagy R., Francisco R. M., Lee Y., Martinoia E.** 2013. Vacuolar transport of abscisic acid glucosyl ester is mediated by ATP-binding cassette and proton-antiport mechanisms in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 163 1446-1458 10.1104/pp.113.222547

**Burns, J.K. Buker, R.S., Roka, F.M.** 2005. Mechanical harvesting capacity in sweet orange is increased with an abscission agent, *HortTechnology* 15: 758-765.

- Burns, J.K., Lewandowski, D.J., Nairn, C.J., Brown, G.E.** 1998 Endo-1,4- $\beta$ -glucanase gene expression and cell wall hydrolase activities during abscission in Valencia orange, *Physiol. Plant* 102: 217–225.
- Burr, C.A., Leslie, M.E., Orłowski, S.K., Chen, I., Wright, C.E., Daniels, M.J., Liljegren, S.J.** 2011. CAST AWAY, a membrane-associated receptor-like kinase, inhibits organ abscission in Arabidopsis, *Plant Physiol.* 156: 1837–1850.
- Busi, M.V., Bustamante, C., D'Angelo, C., Hidalgo-Cuevas, M., Boggio, S.B., Valle, E.M., Zabaleta, E.** 2003. MADS-box genes expressed during tomato seed and fruit development, *Plant Mol. Biol.* 52: 801–815.
- Bustamante, C. A., Civello, P. M., and Martinez, G. A.** 2009. Cloning of the promoter region of beta-xylosidase (FaXyl1) gene and effect of plant growth regulators on the expression of FaXyl1 in strawberry fruit. *Plant Sci.* 177: 49–56. doi: 10.1016/j.plantsci.2009.03.015
- Butenko, M.A., Patterson, S.E., Grini, P.E., Stenvik, G.E., Amundsen, S.S., Mandal, A., Aalen, R.B.** 2003. Inflorescence deficient in abscission controls floral organ abscission in Arabidopsis and identifies a novel family of putative ligands in plants, *Plant Cell* 15: 2296–2307.
- Butenko, M.A., Shi, C.L., Aalen, R.B.** 2012. KNAT1, KNAT2 and KNAT6 ACT DOWNSTREAM in the IDA-HAE/HSL2 signaling pathway to regulate floral organ abscission, *Plant Signal Behav.* 7: 135–138.
- Cai, S., Lashbrook, C.C.** 2008. Stamen abscission zone transcriptome profiling reveals new candidates for abscission control: enhanced retention of floral organs in transgenic plants overexpressing Arabidopsis ZINC FINGER PROTEIN2, *Plant Physiol.* 146: 1305–1321.
- Caldana, C., Fernie, A. R., Willmitzer, L., Steinhauser, D.** 2012. Unraveling retrograde signaling pathways: finding candidate signaling molecules via metabolomics and systems biology driven approaches. *Front. Plant Sci.* 3:267. doi: 10.3389/fpls.2012.00267
- Carrari, F., Baxter, C., Usadel, B., Urbanczyk-Wochniak, E., Zanon, M. I., Nunes-Nesi, A., et al.** 2006. Integrated analysis of metabolite and transcript levels reveals the metabolic shifts that underlie tomato fruit development and highlight regulatory aspects of metabolic network behavior. *Plant Physiol.* 142: 1380–1396. doi: 10.1104/pp.106.088534
- Carrera, E., Holman, T., Medhurst, A., Peer, W., Schmuths, H., Footitt, S., Theodoulou, F.L., Holdsworth, M.J.** 2007 Gene expression profiling reveals defined functions of the ATP-binding cassette transporter COMATOSE late in phase II of germination. *Plant Physiol* 143: 1669–1679
- Castillejo, C., de la Fuente, J. I., Iannetta, P., Botella, M. A., Valpuesta, V.** 2004. Pectin esterase gene family in strawberry fruit: study of FaPE1, a ripening-specific isoform. *J. Exp. Bot.* 55: 909–918. doi: 10.1093/jxb/erh102

- Cevallos, J.C., Reid, M.S.** 2001. Effect of dry and wet storage at different temperatures on the vase life of cut flowers, *HortTechnology* 11: 199–202.
- Cevik, V., Ryder, C. D., Popovich, A., Manning, K., King, J. K., Seymour, G. B.** 2010. A FRUITFULL- like gene is associated with genetic variation for fruit flesh firmness in apple (*Malus domestica* Borkh.) *Tree Genet. Genomes* 6: 271–279. doi: 10.1007/s11295-009-0247-4
- Chai, Y. M., Jia, H. F., Li, C. L., Dong, Q. H., Shen, Y.Y.** 2011. FaPYR1 is involved in strawberry fruit ripening. *J. Exp. Bot.* 62: 5079–5089. doi: 10.1093/jxb/err207
- Chan, S. W., Henderson, I. R., Jacobsen, S. E.** 2005. Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 6: 351– 360. doi: 10.1038/nrg1601
- Chen, H.Q., Dekkers, K.L.** 2006. Evaluation of grow the regulator inhibitors for controlling post bloom fruit drop (PFD) of citrus induced by the fungus *Colletotrichum acutatum*. *HortScience* 41: 1317-1321.
- Chen, M.K., Hsu, W.H., Lee, P.F., Thiruvengadam, M., Chen, H.I., Yang, C.H.** 2011. The MADS box gene, FOREVER YOUNG FLOWER, acts as a repressor controlling floral organ senescence and abscission in *Arabidopsis*, *Plant J.* 68: 168–185.
- Chen, S.** 2007 Functional characterization of AtATM1, AtATM2, and AtATM3, a subfamily of *Arabidopsis* half-molecule ATP-binding cassette transporters implicated in iron homeostasis. *J. Biol. Chem.* 282: 21561–21571
- Cho, H.T., Cosgrove, D.J.** 2000. Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 9783–9788.
- Cho, M., Lee, S.H., and Cho, H-T.** 2007. P-glycoprotein4 displays auxin efflux transporter-like action in *Arabidopsis* root hair cells and tobacco cells. *Plant Cell* 19: 3930–3943.
- Cho, S.K., Larue, C.T., Chevalier, D., Wang, H., Jinn, T.L., et al.** 2008. Regulation of floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 15629–15634.
- Choi, H., Jin, J.Y., Choi, S., Hwang, J.U., Kim, Y.Y., Suh, M.C., and Lee, Y.** 2011. An ABCG/WBC-type ABC transporter is essential for transport of sporopollenin precursors for exine formation in developing pollen. *Plant J.* 65: 181-193.
- Civello, P. M., Powell, A. L., Sabehat, A., Bennett, A. B.** 1999. An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit. *Plant Physiol.* 121: 1273–1280. doi: 10.1104/ pp.121.4.1273
- Clendennen, S.K., Kellogg, J.A., Wilff, K.A., Matsumura, W., Peters, S., Vanwinkle, J.E., Copes, B., Pieper, W., Kramer, M.G.** 1999. Genetic engineering of cantaloupe to reduce ethylene biosynthesis and control ripening, in: A.K.Kanellis, C. Chang, H. Klee, A.B. Bleecker, J.C. Pech, D. Grierson (Eds.), *Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene*, Kluwer, Dordrecht, pp. 371–379.

**Clepet, C., Joobeur, T., Zheng, Y., Jublot, D., Huang, M., et al.** 2011. Analysis of expressed sequence tags generated from full-length enriched cDNA libraries of melon. *BMC Genomics* 12: 252.

**Clouse, S.** 2011. Brassinosteroid Signal Transduction: From Receptor Kinase Activation to Transcriptional Networks Regulating Plant Development. *The Plant Cell* 23: 1219-1230.

**Cock, J.M., Sterck, L., Rouze, P., Scornet, D., Allen, A.E., Amoutzias, G., Anthouard, V., Artiguenave, F., Aury, J.M., and Badger, J.H.** 2010. The Ectocarpus genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. *Nature* 465: 617-621.

**Cokus, S. J., Feng, S., Zhang, X., Chen, Z., Merriman, B., Haudenschild, C.D., et al.** 2008. Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature* 452: 215-219. doi: 10.1038/nature06745

**Cole, M., Nolte, C., Werr, W.** 2006. Nuclear import of the transcription factor SHOOT MERISTEMLESS depends on heterodimerization with BLH proteins expressed in discrete sub-domains of the shoot apical meristem of Arabidopsis thaliana, *Nucleic Acids Res.* 34: 1281-1292

**Coombe, B. G.** 1992. Research on development and ripening of the grape berry. *Am. J. Enol. Vitic.* 43: 101-111. doi: 10.1111/j.1755-0238.2000.tb00171.x

**Crouzet, J., Trombik, T., Fraysse, A.S., Boutry, M.,** 2006. Organization and function of the plant pleiotropic drug resistance ABC transporter family. *FEBS Lett.* 580:1123-1130.

**Cubas, P., Vincent, C., Coen, E.** 1999. An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. *Nature* 401: 157-161. doi: 10.1038/43657

**Dal Cin, V., Boschetti, A., Dorigoni, A., Ramina, A.** 2007. Benzylaminopurine application on two different apple cultivars (*Malus domestica*) displays new and unexpected fruitlet abscission features, *Ann. Bot.* 99: 1195-1202.

**Dal Cin, V., Velasco, R., Ramina, A.** 2009. Dominance induction of fruitlet shedding in *Malus domestica* (L. Borkh): molecular changes associated with polar auxin transport. *BMC Plant Biol* 9: 139-152.

**DalCin, V., Barbaro, E., Danesin, M., Murayama, H., Velasco, R., Ramina, A.** 2009. Fruitlet abscission: a cDNA-AFLP approach to study genes differentially expressed during shedding of immature fruits reveals the involvement of a putative auxin hydrogen symporter in apple (*Malus domestica* L. Borkh). *Gene* 442: 26-36.

**DalCin, V., Danesin, M., Boschetti, A., Dorigoni, A., Ramina, A.** 2005. Ethylene biosynthesis and perception in apple fruit let abscission (*Malus domestica* L. Borkh). *J. exp. Bot.* 56: 2995-3005.

**DalCin, V., Galla, G., Boschetti, A., Dorigoni, A., Velasco, R.** 2007. Ethylene involvement in auxin transport during apple fruitlet abscission (*Malus domestica* L. Borkh). In: Ramina,

A., Chang, C., Giovannoni, J., Klee, H., Perata, P., Woltering, E. (ed.): Advances in Plant Ethylene Research, pp. 89-93. Springer, Dordrecht.

**Dandekar, A.A., Teo, G., Defilippi, B.G., Uratsu, S.L., Passey, A.J., Kader, A.A., Stow, J.R., Colgan, R.J., James, D.J.** 2004. Effect of down-regulation of ethylene biosynthesis on fruit flavor complex in apple fruit, *Transgenic Res.* 13: 373–384.

**Dassa, E. and Bouige, P.** 2001 The ABC of ABCs: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Res. Microbiol.* 152:211–229

**David, B; Parsons, M.** 1981. Manuales para educación agropecuaria: Cucurbitáceas. Primera edición. México D.F. 56. ISBN: 968-24-1111-4

**Davies, C., Boss, P. K., Robinson, S. P.** 1997. Treatment of grape berries, a nonclimacteric fruit with a synthetic auxin, retards ripening and alters the expression of developmentally regulated genes. *Plant Physiol.* 115: 1155–1161.

**De la Fuente, J. I., Amaya, I., Castillejo, C., Sanchez-Sevilla, J. F., Quesada, M. A., Botella, M. A., et al.** 2006. The strawberry gene FaGAST affects plant growth through inhibition of cell elongation. *J. Exp. Bot.* 57: 2401– 2411. doi: 10.1093/jxb/erj213

**Defilippi, B.G., Dandekar, A.M., Kader, A.A.** 2005. Impact of suppression of ethylene action or biosynthesis on flavor metabolites in apple (*Malus domestica* Borkh) fruits, *J. Agric. Food Chem.* 52: 5694–5701.

**Defilippi, B.G., Kader, A.A., Dandekar, A.M.** 2004. Apple aroma: alcoholacyltransferase, a rate limiting step for ester biosynthesis, is regulated by ethylene, *Plant Sci.* 168: 1199–1210.

**Deikman, J.** 1997. Molecular mechanisms of ethylene regulation of gene transcription, *Physiol. Plant.* 100: 561–566.

**Del Campillo, E., Bennett, A.B.** 1996. Pedicel break strength and cellulase gene expression during tomato flower abscission, *Plant Physiol.* 111: 813–820.

**Deleu, W., Esteras, C., Roig, C., González-To, M., Fernández-Silva, I., et al.** 2009. A set of EST-SNPs for map saturation and cultivar identification in melon. *BMC Plant Biol* 9: 90.

**Deluc, L. G., Grimplet, J., Wheatley, M. D., Tillett, R. L., Quilici, D. R., Osborne, C., et al.** 2007. Transcriptomic and metabolite analyses of Cabernet Sauvignon grape berry development. *BMC Genomics* 8:429. doi: 10.1186/1471-2164-8-429

**Deneka, M., Neeft, M., van der Sluijs, P.** 2003 Regulation of membrane transport by rab GTPases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 38: 121-142.

**Dinneny, J. R., Weigel, D., and Yanofsky, M. F.** 2005. A genetic framework for fruit patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 132: 4687– 4697. doi: 10.1242/dev.02062

- Dong, J., Lai, R., Nielsen, K., Fekete, C.A., Qiu, H., and Hinnebusch, A.G.** 2004. The essential ATP-binding cassette protein RLI1 functions in translation by promoting preinitiation complex assembly. *J. Biol. Chem.* 279: 42157-42168
- Douglas, S.J., Chuck, G., Dengler, R.E., Pelecanda, L., Riggs, C.D.** 2002. KNAT1 and ERECTA regulate inflorescence architecture in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 14: 547–558.
- Edgar, R. C.** 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32: 1792–1797. doi:10.1093/nar/gkh340
- Eduardo, I., Arus, P., Monforte, A.J.** 2005. Development of a genomic library of near isogenic lines (NILs) in melon (*Cucumis melo* L.) from the exotic accession PI161375. *TheorAppl Genet* 112(1): 139–148.
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., Botstein, D.** 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14863-14868.
- Elitzur, T., Vrebalov, J., Giovannoni, J. J., Goldschmidt, E. E., Friedman, H.** 2010. The regulation of MADS- box gene expression during ripening of banana and their regulatory interaction with ethylene. *J. Exp. Bot.* 61: 1523–1535. doi: 10.1093/jxb/erq017
- El-Kereamy, A., Chervin, C., Rous-tan, J. P., Cheynier, V., Sou-quet, J. M., Moutounet, M., et al.** 2003. Exogenous ethylene stimulates the long-term expression of genes related to anthocyanin biosynthesis in grape berries. *Physiol. Plant.* 119: 175–182. doi: 10.1034/j.1399- 3054.2003.00165.x
- Ellis, C.M., Nagpal, P., Young, J.C., Hagen, G., Guilfoyle, T.J., Reed, J.W.** 2005. AUXIN RESPONSE FACTOR1 and AUXIN RESPONSE FACTOR2 regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*, *Development* 132: 4563–4574.
- Else, M.A., Stankiewicz-Davies, A.P., Crisp, C.M., Atkinson, C.J.** 2004. The role of polar aux in transport through pedicels of *Prunus avium* L. in relation to fruit development and retention. *J. exp. Bot.* 55: 2099-2190.
- El-Sharkawy, Manríquez, D., Flores, F.B., Regad, F., Bouzayen, M., Latché, A., Pech, J.C.** 2005. Functional characterization of a melon alcohol acyltransferase gene family involved in the biosynthesis of estervolatiles. Identification of the crucial role of a threonine residue for enzyme activity, *Plant Mol. Biol.* 59: 343–360.
- Enfissi, E. M., Barneche, F., Ahmed, I., Lichtle, C., Gerrish, C., McQuinn, R. P., et al.** 2010. Integrative transcript and metabolite analysis of nutritionally enhanced DE-ETIOLATED1 down regulated tomato fruit. *Plant Cell* 22: 1190–1215. doi: 10.1105/ tpc.110.073866
- Ergun, M., Jeong, J.W., Huber, D.J., Cantliffe, D.J.** 2005. Suppression of ripening and softening of 'Galia' melons by 1-methylcyclopropene applied at pre-ripening stages of development, *HortScience* 40: 170–175.
- Eriksson, E.M., Bovy, A., Manning, K., Harrison, L., Andrews, J., De Silva, J., Tucker, G.A., Seymour, G.B.** 2004. Effect of the Colorless non-ripening mutation on cell wall

biochemistry and gene expression during tomato fruit development and ripening, *Plant Physiol.* 136: 4184–4197.

**Eriksson, O., Friis, E. M., and Lofgren, P.** 2000. Seed size, fruit size, and dispersal systems in angiosperms from the early cretaceous to the late tertiary. *Am. Nat.* 156: 47–58. doi: 10.1086/303367

**Esquinas-Alcázar, J.T., Gullick, P.J.** 1983. Genetic resources of Cucurbitaceae. I.B.P.G.R., Roma, 101 pp. FAO, 2012 FAOSTAT.: <http://faostat3.fao.org/home/index.html> Acceso el 20/05/2014

**Estornell, L. H., Agustí, J., Merelo, P., Talón, M., & Tadeo, F. R.** 2013. Elucidating mechanisms underlying organ abscission. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 199-200: 48–60.

**Ezura, H. Akashi, Y., Kato, K., Kuzuya, M.** 2002. Genetic characterization of long shelf-life in honeydew (*Cucumis melo var. inodorus*) melon, *Acta Hort.* 588: 369–372.

**Fait, A., Hanhineva, K., Beleggia, R., Dai, N., Rogachev, I., Nikiforova, V. J., et al.** 2008. Reconfiguration of the achene and receptacle metabolic networks during strawberry fruit development. *Plant Physiol.* 148: 730–750. doi: 10.1104/pp.108.120691

**Farage-Barhom, S., Burd, S., Sonogo, L., Perl-Treves, R., Lers, A.** 2008. Expression analysis of the BFN1 nuclease gene promoter during senescence, abscission, and programmed cell death-related processes, *J. Exp. Bot.* 59: 3247–3258.

**Farrar, K., Evans, I.M., Topping, J.F., Souter, M.A., Nielsen, J.E. and Lindsey, K.** 2003. EXORDIUM a gene expressed in proliferating cells and with a role in meristem function, identified by promoter trapping in *Arabidopsis*. *Plant J* 33:61-73.

**Fernandez, D.E., Heck, G.R., Perry, S.E., Patterson, S.E., Bleecker, A.B., Fang, S.C.** 2000. The embryo MADS domain factor AGL15 acts postembryonically. Inhibition of perianth senescence and abscission via constitutive expression, *Plant Cell* 12: 183–198.

**Fernandez, O., Bethencourt, L., Quero, A., Sangwan, R.S., Clement, C.** 2010. Trehalose and plant stress responses: friend or foe? - *Trends Plant Sci.* 15: 409-417.

**Ferrarese, L., Trainotti, L., Moretto, P., deLaureto, P. P., Rascio, N., Casadoro, G.** 1995. Differential ethylene-inducible expression of cellulase in pepper plants. *Plant Mol. Biol.* 29: 735–747. doi: 10.1007/BF00041164

**Ferro M., Brugière S., Salvi D., Seigneurin-Berny D., Court M., Moyet L., Ramus C., Miras S., Mellal M., Le Gall S., Kieffer-Jaquinod S., Bruley C., Garin J., Joyard J., Masselon C., Rolland N.** 2010. AT\_CHLORO, a comprehensive chloroplast proteome database with subplastidial localization and curated information on envelope proteins. *Mol. Cell. Proteomics* 9, 1063–1084. doi: 10.1074/mcp.M900325-MCP200

**Finkelstein, R. R., and Rock, C. D.** 2002. Abscisic acid biosynthesis and response. *Arabidopsis Book* 1:e0058. doi: 10.1199/tab.0058



**Flores, F., Ben Amor, M., Jones, B., Pech, J.C., Bouzayen, M., Latché, A., Romojaro, F.** 2001. The use of ethylene-suppressed lines to assess differential sensitivity to ethylene of the various ripening pathways in Cantaloupe melons, *Physiol. Plant.* 113: 128–133.

**Flores, F., El Yahyaoui, F., De Billerbeck, G., Romojaro, F., Latché, A., Bouzayen, M., Pech, J.C., Ambid, C.** 2002. Role of ethylene in the biosynthetic pathway of aliphatic ester aroma volatiles in Charentais Cantaloupe melons, *J. Exp. Bot.* 53: 201–206.

**Flores, F., Martinez-Madrid, M.C., Ben Amor, M., Pech, J.C., Latché, A., Romojaro, F.** 2004. Modified atmosphere packaging confers chilling tolerance one ethylene-inhibited Cantaloupe Charentais melon fruit, *Eur. Food Res. Technol.* 219: 614–619.

**Footitt, S., Dietrich, D., Fait, A., Fernie, A.R., Holdsworth, M.J., Baker, A., and Theodoulou, F.L.** 2007. The COMATOSE ATP-binding cassette transporter is required for full fertility in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 144: 1467–1480.

**Footitt, S., Marquez, J., Schmuths, H., Baker, A., Theodoulou, F.L., Holdsworth, M.** 2006. Analysis of the role of COMATOSE and peroxisomal beta-oxidation in the determination of germination potential in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 57, 2805–2814.

**Footitt, S., Slocombe, S.P., Lerner, V., Kurup, S., Wu, Y., Larson, T., Graham, I., Baker, A., Holdsworth, M.** 2002. Control of germination and lipid mobilization by COMATOSE, the Arabidopsis homologue of human ALDP. *EMBO Journal* 21: 2912–2922.

**Freeling, M.** 1992. A conceptual framework for maize leaf development, *Dev. Biol.* 153: 44–58.

**Freeling, M., Hake, S.** 1985 Developmental genetics of mutants that specify knotted leaves in maize, *Genetics* 111: 617–634.

**Fujisawa, M., Nakano, T., Shima, Y., Ito, Y.** 2013. A large-scale identification of direct targets of the tomato MADS Box transcription factor RIPENING INHIBITOR reveals the regulation of fruit ripening. *Plant Cell* 25: 371–386. doi: 10.1105/tpc.112.108118

**Gallasch, P.T.** 1996. Evaluating new selections of late hanging navel orange, *Proc. Int. Soc. Citriculture* 1: 193-197

**Garber, M., Grabherr, M.G., Guttman, M., Trapnell, C.** 2011. Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. *Nat Methods* 8(6): 469–477.

**Garcia, O., Bouige, P., Forestier, C., Dassa, E.,** 2004. Inventory and comparative analysis of rice and Arabidopsis ATP-binding cassette (ABC) systems. *J. Mol. Biol.* 343, 249–265.

**Garcia-Mas, J., Benjak, A., Sanseverino, W., Bourgeois, M., Mir, G., et al.** 2012. The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *PNAS* 109: 11872–11877.

**Geisler, M.** 2014. "Regulation of plant ABC transporters" in *Plant ABC Transporters* (Geisler M, ed.) ISBN 978-3-319-06510-6, Springer Verlag.

- Geisler M, Blakeslee JJ, Bouchard R, Lee OR, Vincenzetti V, Bandyopadhyay A, Titapiwatanakun B, Peer WA, Bailly A, Richards EL. 2005.** Cellular efflux of auxin catalyzed by the *Arabidopsis* MDR/PGP transporter AtPGP1. *Plant J* 44:179–194
- Geisler M., Murphy A.S.** 2006. The ABC of auxin transport: The role of p-glycoproteins in plant development. *FEBS Lett.* 580: 1094–1102
- Gene Ontology Consortium.** 2010. *Nucleic Acids Res.* 38 (Database issue):D331–335.
- Gil-amado, J. A., Gomez-jimenez, M. C.** 2013. Transcriptome Analysis of Mature Fruit Abscission Control in Olive, *54*(2): 244–269. <http://doi.org/10.1093/pcp/pcs179>
- Gil-Amado, J.A., Gomez-Jimenez, M.C.** 2012. Regulation of polyamine metabolism and biosynthetic gene expression during olive MFA. *Planta* 235: 1221–1237.
- Giménez, E., Pineda, B., Capel, J., Anton, M. T., Atares, A., Perez- Martin, F., et al.** 2010. Functional analysis of the Arlequin mutant corroborates the essential role of the Arlequin/TAGL1 gene during reproductive development of tomato. *PLoS ONE* 5:e14427. doi: 10.1371/journal.pone.0014427
- Giovannoni, J. J.** 2007. Fruit ripening mutants yield insights into ripening control. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10: 283–289. doi: 10.1016/j.pbi.2007.04.008
- Giovannoni, J. J., Noensie, E. N., Ruezinsky, D. M., Lu, X., Tracy, S. L., Ganai, M.W., et al.** 1995. Molecular genetic analysis of the ripening-inhibitor and non-ripening loci of tomato: a first step in genetic map-based cloning of fruit ripening genes. *Mol. Gen. Genet.* 248: 195–206. doi: 10.1007/BF02190801
- Giovannoni, J.J.** 2001. Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 725–749. doi: 10.1146/annurev.arplant.52.1.725
- Giovannoni, J.J.** 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening, *Plant Cell Suppl.* 1: S170–S180.
- Giulia, E., Alessandro, B., Mariano, D., Andrea, B., Benedetto, R., & Angelo, R.** 2013. Early induction of apple fruitlet abscission is characterized by an increase of both isoprene emission and abscisic acid content. *Plant Physiology*, 161 : 1952–69. <http://doi.org/10.1104/pp.112.208470>
- Golding, J.B., Shearer, D., Wyllie, S.G., McGlasson, W.B.** 1998. Application of 1-MCP and propylene to identify ethylene-dependent ripening processes in mature banana fruit, *Postharvest Biol. Technol.* 14: 87–98.
- Gomez-Cadenas, A., Mehouchi, J., Tadeo, F.R., Primo-Millo, E., Talon, M.** 2000. Hormonal regulation of fruitlet abscission induced by carbohydrate shortage in citrus, *Planta* 210: 636–643.
- Gomez-Cadenas, A., Tadeo, F.R., Talon, M., Primo-Millo, E.** 1996. Leaf abscission induced by ethylene in water-stressed intact seedlings of Cleopatra Mandarin requires previous abscisic acid accumulation in roots, *Plant Physiol.* 112: 401–408.

- Gómez-Guillamón, M.L., Álvarez, J.M.** 2001 en *La horticultura española. Ediciones de horticultura*, Melón, eds. Nuez F., Llácer G. (Barcelona), (Spain), 194–198.
- Gomez-Jimenez, M.C., Paredes, M.A., Gallardo, M., Sanchez-Calle, I.M.** 2010. Mature fruit abscission is associated with up-regulation of polyamine metabolism in the olive abscission zone. *J.PlantPhysiol.* 167: 1432-1441.
- Gomez-Mena, C., Sablowsky, R.** 2008. ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX GENE1 establishes the basal boundaries of shoot organs and controls stem growth, *Plant Cell* 20: 2059–2072.
- Gomez-Roldan, V., Fermas, S., Brewer, P. B., Puech-Pages, V., Dun, E. A., Pillot, J. P., Letisse, F., Matusova, R., Danoun, S., Portais, J. C. et al.** 2008. Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 455, 189-194
- Gonzalez-Bosch, C., Del Campillo, E., Bennett, A.B.** 1997. Immunodetection and characterization of tomato endo-beta-1,4-glucanase Cel1 protein in flower abscission zones, *Plant Physiol.* 114: 1541–1546.
- Gonzalez-Carranza, Z.H., Elliott, K.A., Roberts, J.A.** 2007. Expression of polygalacturonases and evidence to support their role during cell separation processes in *Arabidopsis thaliana*, *J. Exp. Bot.* 58: 3719–3730.
- Gonzalez-Carranza, Z.H., Roberts, J.A.** 2012 Ethylene and cell separation processes. *Annual Plant Reviews* 44: 243-273.
- Gonzalez-Carranza, Z.H., Whitelaw, C.A., Swarup, R., Roberts, J.A.** 2002. Temporal and spatial expression of a polygalacturonase during leaf and flower abscission in oilseed rape and *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 128: 534–543.
- Gonzalez-Ibeas, D., Blanca, J., Roig, C., Gonzalez-To, M., Pico, B., Truniger, V., Gomez, P., Deleu, W., Cano-Delgado, A., Arus, P., et al.** 2007. MELOGEN: an EST database for melon functional genomics. *BMC Genomics*, 8:306.
- Gonzalo, M.J., Oliver, M., Garcia-Mas, J., Monfort, A., Dolcet-Sanjuan, R., Katzir, N., Arus, P., Monforte, A.** 2005. Simple-sequence repeat markers used in merging linkage maps of melon (*Cucumis melo* L.). *Theor Appl Genet* 110: 802-811.
- Goodman, C.D., Casati, P., and Walbot, V.** 2004. A multidrug resistance-associated protein involved in anthocyanin transport in *Zea mays*. *Plant Cell* 16: 1812-1826.
- Goren, R.** 1993. Anatomical, physiological, and hormonal aspects of abscission in citrus, in: J. Janick (Ed.), *Horticultural Reviews*, John Wiley & Sons, Inc., Oxford, pp. 145–182.
- 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.

**Grimplet, J., Deluc, L. G., Tillett, R. L., Wheatley, M. D., Schlauch, K. A., Cramer, G. R., et al.** 2007. Tissue-specific mRNA expression profiling in grape berry tissues. *BMC Genomics* 8:187. doi: 10.1186/1471-2164-8-187

**Gross, B. L., & Olsen, K. M.** 2010. Genetic perspectives on crop domestication. *Trends in Plant Science*, 15: 529–537. <http://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.05.008>

**Grossmann, K.** 1991. Induction of leaf abscission in cotton is a common effect of urea- and adenine-type cytokinins, *Plant Physiol.* 95: 234–237.

**Gubert, C. M., Christy, M. E., Ward, D. L., Groner, W. D., & Liljegren, S. J.** 2014. ASYMMETRIC LEAVES1 regulates abscission zone placement in Arabidopsis flowers. *BMC Plant Biology*, 14(1), 195. doi:10.1186/s12870-014-0195-5

**Gudesblat, G.E., Russinova, E.** 2011. Plants grow on brassinosteroids. *Current Opinion in Plant Biology* 14: 1-8.

**Guis, M., Botondi, R., Ben Amor, M., Ayub, R., Bouzayen, M., et al.** 1997. Ripening-associated biochemical traits of cantaloupe Charentais melons expressing an antisense ACC oxidase transgene. *J Am Soc Horticult Sci* 122: 748–751.

**Gussman, C.D., Goffredz, J.C., Gianfagna, T.J.** 1993. Ethylene production and fruit-softening rates in several apple fruit ripening variants, *HortScience* 28: 135–137.

**Ha, C.M., Jun, J.H., Nam, H.G., Fletcher, J.C.** 2004. BLADE-ON-PETIOLE1 encodes a BTB/POZ domain protein required for leaf morphogenesis in Arabidopsis thaliana, *Plant Cell Physiol.* 45: 1361–1370.

**Ha, C.M., Kim, G.T., Kim, B.C., Jun, J.H., Soh, M.S., Ueno, Y., Machida, Y., Tsukaya, H., Nam, H.G.** 2003. The BLADE-ON-PETIOLE 1 gene controls leaf pattern formation through the modulation of meristematic activity in Arabidopsis, *Development* 130: 161–172.

**Hadfield, K.A., Dang, T., Guis, M., Pech, J.C., Bouzayen, M., Bennett, A.B.** 2000. Characterization of ripening-related cDNAs and their expression in ethylene-suppressed Charentais melon fruit, *Plant Physiol.* 122: 977–983.

**Haizel, T., Merkle, T., Pay, A., Fejes, E., Nagy, F.** 1997. Characterization of proteins that interact with the GTP-bound form of the regulatory GTPase Ran in Arabidopsis. *Plant Journal* 11: 93-103.

**Hamilton, A. J., Lycett, G.W., Grierson, D.** 1990. Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature* 346: 284–287. doi: 10.1038/346284a0

**Hanson, J., Smeekens, S.** 2009. Sugar perception and signaling, an update. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 562-567.

**Harada, T., Sunako, T., Wakasa, Y., Soejima, J., Satoh, T., Niizeki, M.** 1985. An allele of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene accounts for the low level of

ethylene production in climacteric fruits of some apple cultivars, *Theor. Appl. Genet.* 101: 742–746.

**Harel-Beja, R., Tzuri, G., Portnoy, V., Lotan-Pompan, M., Lev, S., Cohen, S., Dai, N., Yeselson, L., Meir, A., Libhaber, S.E., Avisar, E., Melame, T., van Koert, P., Verbakel, H., Hofstede, R., Volpin, H., Oliver, M., Fougedoire, A., Stalh, C., Fauve, J., Copes, B., Fei, Z., Giovannoni, J., Ori, N., Lewinsohn, E., Sherman, A., Burger, J., Tadmor, Y., SchaVer, A.A., Katzir, N.** 2010. A genetic map of melon highly enriched with fruit quality QTL and EST markers, including sugar and carotenoid metabolism genes. *Theor Appl Genet* **121**: 511-533.

**Harpster, M. H., Lee, K. Y., Dunsmuir, P.** 1997. Isolation and characterization of a gene encoding endo-beta-1,4-glucanase from pepper (*Capsicum annum* L). *Plant Mol. Biol.* 33: 47–59. doi: 10.1023/A:1005795028489

**Hartmond, U., Yuan, R.C., Burns, J.K., Grant, A., Kender, W.** 2000. Citrus fruit abscission induced by methyl-jasmonate. *J. amer. Soc. hort. Sci.* 125: 547-552.

**Heck, G.R., Perry, S.E., Nichols, K.W., Fernandez, D.E.** 1995. AGL15, a MADS domain protein expressed in developing embryos, *Plant Cell* 7: 1271–1282.

**Henikoff, S., Greene, E.A., Pietrokovski, S., Bork, P., Attwood, T.K., and Hood, L.** 1997. Gene families: The taxonomy of protein paralogs and chimeras. *Science* 278: 609–614

**Hepworth, S.R., Zhang, Y., McKim, S., Li, X., Haughn, G.W.** 2005. BLADE-ON-PETIOLE-dependent signaling controls leaf and floral patterning in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 17: 1434–1448.

**Hileman, L. C., Sundstrom, J. F., Litt, A., Chen, M., Shumba, T., Irish, V. F.** 2006. Molecular and phylogenetic analyses of the MADS-box gene family in tomato. *Mol. Biol. Evol.* 23: 2245–2258. doi: 10.1093/mol- bev/msl095

**Hilt, C., Bessis, R.** 2003. Abscission of grape vine fruit lets in relation to ethylene biosynthesis. *Vitis* 42: 1-3.

**Himmelbach, A., Yang, Y., Grill, E.** 2003. Relay and control of abscisic acid signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 470–479. doi: 10.1016/S1369- 5266(03)00090-6

**Hirayama, T., Shinozaki, K.** 2007. Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends Plant Sci.* 12: 343–351. doi: 10.1016/j.tplants.2007.06.013

**Hisawa, K., Kinugasa, Y., Amano, S., Hashimoto, A., Nakano, R., Inaba, A., Kubo, Y.** 2003. Ethylene is required for both the initiation and progression of softening in pear (*Pyrus communis* L.) fruit, *J. Exp. Bot.* 54: 771–779.

**Hooks, M.A., Turner, J.E., Murphy, E.C., Johnston, K.A., Burr, S., and Jaroslawski, S.** 2007. The *Arabidopsis* ALDP protein homologue CO- MATOSE is instrumental in peroxisomal acetate metabolism. *Biochem. J.* 406: 399-406.

- Huang, C.F., Yamaji, N., Mitani, N., Yano, M., Nagamura, Y., Ma, J.F.** 2009 A bacterial-type ABC transporter is involved in aluminum tolerance in rice. *Plant Cell* 21:655–667
- Huang, C.H., Yamaji, N., Ma, J.F.** 2010. Knockout of a Bacterial-Type ATP-Binding Cassette Transporter Gene, *AtSTAR1*, Results in Increased Aluminum Sensitivity in *Arabidopsis* *Plant Physiology* August 153: 1669-1677. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.110.155028>
- Iannetta, P. P. M., Laarhovenb, L. J., Medina-Escobar, N., James, E. K., McManuse, M. T., Davies, H. V., et al.** 2006. Ethylene and carbon dioxide production by developing strawberries show a correlative pattern that is indicative of ripening climacteric fruit. *Physiol. Plant.* 127: 247–259. doi: 10.1111/j.1399- 3054.2006.00656.x
- Iglesias, D.J., Tadeo, F.R., Primo-Millo, E., Talon, M.** 2003. Fruit set dependence on carbohydrate availability in citrus trees. *TreePhysiol.* 23: 199-204.
- Iglesias, D.J., Tadeo, F.R., Primo-Millo, E., Talon, M.** 2006. Carbohydrate and ethylene levels related to fruit let drop through AZ A in citrus. *Trees* 20: 348-355.
- Iliev, E.A., Xu, W., Polisensky, D.H., Oh, M.H., Torisky, R.S., Clouse, S.D., Braam, J.** 2002. Transcriptional and posttranscriptional regulation of *Arabidopsis* TCH4 expression by diverse stimuli. Roles of cis regions and brassinosteroids. *Plant Physiol.* **130**: 770-783.
- Ish-Shalom, M., Dahan, Y., Maayan, I., Irihimovitch, V.** 2011. Cloning and molecular characterization of anethylene receptor gene, *MiERS1*, expressed during mango fruit let abscission and fruit ripening. *Plant Physiol. Biochem.* 49: 931-936.
- Itkin, M., Seybold, H., Breitel, D., Rogachev, I., Meir, S., Aharoni, A.** 2009. TOMATO AGAMOUS- LIKE 1 is a component of the fruit ripening regulatory network. *Plant J.* 60: 1081–1095. doi: 10.1111/j.1365- 313X.2009.04064.x
- Ito, H., Gray, W.M.** 2006. A gain-of-function mutation in the *Arabidopsis* pleiotropic drug resistance transporter PDR9 confers resistance to auxinic herbicides. *Plant Physiol.* 142: 63–74.
- Ito, Y., y Nakano, T.** 2015. Development and regulation of pedicel abscission in tomato. *Frontiers in Plant Science*, 6:1–6. <http://doi.org/10.3389/fpls.2015.00442>
- Iwaya-Inoue, M. Takata, M.** 2001. Trehalose plus chloramphenicol prolong the vase life of tulip flowers, *HortScience* 36: 946–950.
- Jaakola, L., Poole, M., Jones, M. O., Kämäräinen-Karppinen, T., Koskimäki, J. J., Hohtola, A., et al.** 2010. A SQUAMOSA MADS box gene involved in the regulation of anthocyanin accumulation in bilberry fruits. *Plant Physiol.* 153: 1619– 1629. doi: 10.1104/pp.110.158279
- Jackson, M.B., Osborne, D.J.** 1970. Ethylene, the natural regulator of leaf abscission, *Nature* 225: 1019–1022.

- Jaillon, O., Aury, J. M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., et al.** 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449: 463–465. doi: 10.1038/nature06148
- Jaquinod M., Villiers F., Kieffer-Jaquinod S., Hugouvieux V., Bruley C., Garin J.,** 2007. A proteomics dissection of *Arabidopsis thaliana* vacuoles isolated from cell culture. *Mol. Cell Proteomics* 6, 394–412
- Jeffrey, C.** 1980. A review of the Cucurbitaceae. *Bot. J. Linn. Soc.* 81:233-247
- Jeffrey, D., Smith, C., Goodenough, P., Prosser, I., Grierson, D.** 1984. Ethylene independent and ethylene-dependent biochemical changes in ripening tomatoes, *PlantPhysiol.* 74: 32–38.
- Ji, H., Kim, S.R., Kim, Y.H., Kim, H., Eun, M.Y., Jin, I.D., Cha, Y.S., Yun, D.W., Ahn, B.O., Lee, M.C., Lee, G.S., Yoon, U.H., Lee, J.S., Lee, Y.H., Suh, S.C., Jiang, W., Yang, J.I., Jin, P., McCouch, S.R., An, G., Koh, H.J.** 2010. Inactivation of the CTD phosphatase-like gene *OsCPL1* enhances the development of the abscission layer and seed shattering in rice, *Plant J.* 61: 96–106.
- Jia, H. F., Chai, Y. M., Li, C. L., Lu, D., Luo, J. J., Qin, L., et al.** 2011. Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening. *PlantPhysiol.* 157: 188–199. doi: 10.1104/pp.111.177311
- Jiang, C.Z., Lu, F., Imsabai, W., Meir, S., Reid, M.S.** 2008. Silencing polygalacturonase expression inhibits tomato petiole abscission, *J. Exp. Bot.* 59: 973–979.
- Jiang, Y. M., Joyce, D. C.** 2003. ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. *PlantGrowth Regul.* 39: 171–174. doi: 10.1023/A:1022539901044
- Jianguo, L., Hong, Z., Rongcai, Y.** 2010. Profiling the expression of genes related to ethylene biosynthesis, ethylene perception, and cell wall degradation during fruit abscission and fruit ripening in apple. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 135:391-401.
- Jinn, T.L., Stone, J.M., Walker, J.C.** 2000. HAESA, an *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission, *Genes Dev.* 14: 108–117.
- Jones, M.L., Woodson, W.R.** 1999. Differential expression of three members of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family in carnation, *Plant Physiol.* 119: 755–764.
- Kalaitzis, P., Hong, S.B., Solomos, T., Tucker, M.L.** 1999. Molecular characterization of a tomato endo-beta-1,4-glucanase gene expressed in mature pistils, abscission zones and fruit, *Plant Cell Physiol.* 40: 905–908.
- Kalaitzis, P., Koehler, S.M., Tucker, M.L.** 1995. Cloning of a tomato polygalacturonase expressed in abscission, *Plant Mol. Biol.* 28: 647–656.

- Kalaitzis, P., Solomos, T., Tucker, M.L.** 1997. Three different polygalacturonases are expressed in tomato leaf and flower abscission, each with a different temporal expression pattern, *Plant Physiol.* 113: 1303–1308.
- Kamiya, N., Itoh, J., Morikami, A., Nagato, Y., Matsuoka, M.** 2003. The SCARECROW gene's role in asymmetric cell divisions in rice plants, *Plant J.* 36: 45–54
- Kanai M., Nishimura M., Hayashi M.** 2010. A peroxisomal ABC transporter promotes seed germination by inducing pectin degradation under the control of ABI5. *Plant J.* 62: 936–947
- Kandasamy, M.K., Deal, R.B., McKinney, E.C., Meagher, R.B.** 2005. Silencing the nuclear actin-related protein AtARP4 in Arabidopsis has multiple effects on plant development, including early flowering and delayed floral senescence, *Plant J.* 41: 845–858.
- Kandasamy, M.K., McKinney, E.C., Deal, R.B., Meagher, R.B.** 2005. Arabidopsis ARP7 is an essential actin-related protein required for normal embryogenesis, plant architecture, and floral organ abscission, *Plant Physiol.* 138: 2019–2032.
- Kang, J., Hwang, J.U., Lee, M., Kim, Y.Y., Assmann, S.M., Martinoia, E., and Lee, Y.** 2010. PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 2355–2360.
- Kang, J., Park, J., Choi, H., Burla, B., Kretschmar, T., Lee, Y., Martinoia, E.** 2011. Plant ABC Transporters. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 9, e0153. <http://doi.org/10.1199/tab.0153>
- Karupiah, K.J., Burns, J.K.** 2010. Expression of ethylene biosynthesis and signaling genes during differential abscission responses of sweet orange leaves and mature fruit. *J. amer. Soc. hort. Sci.* 135: 456-464.
- Kazokas, W.C., Burns, J.K.** 1998. Cellulase activity and gene expression in citrus fruit AZ during and after ethylene treatment. *J. amer. Soc. hort. Sci.* 123: 781-786.
- Keuskamp, D.H., Sasidharan, R., Vos, I., Peeters, A.J., Voeselek, L.A.,** 2011. Blue-light-mediated shade avoidance requires combined auxin and brassinosteroid action in Arabidopsis seedlings. *Plant J* 67: 208–217.
- Khan, M., Xu, M., Murmu, J., Tabb, P., Liu, Y., Storey, K., McKim, S.M., Douglas, C.J., Hepworth, S.R.** 2011. Antagonistic interaction of BLADE-ON-PETIOLE1 and 2 with BREVIPEDICELLUS and PENNYWISE regulates Arabidopsis inflorescence architecture, *Plant Physiol.* 158: 946–960
- Khan, M., Xu, H., & Hepworth, S. R.** 2014. BLADE-ON-PETIOLE genes: Setting boundaries in development and defense. *Plant Science*, 215: 157–171. <http://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.10.019>
- Khripach, V.A., Zhabinskii, V.N., Groot, A.E.** 1999. Brassinosteroids, a New Class of Plant Hormones, Academic Press, London.



- Kim, D.Y., Bovet, L., Maeshima, M., Martinoia, E., and Lee, Y.** 2007. The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance. *Plant J.* 50: 207-218.
- Klein, M., Burla, B., and Martinoia, E.** 2006. The multidrug resistance-associated protein (MRP/ABCC) subfamily of ATP-binding cassette transporters in plants. *FEBS Lett.* 580: 1112-1122.
- Klein, M., Geisler, M., Suh, S.J., Kolukisaoglu, H.U., Azevedo, L., Plaza, S., Curtis, M.D., Richter, A., Weder, B., Schulz, B., et al** 2004 Disruption of AtMRP4, a guard cell plasma membrane ABC-type ABC transporter, leads to deregulation of stomatal opening and increased drought susceptibility. *Plant J* 39219–236
- Klie, S., Krueger, S., Krall, L., Giavalisco, P., Flügge, U. I., Willmitzer, L., et al.** 2011. Analysis of the compartmentalized metabolome—validation of the non-aqueous fractionation technique. *Front. Plant Sci.* 2:55. doi: 10.3389/fpls.2011.00055
- Knapp, S.** 2002. Tobacco to tomatoes: a phylogenetic perspective on fruit diversity in the Solanaceae. *J. Exp. Bot.* 53: 2001–2011. doi: 10.1093/jxb/erf068
- Kobae, Y., Sekino, T., Yoshioka, H., Nakagawa, T., Martinoia, E., and Maeshima, M.** 2006. Loss of AtPDR8, a plasma membrane ABC transporter of *Arabidopsis thaliana*, causes hypersensitive cell death upon pathogen infection. *Plant Cell Physiol.* 47: 309-318.
- Kobashi, K., Gemma, H., Iwahori, S.** 1999. Sugar accumulation in peach fruit as affected by abscisic acid treatment in relation to some sugar metabolizing enzymes. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 68: 465–470. doi: 10.2503/jjshs.68.465
- Kolarič, J., Pleško, M.I., Tojnko, S., Stopar, M.** 2011. Apple fruit let ethylene evolution and *MdACO1*, *MdACS5A*, and *MdACS5B* expression after application of naphthalene acetic acid, 6-benzyladenine, ethephon, or shading. *Hort Science* 46: 1381-1386.
- Konishi, S., Izawa, T., Lin, S.Y., Ebana, K., Fukuta, Y., Sasaki, T., Yano, M.** 2006. An SNP caused loss of seed shattering during rice domestication, *Science* 312: 1392–1396.
- Koukounaras, A., Sfakiotakis, E.** 2007. Effect of 1-MCP pre-storage treatment on ethylene and CO<sub>2</sub> production and quality of “Hayward” kiwi fruit during shelf-life after short, medium and long term cold storage, *Postharvest Biol. Technol.* 46: 174–180.
- Kretschmar, T., Burla, B., Lee, Y., Martinoia, E., and Nagy, R.** 2011. Functions of ABC transporters in plants. *Essays Biochem.* 50: 145–160.
- Kuang, J. F., Wu, J. Y., Zhong, H. Y., Li, C. Q., Chen, J. Y., Lu, W. J., & Li, J. G.** 2012. Carbohydrate stress affecting fruitlet abscission and expression of genes related to auxin signal transduction pathway in litchi. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12), 16084–16103. doi:10.3390/ijms131216084
- Kumar, R., Agarwal, P., Tyagi, A. K., Sharma, A. K.** 2012. Genome-wide investigation and expression analysis suggest diverse roles of auxin-responsive GH3 genes during devel-

opment and response to different stimuli in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Mol. Genet. Genomics* 287: 221–235. doi: 10.1007/s00438-011-0672-6

**Kumpf RP, Shi CL, Larrieu A, Sto IM, Butenko MA, Peret B, Riiser ES, Bennett MJ, Aalen RB.** 2013. Floral organ abscission peptide IDA and its HAE/HSL2 receptors control cell separation during lateral root emergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 110: 5235–5240

**Kunz, H.H., Scharnewski, M., Feussner, K., Feussner, I., Flügge, U.I., Fulda, M., Gierth, M.** 2009. The ABC transporter PXA1 and peroxisomal  $\beta$ -oxidation are vital for metabolism in mature leaves of *Arabidopsis* during extended darkness. *Plant Cell* 21: 2733–2749

**Kuromori, T., Miyaji, T., Yabuuchi, H., Shimizu, H., Sugimoto, E., Kamiya, A., Moriyama, Y., and Shinozaki, K.** 2010. ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 2361–2366.

**Kuromori, T., Shinozaki, K.** 2010. ABA transport factors found in *Arabidopsis* ABC transporters. *Plant Signal Behav* 5: 1124–1126.

**Kusano T, Berberich T, Tateda C, Takahashi Y.** 2008. Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*;228:367–81

**Kushnir, S., Babiychuk, E., Storozhenko, S., Davey, M.W., Papenbrock, J., De Rycke, R., Engler, G., Stephan, U.W., Lange, H., Kispal, G., et al** 2001 A mutation of the mitochondrial ABC transporter Sta1 leads to dwarfism and chlorosis in the *Arabidopsis* mutant starik. *Plant Cell* 13: 89–100

**Lafuente, M.T., Sala, J.M., Zacarias, L.** 2004. Active oxygen detoxifying enzymes and phenylalanine ammonia-lyase in the ethylene-induced chilling tolerance in citrus fruit, *J. Agric. Food Chem.* 52: 3606–3611.

**Lanahan, M. B., Yen, H. C., Giovannoni, J. J., Klee, H. J.** 1994. The never ripe mutation blocks ethylene perception in tomato. *Plant Cell* 6: 521–530. doi: 10.1105/tpc.6.4.521

**Larsen, P.B. et al.** 2007 *Arabidopsis* ALS1 encodes a root tip and stele localized half type ABC transporter required for root growth in an aluminium toxic environment. *Planta* 225: 1447–1458

**Lashbrook, C.C., Cai, S.** 2008. Cell wall remodeling in *Arabidopsis* stamen abscission zones: temporal aspects of control inferred from transcriptional profiling, *Plant Signal Behav.* 3: 733–736.

**Lashbrook, C.C., Gonzalez-Bosch, C., Bennett, A.B.** 1994. Two divergent endo-beta-1,4-glucanase genes exhibit overlapping expression in ripening fruit and abscising flowers, *Plant Cell* 6: 1485–1493.

**Lashbrooks, C.C., Giovannoni, J.J., Hall, B.D., Fischer, R.L., Bennett, A.B.** 1998. Transgenic analysis of tomato endo- $\beta$ -1,4-glucanase gene function. Role of cel1 in floral abscission, *Plant J.* 13: 303–310.

- Law, J. A., Jacobsen, S. E.** 2010. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature* 11: 204– 220. doi: 10.1038/nrg2719
- Lee M., Choi Y., Burla B., Kim Y.Y., Jeon B., Maeshima M., Yoo J.Y., Martinoia E., Lee Y.** 2008 The ABC transporter AtABCB14 is a malate importer and modulates stomatal response to CO<sub>2</sub>. *Nat. Cell Biol.*;10:1217–1223
- Lee, J. M., Joung, J. G., McQuinn, R., Chung, M. Y., Fei, Z., Tie- man, D., et al.** 2012. Combined transcriptome, genetic diversity and metabolite profiling in tomato fruit reveals that the ethylene response factor SIERF6 plays an important role in ripening and carotenoid accumulation. *Plant J.* 70: 191–204. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04863.x
- Lee, J., Park, J.J., Kim, S.L., Yim, J., An, G.** 2007. Mutations in the rice liguleless gene result in a complete loss of the auricle, ligule, and laminar joint, *Plant Mol. Biol.* 65: 487–499.
- Lee, M., Lee, K., Lee, J., Noh, E.W., and Lee, Y.** 2005. AtPDR12 contributes to lead resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 138: 827-836.
- Lee, S. J., Saravanan, R. S., Damasceno, C. M. B., Yamane, H., Kim, B.D., Rose, J. K. C.** 2004. Digging deeper into the plant cell wall proteome. *Plant Physiol. Biochem.* 42: 979–988. doi: 10.1016/j.plaphy.2004.10.014
- Lehmann, K., Hause, B., Altmann, D., Kock, M.** 2001. Tomato ribonuclease LX with the functional endoplasmic reticulum retention motif HDEF is expressed during programmed cell death processes, including xylem differentiation, germination, and senescence, *Plant Physiol.* 127: 436–449.
- Lelièvre, J.M., Latché, A., Jones, B., Bouzayen, M., Pech, J.C.** 1997. Ethylene and fruit ripening, *Physiol. Plant.* 101:727–739.
- Leñano, F.** 1980. *Hortalizas de Fruto*. 1ª edición. Barcelona: Editorial de Vecchi, S.A. 165. ISBN: 84-315-4710-3
- Lers, A., Khalchitski, A., Lomaniec, E., Burd, S., Green, P.J.** 1998. Senescence-induced RNases in tomato, *Plant Mol. Biol.* 36: 439–449.
- Lers, A., Sonogo, L., Green, P.J., Burd, S.** 2006. Suppression of LX ribonuclease in tomato results in a delay of leaf senescence and abscission, *Plant Physiol.* 142: 710–721.
- Leslie, M.E., Lewis, M.W., Liljegren, S.J.** 2007. Organ abscission, in: J.A. Roberts, Z. Gonzalez-Carranza (Eds.), *Plant Cell Separation and Adhesion*, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 106–136.
- Leslie, M.E., Lewis, M.W., Youn, J.Y., Daniels, M.J., Liljegren, S.J.,** 2010. The EVERSHED receptor-like kinase modulates floral organ shedding in Arabidopsis, *Development* 137: 467–476.
- Leung, J., Giraudat, J.** 1998. Abscisic acid signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 199–222. doi: 10.1146/annurev.arplant.49.1.199

**Lewis, D.R., Miller, N.D., Splitt, B.I., Wu, G., and Spalding, E.P.** 2007. Separating the roles of acropetal and basipetal auxin transport on gravitropism with mutations in two Arabidopsis multidrug resistance-like ABC transporter genes. *Plant Cell* 19: 1838–1850.

**Lewis, M.W., Leslie, M.E., Fulcher, E.H., Darnielle, L., Healy, P.N., Youn, J.Y., Liljegren, S.J.** 2010. The SERK1 receptor-like kinase regulates organ separation in Arabidopsis flowers. *Plant Journal* 62: 817-828.

**Lewis, M.W., Leslie, M.E., Liljegren, S.J.** 2006. Plant separation: 50 ways to leave your mother, *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 59–65.

**Leyman, B., Geelen, D., Blatt, M.R.** 2000- Localization and control of expression of Nt-Syr1, a tobacco SNARE protein. *Plant Journal* 24: 369-381.

**Li, C., Zhou, A., Sang, T.** 2006. Rice domestication by reducing shattering, *Science* 311: 1936–1939.

**Li, J., Yuan, R.** 2008. NAA and Ethylene Regulate Expression of Genes Related to Ethylene Biosynthesis, Perception, and Cell Wall Degradation During Fruit Abscission and Ripening in ‘Delicious’ Apples. *Journal of Plant Growth Regulation* 27: 283-295.

**Li, J.G., Zhu, G., Yuan, R.G.** 2010. Profiling the expression of genes related to ethylene biosynthesis, ethylene perception, and cell wall degradation during fruit abscission and fruit ripening in apple. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 135: 391-401.

**Li, L., Ye, H., Guo, H., Yin, Y.** 2010. Arabidopsis IWS1 interacts with transcription factor BES1 and is involved in plant steroid hormone brassinosteroid regulated gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 3918-3923.

**Li, L., Yu, X., Thompson, A., Guo, M., Yoshida, S., Asami, T., Chory, J., Yin, Y.** 2009. Arabidopsis MYB30 is a direct target of BES1 and cooperates with BES1 to regulate brassinosteroid-induced gene expression. *Plant J.* 58: 275-286.

**Li, P., Lee, S.H., Hsu, H.Y.** 2011. Review on fruit harvesting method for potential use of automatic fruit harvesting systems, *Procedia Eng.* 23: 351–366.

**Li, P., Pei, Y., Sang, X., Ling, Y., Yang, Z., He, G.** 2009. Transgenic indica rice expressing a bitter melon (*Momordica charantia*) class I chitinase gene (McCHIT1) confers enhanced resistance to *Magnaporthe grisea* and *Rhizoctonia solani*. *Eur J Plant Pathol* 125:533-543.

**Li, Y., Pi, L., Huang, H., Xu, L.** 2012. ATH1 and KNAT2 proteins act together in regulation of plant inflorescence architecture, *J. Exp. Bot.* 63: 1423–1433

**Li, C., Wang, Y., Huang, X., Li, J., Wang, H., & Li, J.** 2015. An improved fruit transcriptome and the identification of the candidate genes involved in fruit abscission induced by carbohydrate stress in litchi. *Frontiers in Plant Science*, 6 : 1–15.

- Liljegren, S. J., Ditta, G. S., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J. L., Yanofsky, M. F.** 2000. SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in Arabidopsis. *Nature* 404: 766–770. doi: 10.1038/35008089
- Liljegren, S.J., Leslie, M.E., Darnielle, L., Lewis, M.W., Taylor, S.M., Luo, R., Geldner, N., Chory, J., Randazzo, P.A., Yanofsky, M.F., Ecker, J.R.** 2009. Regulation of membrane trafficking and organ separation by the NEVERSHED ARF-GAP protein, *Development* 136: 1909–1918.
- Lin, Z., Griffith, M.E., Li, X., Zhu, Z., Tan, L., Fu, Y., Zhang, W., Wang, X., Xie, D., Sun, C.** 2007. Origin of seed shattering in rice (*Oryza sativa* L.), *Planta* 226: 11–20.
- Lin, Z., Li, X., Shannon, L.M., Yeh, C.T., Wang, M.L., Bai, G., Peng, Z., Li, J., Trick, H.N., Clemente, T.E., Doebley, J., Schnable, P.S., Tuinstra, M.R., Tesso, T.T., White, F., Yu, J.** 2012. Parallel domestication of the Shattering1 genes in cereals, *Nat. Genet.*
- Lincoln, J.E., Cordes, S., Read, E., Fischer, R.L.** 1987. Regulation of gene expression by ethylene during *Lycopersicon esculentum* (tomato) fruit development, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 2793–2797
- Liu B, Butenko MA, Shi CL, Bolivar JL, Winge P, Stenvik GE, Vie AK, Leslie ME, Brembu T, Kristiansen W,** 2013. NEVERSHED and INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION are differentially required for cell expansion and cell separation during floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*; 64:5345-57; PMID:23963677; <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ert232>
- Liu, K., Kang, B. C., Jiang, H., Moore, S. L., Li, H., Watkins, C. B., et al.** 2005. A GH3-like gene, CcGH3, isolated from *Capsicum chinense* L. fruit is regulated by auxin and ethylene. *Plant Mol. Biol.* 58: 447–464. doi: 10.1007/s11103-005-6505-4
- Liu, L., Kakihara, F., Kato, M.** 2004. Characterization of six varieties of *Cucumis melo* L. based on morphological and physiological characters, including shelf-life of fruit. *Euphytica* 135: 305-313.
- Liu D, Wang D, Qin Z, Zhang D, Yin L, Wu L, Colasanti J, Li A, Mao L.** 2014 The SEPALLATA MADS-box protein SLMBP21 forms protein complexes with KD1 JOINTLESS and MACROCALYX as a transcription activator for development of the tomato flower abscission zone. *Plant J* 77: 284–296
- Liu, Y., Roof, S., Ye, Z., Barry, C., van Tuinen, A., Vrebalov, J., et al.** 2004. Manipulation of light signal transduction as a means of modifying fruit nutritional quality in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 9897– 9902. doi: 10.1073/pnas.0400935101
- Liu, Y., Dai, S., Beachy, R.N.** 2007. Role of the C-terminal domains of rice (*Oryza sativa* L.) bZIP proteins RF2a and RF2b in regulating transcription. *Biochem J* 405: 243-249.
- Llácer, G., Díez, M.J., Carrillo, J.M., Badenes, M.L.** 2006. *Mejora Genética de la Calidad en Plantas*. Editorial de la UPV, Valencia, 395-413.

- Llop-Tous, I., Barry, C.S., Grierson, D.** 2000. Regulation of ethylene biosynthesis in response to pollination in tomato flowers, *Plant Physiol.* 123: 971–978.
- Lombardo, V. A., Osorio, S., Borsani, J., Lauxmann, M. A., Bustamante, C. A., Budde, C. O., et al.** 2011. Metabolic profiling during peach fruit development and ripening reveals the metabolic networks that underpin each developmental stage. *Plant Physiol.* 157: 1696–1710. doi: 10.1104/pp.111.186064
- Lu Y-P., Li, Z-S., Drozdowicz, Y-M., Hörtensteiner, S., Martinoia, E., Rea, P.A.** 1998. AtMRP2, an Arabidopsis ATP binding cassette transporter able to transport glutathione S-conjugates and chlorophyll catabolites: functional comparisons with AtMRP1. *Plant Cell* 10: 267–282
- Lu, Y.-P., Li, Z.-S., Rea, P.A.** 1997. *AtMRP1* of *Arabidopsis thaliana* encodes a glutathione S-conjugate pump: Isolation and functional definition of a plant ATP-binding cassette transporter gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 8243–8348.
- Luo, B., Xue, X.Y., Hu, W.L., Wang, L.J., and Chen, X.Y.** 2007. An ABC transporter gene of *Arabidopsis thaliana*, AtWBC11, is involved in cuticle development and prevention of organ fusion. *Plant Cell Physiol.* 48: 1790-1802.
- Lycett, G.** 2008 The role of Rab GTPases in cell wall metabolism. *J Exp Bot* 59: 4061-4074.
- Mahouachi, J., Gómez-Cadenas, A., Primo-Millo, E., Talon, M.** 2005. Abscisic acid and gibberellins in citrus fruits subjected to a series of different water conditions. *J. Plant Growth Regul.* 24: 179-187.
- Mahouachi, J., Iglesias, D.J., Agustí, M., Talon, M.** 2009. Delay of early fruit let abscission by branchgirdling in citrus coincides with previous increases in carbohydrate and gibberellin concentrations. *Plant. Growth. Regul.* 58: 15-23.
- Manning, K., Tor, M., Poole, M., Hong, Y., Thompson, A.J., King, G.J., Giovannoni, J.J., Seymour, G.B.** 2006. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nat. Genet.* 38: 948–952. doi: 10.1038/ng1841
- Manríquez, D., El-Sharkawy, I., Flores, F.B., Regad, F., Bouzayen, M., Latché, A., Pech, J.C.** 2006. Fruit-specific gene expression and biochemical characteristics of two highly divergent alcohol dehydrogenases of melon, *Plant Mol. Biol.* 61: 675–685.
- Mao, L., Begum, D., Chuang, H.W., Budiman, M.A., Szymkowiak, E.J., Irish, E.E., Wing, R.A.** 2000. *JOINTLESS* is a MADS-box gene controlling tomato flower AZ development. *Nature* 406: 910-913.
- Martel, C., Vrebalov, J., Tafelmeyer, P., Giovannoni, J. J.** 2011. The tomato MADS-box transcription factor RIPENING INHIBITOR interacts with promoters involved in numerous ripening processes in a COLORLESS NONRIPENING-dependent manner. *Plant Physiol.* 157: 1568–1579. doi: 10.1104/pp.111.181107

- Martinez, G. A., Chaves, A. R., Anon, M. C.** 1996. Effect of exogenous application of gibberellic acid on color change and phenylalanine ammonia-lyase, chlorophyllase, and peroxidase activities during ripening of strawberry fruit (*Fragaria × ananassa* Duch). *J. Plant Growth Regul.* 15: 139–146. doi: 10.1007/BF00198929
- Martinoia E, Grill E, Tommasini R, Kreuz K, Amrhein N** 1993 ATPdependent glutathione S-conjugate export pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature* 364: 247–249
- Martinoia, E., Klein, M., Bovet, L., Forestier, C., Kolukisaoglu, Ü., Müller-Rover, B., and Schulz, B.** 2002 Multifunctionality of plant ABC transporters—more than just detoxifiers. *Planta* 214: 345–355.
- Mascarell-Creus, A., Cañizares, J., Vilarrasa-Blasi, J., Mora-García, S., Blanca, J., Gonzalez-Ibeas, D., Saladié, M., Roig, C., Deleu, W., Picó-Silvent, B., López-Bigas, N., Aranda, M.A., Garcia-Mas, J., Nuez, F., Puigdomènech, P., Caño-Delgado, A.I.** 2009. An oligo-based microarray offers novel transcriptomic approaches for the analysis of pathogen resistance and fruit quality traits in melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Genomics* 10: 467.
- Mason, D.L., and Michaelis, S.** 2002 Requirement of the N-terminal extension for vacuolar trafficking and transport activity of yeast Ycf1p, an ATP-binding cassette transporter. *Mol. Biol. Cell* 13: 4443–4455
- Matas, A. J., Yeats, T. H., Buda, G. J., Zheng, Y., Chatterjee, S., Tohge, T., et al.** 2011. Tissue and cell type specific transcriptome profiling of expanding tomato fruit provides insights into metabolic and regulatory specialization and cuticle formation. *Plant Cell* 23: 3893–3910. doi: 10.1105/tpc.111.091173
- McCourt, P., Creelman, R.** 2008. The ABA receptors, wereportyou decide. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11: 474–478.
- Mcfarlane, H.E., Shin, J.J., Bird, D.A., and Samuels, A.L.** 2010. Arabidopsis ABCG transporters, which are required for export of diverse cuticular lipids, dimerize in different combinations. *Plant Cell* 22: 3066–3075.
- McKim, S.M., Stenvik, G.E., Butenko, M.A., Kistiansen, W., Cho, S.K., Hepworth, S.R., Aalen, R.B., Haughn, G.W.** 2008. The BLADE-ON-PETIOLE genes are essential for abscission zone formation in Arabidopsis, *Development* 135: 1537–1546.
- Meir, S., Philosoph-Hadas, S., Sundaresa, S., Selvaraj, K.S., Burd, S., Ophir, R., Kochanek, B., Reid, M.S., Jiang, C.Z., Lers, A.** 2010. Microarray analysis of the abscission-related transcriptome in the tomato flower abscission zone in response to auxin depletion, *Plant Physiol.* 154: 1929–1956.
- Meir, S., Philosoph-Hadas, S., Sundaresan, S., Selvaraj, K.S., Burd, S., Ophir, R., Kochanek, K.S., Reid, M.S., Jiang, C.Z., Lers, A.** 2011. Identification of defense-related genes newly-associated with tomato flower abscission, *Plant Signal Behav.* 6: 590–593.

- Mentewab, A., and Stewart, C.N.** 2005. Overexpression of an Arabidopsis thaliana ABC transporter confers kanamycin resistance to transgenic plants. *Nat. Biotechnol.* 23: 1177-1180.
- Merelo Cremades, P.** 2011. Aproximación genómica al estudio de la abscisión de frutos cítricos: análisis transcriptómico de la zona de abscisión, in: Departament de Biotecnologia, Universitat Politècnica de València, València.
- Merkouropoulos, G., Shirsat, A.H.** 2003. The unusual Arabidopsis extensin gene Atext1 is expressed throughout plant development and is induced by a variety of biotic and abiotic stresses. *Planta* 217: 356-366.
- Messeguer, R., Ganal, M. W., Steffens, J. C., Tanksley, S. D.** 1991. Characterization of the level, target sites and inheritance of cytosine methylation in tomato nuclear DNA. *Plant Mol. Biol.* 16: 753-770. doi: 10.1007/BF00015069
- Meyer, E., Aglyamova, G., Wang, S., Buchanan-Carter, J., Abrego, D., Colbourne, J., Willis, B., Matz, M.** 2009. Sequencing and de novo analysis of a coral larval transcriptome using 454 GsFLX. *BMC Genomics* 10: 219.
- Mishra, A., Khare, S., Trivedi, P.K., Nath, P.** 2008. Ethylene induced cotton leaf abscission is associated with higher expression of cellulase (GhCel1) and increased activities of ethylene biosynthesis enzymes in abscission zone, *Plant Physiol. Biochem.* 46: 54-63
- Miyamoto, K., Oka, M., Ueda, J.** 1997. Update on the possible mode of action of the jasmonates: focus on the metabolism of cell wall polysaccharides in relation to growth and development, *Physiol. Plant* 100: 631-638.
- 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.
- Mortazavi, A., Williams, B.A., McCue, K., Schaeffer, L., Wold, B.** 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* 5(7): 621- 628.
- Muehlbauer, G.J., Fowler, J.E., Girard, L., Tyers, R., Harper, L., Freeling, M.** 1999. Ectopic expression of the maize homeobox gene *liguleless3* alters cell fates in the leaf, *Plant Physiol.* 119: 651-662.
- Murray, A.J., Hobson, G.E., Schuch, W., Bird, C.R.** 1993. Reduced ethylene synthesis in EFE antisense tomatoes has differential effects on fruit ripening processes, *Postharvest Biol. Technol.* 2: 301-313.
- Mustilli, A. C., Fenzi, F., Ciliento, R., Alfano, F., Bowler, C.** 1999. Phenotype of the tomato high pigment-2 mutant is caused by a mutation in the tomato homolog of DEETIOLATED1. *Plant Cell* 11: 145-157. doi: 10.1105/tpc.11.2.145
- Nagy, R., Grob, H., Weder, B., Green, P., Klein, M., Frelet, A., Sch-Joerring, J.K., Brearley, C.A., Martinoia, E.** 2009. The Arabidopsis ATP-binding cassette protein



ATMRP5/ATABCC5 is a high-affinity ino- sitol hexakisphosphate transporter involved in guard cell signaling and phytate storage. *J. Biol. Chem.* 284: 33614-33622

**Nairn, C.J., Lewandowski, D.J., Burns, J.K.** 1998. Genetics and expression of two pectinesterase genes in Valencia orange, *Physiol. Plant* 102: 226–235.

**Nakano, T., Fujisawa, M., Shima, Y., & Ito, Y.** 2013. Expression profiling of tomato pre-abscission pedicels provides insights into abscission zone properties including competence to respond to abscission signals. *BMC Plant Biology*, 13(1), 40. doi:10.1186/1471-2229-13-40

**Nakano, R., Ogura, E., Kubo, Y., Inaba, A.** 2003. Ethylene biosynthesis in detached young persimmon fruit is initiated in calyx and modulated by water loss from the fruit. *Plant Physiology* 131: 276-286.

**Nakano, T., Kimbara, J., Fujisawa, M., Kitagawa, M., Isashi, N., Maeda, H., Kasumi, T., Ito, Y.** 2012. MACROCALYX and JOINTLESS interact in the transcriptional regulation of tomato fruit abscission zone development, *Plant Physiol.* 158: 439–450.

**Nguyen, V. N. T., Moon, S., & Jung, K.-H.** 2014. Genome-wide expression analysis of rice ABC transporter family across spatio-temporal samples and in response to abiotic stresses. *Journal of Plant Physiology*, 171:1276–88.

**Niederhuth, C. E., Cho, S. K., Seitz, K., & Walker, J. C.** 2013. Letting go is never easy: abscission and receptor-like protein kinases. *Journal of Integrative Plant Biology*, 55: 1251–63.

**Nieto, C., Piron, F., Dalmais, M., Marco, C.F., Moriones, E., Gómez-Guillamón, M.L., Truniger, V., Gómez, P., Garcia-Mas, J., Aranda, M.A., Bendahmane, A.** 2007. EcoTILLING for the identification of allelic variants of melon eIF4E, a factor that controls virus susceptibility. *BMC Plant Biol* 7: 34.

**Nishiyama, K., Guis, M., Rose, J.K.C., Kubo, Y., Bennett, K.A., Wangjin, L., Kato, K., Ushijima, K., Nakano, R., Inaba, A., Bouzayen, M., Latché, A., Pech, J.C., Bennett, A.** 2007. Ethylene regulation of fruits softening and cell wall disassembly in Charentais melon, *J. Exp. Bot.* 58: 1281–1290.

**Norberg, M., Holmlund, M., Nilsson, O.** 2005. The BLADE ON PETIOLE genes act redundantly to control the growth and development of lateral organs, *Development* 132: 2203–2213.

**Nunez-Paleniuss, H.G., Huber, D.J., Klee, H.J., Cantliffe, D.J.** 2007. Fruit ripening characteristics in a transgenic “Galia” male parental muskmelon (*Cucumis melo L., reticulatus Ser.*) line, *Postharvest Biol. Technol.* 44: 95–100.

**Nyathi, Y., De Marcos Lousa, C., Van Roermund, C.W. Wanders, R.J., Johnson, B., Baldwin, S.A., Theoudoulou, F.L., Baker, A.** 2010. The Arabidopsis peroxisomal ABC transporter, comatose, complements the *Saccharomyces cerevisiae pxa1 pxa2Delta* mutant

for metabolism of long-chain fatty acids and exhibits fatty acyl-CoA-stimulated ATPase activity. *Journal of Biological Chemistry* 285: 29892–29902

**Obando, J., Miranda, C., Jowkar, M.M., Moreno, E., Sour, M.K., Martinez, J.A., Arus, P., García-Mas, J., Monforte, A.J., Fernandez-Trujillo, F.J.P.** 2007. Creating climacteric melon fruit from non-climacteric parentals: postharvest implications, in: A. Ramina, C. Chang, J. Giovannoni, H.Klee, E. Perata, Woltering (Eds.), *Advances in Plant Ethylene Research*, Springer, pp. 197–205.

**Oeller, P. W., Wong, L. M., Taylor, L. P., Pike, D. A., Theologis, A.** 1991. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science* 254: 437–439. doi: 10.1126/science.1925603

**Ogawa, M., Kay, P., Wilson, S., Swain, S.M.** 2009. Arabidopsis dehiscence Zone polygalacturonase1 (adpg1), adpg2, and quartet2 are Polygalacturonases required for cell separation during reproductive development in Arabidopsis. *Plant Cell* 21: 216–233.

**Okabe, M.B., Asamizu, E., Saito, T., Matsukura, C., Ariizumi, T., Bres, C., Rothan, C., Mizoguchi, T., Ezura, H.** 2011. Tomato TILLING technology: development of a reverse genetics tool for the efficient isolation of mutants from Micro-Tom mutant libraries, *Plant Cell Physiol.* 52: 1994–2005.

**Okushima, Y., Mitina, I., Quach, H.L., Theologis, A.** 2005. AUXIN RESPONSE FACTOR 2 (ARF2): a pleiotropic developmental regulator, *Plant J.* 43: 29–46.

**Onishi, K., Takagi, K., Kontani, M., Tanaka, T., Sano, Y.** 2007. Different patterns of genealogical relationships found in the two major QTLs causing reduction of seed shattering during rice domestication, *Genome* 50: 757–766.

**Ooms, J.J.J., Kloosterziel, K.M.L., Bartels, D., Koornneef, M., Kassen, C.M.** 1993. Acquisition of desiccation tolerance and longevity in seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 102: 1185–1191.

**Ophir, R., Eshed, R., Harel-Beja, R., Tzuri, G., Portnoy, V., Burger, Y., Uliel, S., Katzir, N., Sherman, A.** 2010. High-throughput marker discovery in melon using a self-designed oligo microarray. *BMC Genomics* 11: 269.

**Osborne, D.J., Morgan, P.W.** 1989. Abscission, *Crit. Rev. Plant Sci.* 8: 103–129.

**Osborne, D.J., Sargent, J.A.** 1976. The positional differentiation of ethylene-responsive cells in rachis abscission zones in leaves of *Sambucus nigra* and their growth and ultrastructural changes at senescence and separation, *Planta* 130: 203–210.

**Osorio, S., Alba, R., Damasceno, C. M. B., Lopez-Casado, G., Lohse, M., Zanor, M. I., et al.** 2011. Systems biology of tomato fruit development: combined transcript, protein and metabolite analysis of tomato transcription factor (nor, rin) and ethylene receptor (Nr) mutants reveals novel regulatory interactions. *Plant Physiol.* 157: 405–425. doi: 10.1104/pp.111.175463

- Osorio, S., Alba, R., Nikoloski, Z., Kochevenko, A., Fernie, A. R., Giovannoni, J. J.** 2012. Integrative comparative analyses of transcript and metabolite profiles from pepper and tomato ripening and development stages uncovers species-specific patterns of network regulatory behavior. *Plant Physiol.* 159: 1713–1729. doi: 10.1104/pp.112.199711
- Osorio, S., Scossa, F., & Fernie, A. R.** 2013. Molecular regulation of fruit ripening. *Frontiers in Plant Science*, 4 (June), 198. <http://doi.org/10.3389/fpls.2013.00198>
- Osterlund, M.T., Wei, N., Deng, X.W.** 2000. The roles of photoreceptor systems and the COP1-targeted destabilization of HY5 in light control of Arabidopsis seedling development. *Plant Physiol* **124**: 1520-1524.
- Pan, Q. H., Li, M. J., Peng, C. C., Zhang, N., Zou, X., Zou, K. Q., et al.** 2005. Abscisic acid activates acid invertases in developing grape berry. *Physiol. Plant.* 125: 157–170. doi: 10.1111/j.1399-3054.2005.00552.x
- Pan, Y., Bradley, G., Pyke, K., Ball, G., Lu, C., Fray, R., et al.** 2013. Network inference analysis identifies an APRR2-like gene linked to pigment accumulation in tomato and pepper fruits. *Plant Physiol.* 161: 1476–1485. doi: 10.1104/pp.112.212654
- Pang, K., Li, Y., Liu, M., Meng, Z., & Yu, Y.** 2013. Inventory and general analysis of the ATP-binding cassette (ABC) gene superfamily in maize (*Zea mays* L.). *Gene*, 526(2): 411–28. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2013.05.051>
- Panikashvili, D., Savaldi-Goldstein, S., Mandel, T., Yifhar, T., Franke, R.B., Hofer, R., Schreiber, L., Chory, J., and Aharoni, A.** 2007. The Arabidopsis DESPERADO/AtWBC11 transporter is required for cutin and wax secretion. *Plant Physiol.* 145: 1345-1360
- Parra-Lobato, M.C., Gomez-Jimenez, M.C.** 2011. Polyamine-induced modulation of genes involved in ethylene biosynthesis and signalling pathways and nitric oxide production during olive mature fruit abscission. *Journal of Experimental Botany* **62**: 4447-4465.
- Patterson, G. I., Thorpe, C. J., Chandler, V. L.** 1993. Paramutation, an allelic interaction, is associated with a stable and heritable reduction of transcription of the maize b regulatory gene. *Genetics* 135: 881–894.
- Patterson, S.E.** 2001. Cutting loose. Abscission and dehiscence in Arabidopsis, *Plant Physiol.* 126: 494–500.
- Patterson, S.E., Bleecker, A.B.** 2004. Ethylene-dependent and -independent processes associated with floral organ abscission in Arabidopsis, *Plant Physiol.* 134: 194–203.
- Pattison, R., Catalá, C.** 2012. Evaluating auxin distribution in tomato (*Solanum lycopersicum*) through an analysis of the *PIN* and *AUX/LAX* gene families. *Plant Journal* **70**: 585-598.
- Pech, J. C., Bernadac, a, Bouzayen, M., Latche, a, Dogimont, C., Pitrat, M.** 2007. Melon. *Transgenic Crops V*, 60.

- Pech, J.C., Bouzayen, M., Latché, A.** 2008. Climacteric fruit ripening: ethylene-dependent and independent regulation of ripening pathways in melon fruit. *Plant Science* **175**: 114-120.
- Pech, J.C., Purgatto, E., Bouzayen, M., Latché, A.** 2012. Ethylene and fruit ripening, en *Annual Plant Reviews* **44**: 275-304
- Peleg, Z., Blumwald, E.** 2011. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**: 290-295.
- Perin, C., Gomez-Jimenez, M.C., Hagen, L., Dogimont, C., Pech, J.C., Latche, A., Pitrat, M., Lelievre, J.M.** 2002. Molecular and genetic characterization of a non-climacteric phenotype in melon reveals two loci conferring altered ethylene response in fruit. *Plant Physiology* **129**: 300-309.
- Perkins-Veazie, P. M.** 1995. Growth and ripening of strawberry fruit. *Hortic. Rev.* **17**: 267–297. doi: 10.1002/9780470650585.ch8
- Perkins-Veazie, P. M., Huber, D. J., Brecht, J. K.** 1996. In vitro growth and ripening of strawberry fruit in presence of ACC, STS or propylene. *Ann. Appl. Biol.* **128**: 105–116. doi: 10.1111/j.1744-7348.1996.tb07094.x
- Pesis, E., Ackerman, M., Ben-Arie, R., Feygenberg, O., Feng, X., Apelbaum, A., Goren, R., Prusky, D.** 2002 Ethyleneinvolvement in chillinginjurysymptoms of avocado duringcoldstorage, *Postharvest Biol. Technol.* **24**: 171–178.
- Pickersgill, B.** 2007 Domestication of Plants in the Americas: insights from Mendelian and Molecular Genetics, *Ann. Bot.* **100**: 925–940.
- Pierik, R.L.M.** 1980. Hormonal regulation of secondary abscission in pear pedicels *in vitro*. *Plant Physiol.* **48**: 5-8.
- Pierik, R.L.M., Abbadi, S.A.B.** 1972. The effect of cytokinins on auxin-induced secondary abscission in isolated apple pedicels, *Z. Pflanzenphysiol.* **68**: 281–282.
- Pieterse, C.M.J., van Loon, L.C.V.** 2004. NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology***7**: 456-464.
- Pighin, J.A., Zheng, H., Balakshin, L.J., Goodman, L.P., Western, T.L., Jetter, R., Kunst, L., and Samuels, A.L.** 2004. Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter. *Science* **306**: 702-704
- Pinfield-Wells, H., Rylott, E.L., Gilday, A.D., Graham, S., Job, K., Larson, T.R., and Graham, I.A.** 2005. Sucrose rescues seedling establishment but not germination of Arabidopsis mutants disrupted in peroxisomal fatty acid catabolism. *Plant J.* **43**: 861–872.
- Pinyopich, A., Ditta, G.S., Savidge, B., Liljegren, S.J., Baumann, E., Wisman, E., Yanofsky, M.F.** 2003. Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development, *Nature* **424**: 85–88.

- Pisarev, A.V., Skabkin, M.A., Pisareva, V.P., Skabkina, O.V., Rako- tondrafara, A.M., Hentze, M.W., Hellen, C.U.T., and Pestova, T.V.** 2010. The Role of ABCE1 in Eukaryotic Posttermination Ribosomal Recycling. *Molecular Cell* 37: 196-210.
- Pitrat, M., Hanelt, P., Hammer, K.** 2000. Some comments on intraespecific classification of cultivars of melon. *Acta Horticulturae* 510: 29-36
- Pnueli, L., Hareven, D., Rounsley, S., D., Yanofsky, M., F., Lifschitz, E.** 1994. Isolation of the tomato AGAMOUS gene TAG1 and analysis of its homeotic role in transgenic plants. *Plant Cell* 6: 163-173. doi: 10.1105/tpc.6.2.163
- Porat, R., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., Goren, R., Droby, S.** 1999. Effects of ethylene and 1-methyl-cyclopropene on the postharvest qualities of "Shamouti" oranges, *Postharvest Biol. Technol.* 15: 155-163.
- Portela, S. I., y Cantwell, M. I.** 1998. Quality changes in minimally processed honeydew melons stored in air or controlled atmosphere. *Postharvest Biology and Technology*, 14: 351-357.
- Portnoy, V., Diber, A., Pollock, S., Karchi, H., Lev, S., Tzuri, G., Harel-Beja, R., Forer, R., Portnoy, V.H., Lewinsohn, E., et al.** 2011. Use of non-normalized, non-amplified cDNA for 454-based RNA sequencing of fleshy melon fruit. *Plant Gen* 4: 36-46.
- Pozo, L., Yuan, R., Kostenyyuk, I., Alferez, F., Zhong, G.Y., Burns, J.K.** 2004. Differential effects of 1-methylcyclopropene on citrus leaf and mature fruit abscission. *J. amer. Soc. hort.Sci.* 129: 473-478.
- Qi, M. F., Xu, T., Chen, W. Z., & Li, T. L.** 2014. Ultrastructural localization of polygalacturonase in ethylene-stimulated abscission of tomato pedicel explants. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Racskó, J., Soltész, M., Szabó, Z., Nyéju, J.** 2006. Fruitdrop: II. Biological background of flower and fruitdrop. *Int. J.hort. Sci.* 12: 103-108.
- Ragni, L., Belles-Boix, E., Gunl, M., Pautot, V.** 2008. Interaction of KNAT6 and KNAT2 with BREVIPEDICELLUS and PENNYWISE in Arabidopsis inflorescences, *Plant Cell* 20: 888-900.
- Rascio, N., Casadoro, G., Ramina, A., Masia, A.** 1985. Structural and biochemical aspects of peach fruit abscission (*Prunus persica* L. Batsch), *Planta* 164: 1-11.
- Rasori, A., Ruperti, B., Bonghi, C., Tonutti, P., Ramina, A.** 2002. Characterization of two putative ethylene receptor genes expressed during peach fruit development and abscission. *Journal of Experimental Botany* 53: 2333-2339.
- Ratner, A., Goren, R., Monselise, S.P.** 1969. Activity of pectin esterase and cellulase in the abscission zone of citrus leaf explants, *Plant Physiol.* 44: 1717-1723.

- Rea P.A.** 2007. Plant ATP-binding cassette transporters. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58:347–375.
- Richings, E. W., Cripps, R. F., Cowan, A. K.** 2000. Factors affecting ‘Hass’ avocado fruit size: carbohydrate, abscisic acid and isoprenoid metabolism in normal and phenotypically small fruit. *Physiol. Plant.* 109: 81–89. doi: 10.1034/j.1399-3054.2000.100112.x
- Riechmann, J.L., Meyerowitz, E.M.** 1998. The AP2/EREBP family of plant transcription factors, *Biol. Chem.* 379: 633–646.
- Riov, J.** 1974. A polygalacturonase from citrus leaf explants: role in abscission, *Plant Physiol.* 53: 312–316.
- Roberts, J., Schindler, C.B., Tucker, G.** 1984. Ethylene-promoted tomato flower abscission and the possible involvement of an inhibitor, *Planta* 160: 159–163.
- Roberts, J.A., Elliott, K.A., Gonzalez-Carranza, Z.H.** 2002. Abscission, dehiscence, and other cell separation processes, *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 131–158.
- Roberts, J.A., Gonzalez-Carranza, Z.** 2007. Cell separation and adhesion processes in plants, in: J.A. Roberts, Z. Gonzalez-Carranza (Eds.), *Plant Cell Separation and Adhesion*, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 1–7.
- Roberts, J.A., Whitelaw, C.A., Gonzalez-Carranza, Z.H., McManus, M.T.** 2000. Cell separation processes in plants – models, mechanisms and manipulation, *Ann. Bot.* 86: 223–235.
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J., Smyth, G.K.** 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 26(1): 139–40.
- Rodrigo, M. J., Marcos, J. F., Alferez, F., Mallent, M. D., Zacarias, L.** 2003. Characterization of Pinalate, a novel *Citrus sinensis* mutant with a fruit-specific alteration that results in yellow pigmentation and decreased ABA content. *J.Exp.Bot.* 54: 727–738. doi: 10.1093/jxb/erg083
- Rohrmann, J., Tohge, T., Alba, R., Osorio, S., Caldana, C., McQuinn, R., et al.** 2011. Combined transcription factor profiling, microarray analysis and metabolite profiling reveals the transcriptional control of metabolic shifts occurring during tomato fruit development. *Plant J.* 68: 999–1013. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04750.x
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., Sheen, J.** 2006. Sugarsensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 675–709.
- Rose, J. K. C., Bashir, S., Giovannoni, J. J., Jahn, M. M., and Saravanan, R. S.** 2004. Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. *Plant J.* 39: 715–733. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02182.x
- Rose, J.K., Hadfield, K.A., Labavitch, J.M., Bennett, A.B.** 1998. Temporal Sequence of Cell Wall Disassembly in Rapidly Ripening Melon Fruit. *Plant Physiol* 117: 345–361.

- Rottmann, W. H., Peter, G. F., Oeller, P. W., Keller, J. A., Shen, N.F., Nagy, B. P., et al.** 1991. 1- Aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato is encoded by a multigene family whose transcription is induced during fruit and floral senescence. *J. Mol. Biol.* 222: 937– 961. doi: 10.1016/0022-2836(91) 90587-V
- Ruiz, R., García-Luis, A., Monerri, C., Guardiola, J.L.** 2001. Carbohydrate availability in relation to fruitlet abscission in citrus. - *Ann. Bot.* 87: 805-812.
- Ruperti, B., Cattivelli, L., Pagni, S., Ramina, A.** 2002. Ethylene responsive genes are differentially regulated during abscission, organ senescence and wounding in peach (*Prunus persica*). *Journal of Experimental Botany* 53: 429-437.
- Růžička, K., Strader, L.C., Bailly, A., Yang, H., Blakeslee, J.J., Łangowski, Ł., Nejedlá, E., Fujita, H., Itoh, H., Syōno, K., Hejátko, J., Gray, W.M., Martinoia, E., Geisler, M., Bartel, B., Murphy, A.S., and Friml, J.** 2010. Arabidopsis PIS1 encodes the ABCG37 trans- porter of auxinic compounds including the auxin precursor indole-3-bu- tyric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 10749–10753.
- Sakamoto, M., Munemura, I., Tomita, R., Kobayashi, K.** 2008. Involvement of hydrogen peroxide in leaf abscission signaling, revealed by analysis with an in vitro abscission system in Capsicum plants, *Plant J.* 56: 13–27.
- Sakamoto, M., Munemura, I., Tomita, R., Kobayashi, K.** 2008. Reactive oxygen species in leaf abscission signaling, *Plant Signal Behav.* 3: 1014–1015.
- Sanchez-Fernandez, R., Davies, T.G., Coleman, J.O., Rea, P.A.,** 2001. The Arabidopsis thaliana ABC protein superfamily, a complete inventory. *J. Biol. Chem.* 276:30231–30244
- Sane, A.P., Tripathi, S.K., Nath, P.** 2007. Petal abscission in rose (*Rosa bourboniana* var Gruss an Teplitz) is associated with the enhanced expression of an alpha expansin gene. RbEXPA1. *Plant Science* 172: 481-487.
- Santelia, D., Vincenzetti, V., Azzarello, E., Bovet, L., Fukao, Y., Düchtig, P., Mancuso, S., Martinoia, E., and Geisler, M.** 2005. MDR-like ABC transporter AtPGP4 is involved in auxin-mediated lateral root and root hair development. *FEBS Lett.* 579: 5399–5406
- Saravanan, R. S., Rose, J. K. C.** 2004. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics* 4: 2522–2532. doi: 10.1002/pmic. 200300789
- Sarmiento, C. et al.** 2006 AtRLI2 is an endogenous suppressor of RNA silencing. *Plant Mol. Biol.* 61, 153–163
- Sauer M, Delgadillo MO, Zouhar J, Reynolds GD, Pennington JG, Jiang L, Liljgren SJ, Stierhof YD, De Jaeger G, Otegui MS,** 2013. MTV1 and MTV4 encode plant-specific ENTH and ARF GAP pro- teins that mediate clathrin-dependent trafficking of vacuolar cargo from the trans-Golgi network. *Plant Cell*; 25:2217-35; PMID:23771894; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.113.111724>

- Schneeberger, R.G., Becraft, P.W., Hake, S., Freeling, M.** 1995. Ectopic expression of the *knox* homeobox gene *rough sheath1* alters cell fate in the maize leaf, *Genes Dev.* 9: 2292–2304.
- Schumacher, K., Schmitt, T., Rossberg, M., Schmitz, G., Theres, K.** 1999. The Lateral suppressor (*Ls*) gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 290–295.
- Selvarajah, S., Bauchot, A.D., John, P.J.** 2001. Internal browning in cold-stored pineapples is suppressed by a post-harvest application of 1-methylcyclopropene, *Postharvest Biol. Technol.* 23: 167–170.
- Sexton, R.** 2001. Abscission, in: M. Pessaraki (Ed.), *Handbook of Plant and Crop Physiology*, Dekker, New York, pp. 497–525.
- Sexton, R., Roberts, J.A.** 1982. Cell biology of abscission, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33: 133–162.
- Seymour, G. B., Ostergaard, L., Chapman, N. H., Knapp, S., Martin, C.** 2013. Fruit development and ripening. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64: 219–241. doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120057
- Seymour, G. B., Ryder, C. D., Cevik, V., Hammond, J. P., Popovich, A., King, G. J., et al.** 2011. A *SEPALLATA* gene is involved in the development and ripening of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) fruit, a non-climacteric tissue. *J. Exp. Bot.* 62: 1179–1188. doi: 10.1093/jxb/erq360
- Seymour, G., Poole, M., Manning, K., King, G. J.** 2008. Genetics and epigenetics of fruit development and ripening. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11: 58–63. doi: 10.1016/j.pbi.2007.09.003
- Shi, C.L., Stenvik, G.E., Vie, A.K., Bones, A.M., Pautot, V., Proveniers, M., Aalen, R.B., Butenko, M.A.** 2011. Arabidopsis class I KNOTTED-like homeobox proteins act downstream in the IDA-HAE/HSL2 floral abscission signaling pathway, *Plant Cell* 23: 2553–2567.
- Shi, J., Wang, H., Schellin, K., Li, B., Faller, M., Stoop, J.M., Meeley, R.B., Ertl, D.S., Ranch, J.P., Glassman, K.** 2007. Embryo-specific silencing of a transporter reduces phytic acid content of maize and soybean seeds. *Nat. Biotechnol.* 25: 930–937
- Shimoni-Shor, E., Hassidim, M., Yuval-Naeh, N., Keren, N.** 2010. Disruption of *Nap14*, a plastid-localized non-intrinsic ABC protein in *Arabidopsis thaliana* results in the over-accumulation of transition metals and in aberrant chloroplast structures. *Plant Cell Environ.* 33: 1029–1038
- Shitan N, Bazin I, Dan K, Obata K, Kigawa K, Ueda K, Sato F, Forestier C, Yazaki K** 2003 Involvement of *CjMDR1*, a plant multidrug-resistance-type ATP-binding cassette protein, in alkaloid transport in *Coptis japonica*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 751–756



- Shulaev, V., Sargent, D. J., Crowhurst, R. N., Mockler, T. C., Folkerts, O., Delcher, A. L., et al.** 2011. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nat. Genet.* 43: 109–116. doi: 10.1038/ng.740
- Silva, J.A., Da Costa, T.S., Lucchetta, L., Marini, L.J., Zanuzo, M.R., Nora, L., Nora, A.F.R., Twyman, R.M., Rombaldi, C.V.** 2004. Characterization of ripening behavior in transgenic melon expressing an antisense 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase gene from apple, *Postharvest Biol. Technol.* 32: 263–268.
- Singh, A.P., Tripathi, S.K., Nath, P., Sane, A.P.** 2011. Petal abscission in rose is associated with the differential expression of two ethylene-responsive xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase genes, RbXTH1 and RbXTH2. *J Exp Bot* 62: 5091–5103.
- Singh, D.** 2007. 10. Cucurbits. In *Underutilized and underexploited horticultural crops* (Vol.5).
- Sipes, D., Einset, J.** 1983. Cytokinin stimulation of abscission in lemon pistil explants, *J. Plant Growth Regul.* 2: 73–80.
- Sitrit, Y., Bennett, A.B.** 1998. Regulation of tomato fruit polygalacturonase mRNA accumulation by ethylene: a re-examination, *Plant Physiol.* 116: 1145–1150.
- Skottke, K.R., Yoon, G.M., Kieber, J.J., DeLong, A.** 2011. Protein Phosphatase 2A Controls Ethylene Biosynthesis by Differentially Regulating the Turnover of ACC Synthase Isoforms. *PLoS Genetics* 7: e1001370.
- Slocumbe S.P., Cornah J., PinfieldWells H., Soady K., Zhang Q., Gilday A., Dyer J.M., Graham I.A.** 2009 Oil accumulation in leaves directed by modification of fatty acid breakdown and lipid synthesis pathways. *Plant Biotechnol. J.* 7:694–703
- Smaczniak, C., Immink, R. G., Angenent, G. C., Kaufmann, K.** 2012. Developmental and evolutionary diversity of plant MADS-domain factors: insights from recent studies. *Development* 139: 3081– 3098. doi: 10.1242/dev.074674
- Smith, E., Whiting, M.** 2010. Effect of ethephon on sweet cherry pedicel-fruit retention force and quality is cultivar dependent. *Plant Growth Regul.* 60: 213–223.
- Smith, L.G., Greene, B., Veit, B., Hake, S.** 1992. A dominant mutation in the maize homeobox gene, Knotted-1, causes its ectopic expression in leaf cells with altered fates, *Development* 116: 21–30.
- Staswick, P.** 1995. Jasmonates, salicylic acid and brassinolides, in: P.J. Davies (Ed.), *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 179–187.
- Stein, M., Dittgen, J., Sánchez-Rodríguez, C., Hou, B.H., Molina, A., Schulze-iefert, P., Lipka, V., and Somerville, S.** 2006. Arabidopsis PEN3/PDR8, an ATP binding cassette transporter, contributes to nonhost resistance to inappropriate pathogens that enter by direct penetration. *Plant Cell* 18: 731–746

- Stenvik, G.E., Butenko, M.A., Aalen, R.B.** 2008. Identification of a putative receptor-ligand pair controlling cell separation in plants, *Plant Signal Behav.* 3: 1109–1110.
- Stenvik, G.E., Butenko, M.A., Urbanowicz, B.R., Rose, J.K., Aalen R.B.** 2006. Overexpression of inflorescence deficient in abscission activates cell separation in vestigial abscission zones in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 18: 1467–1476.
- Stenvik, G.E., Tandstad, N.M., Guo, Y., Shi, C.L., Kristiansen, W., Holmgren, A., Clark, S.E., Aalen, R.B., Butenko, M.A.** 2008. The EPIP peptide of INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION is sufficient to induce abscission in *Arabidopsis* through the receptor-like kinases HAESA and HAESA-LIKE2, *Plant Cell* 20: 1805–1817.
- Stutte, G.W., Gage, J.** 1990. Gibberellin inhibits fruit abscission following seed abortion in peach, *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 115: 107–110.
- Sugiyama, A., Shitan, N., and Yazaki, K.** 2007. Involvement of a soybean ATP-binding cassette-type transporter in the secretion of genistein, a signal flavonoid in legume-Rhizobium symbiosis. *Plant Physiol.* 144: 2000-2008.
- Suh, S.J., Wang, Y.F., Frelet, A., Leonhardt, N., Klein, M., Forestier, C., Mueller-Roeber, B., Cho, M.H., Martinoia, E., and Schroeder, J.I.** 2007. The ATP binding cassette transporter AtMRP5 modulates anion and calcium channel activities in *Arabidopsis* guard cells. *J. Biol. Chem.* 282: 1916-1924.
- Sun, L., Sun, Y., Zhang, M., Wang, L., Ren, J., Cui, M., et al.** 2012. Suppression of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, which encodes a key enzyme in abscisic acid biosynthesis, alters fruit texture in transgenic tomato. *Plant Physiol.* 158: 283, 298. doi: 10.1104/pp.111.186866
- Sun, L., Van Nocker, S.** 2010. Analysis of promoter activity of members of the PECTATE LYASE-LIKE (PLL) gene family in cell separation in *Arabidopsis*, *BMC Plant Biol.* 10: 152.
- Sun, L.X., Bukovac, M.J., Forsline, P.L., Nocker, S.V.** 2009. Natural variation in fruit abscission-related traits in apple (*Malus*). *Euphytica* 165: 55-67.
- Sunako, T., Sakuruba, W., Senda, M., Akada, S., Ishikawa, R., Niizeki, M., Harada, T.** 1999. An allele of the ripening-specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene (ACS1) in apple fruit with a long storage life, *Plant Physiol.* 119: 1297–1304.
- Sweetlove, L. J., Beard, K. F. M., Nunes-Nesi, A., Fernie, A. R., & Ratcliffe, R. G.** 2010. Not just a circle: Flux modes in the plant TCA cycle. *Trends in Plant Science*, 15(8): 462–470. <http://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.05.006>
- Szymkowiak, E.J., Irish, E.E.** 1999. Interactions between jointless and wild-type tomato tissues during development of the pedicel abscission zone and the inflorescence meristem, *Plant Cell* 11: 159–175.
- Tadeo, F.R., Cercós, M., Colmenero-Flores, J.M., Iglesias, D.J., Naranjo, M.A., Ríos, G., Carrera, E., Ruiz-Rivero, O., Lliso, I., Morillon, R., Ollitrault, P., Talon, M.** 2008.

Molecular physiology of development and quality of citrus, in: J. Kader, M. Delseny (Eds.), *Advances in Botanical Research*, Elsevier Ltd., Amsterdam, pp. 147–223.

**Tadmor, Y., Katzir, N., Meir, A., Yaniv-Yaakov, A., Saar, U., Baumkoler, F., Lavee, T., Lewinsohn, E., Schaffer, A., Buerger, J.** 2007. Induced mutagenesis to augment the natural genetic variability of melon (*Cucumis melo* L.). *Israel J Plant Sci* **55**: 159-169.

**Taesakul, P., Pradisthakarn, N., Chantaksinopas, S., Siriphanich, J.** 2012. Long kong fruit abscission and its control. *Postharvest Biol. Technol.* **64**: 91-93.

**Takahashi T, Kakehi J.** 2010. Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. *Ann Bot* **105**:1–6.

**Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S.** 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* **28**:2731–2739

**Tang, W., Yuan, M., Wang, R., Yang, Y., Wang, C., Oses-Prieto, J.A., Kim, T.W., Zhou, H.W., Deng, Z., Gampala, S.S., Gendron, J.M., Jonassen, E.M., Lillo, C., DeLong, A., Burlingame, A.L., Sun, Y., Wang, Z.Y.** 2011. PP2A activates brassinosteroid-responsive gene expression and plant growth by dephosphorylating BZR1. *Nat Cell Biol* **13**: 124-131.

**Taylor, J.E., Whitelaw, C.A.** 2001. Signals in abscission, *New Phytol.* **151**: 323–340.

**Teschner, J., Lachmann, N., Geisler, M., Selbach, K., Balk, J., Mendel, R. R., et al.** 2010. A novel role for mitochondrial ABC transporter ATM3 from *Arabidopsis* in molybdenum cofactor biosynthesis. *Plant Cell* **22** 468–480 10.1105/tpc.109.068478

**Terasaka K., Blakeslee J.J., Titapiwatanakun B.,** 2005 PGP4, an ATP binding cassette P-glycoprotein, catalyses auxin transport in *Arabidopsis thaliana* roots. *The Plant Cell*;17:2922-2939

**Theodoulou, F.L., Holdsworth, M., Baker, A.** 2006. Peroxisomal ABC transporters. *FEBS Letters* **580**: 1139–1155.

**Theodoulou, F.L., Job, K., Slocombe, S.P., Footitt, S., Holdsworth, M., Baker, A., Larson, T.R., and Graham, L.A.** 2005. Jasmonic acid levels are reduced in COMATOSE ATP-binding cassette transporter mutants. Implications for transport of jasmonate precursors into peroxisomes. *Plant Physiol.* **137**: 835-840.

**Thompson, A. J., Tor, M., Barry, C. S., Vrebalov, J., Orfila, C., Jarvis, M. C., et al.** 1999. Molecular and genetic characterization of a novel pleiotropic tomato-ripening mutant. *Plant Physiol.* **120**: 383–390. doi: 10.1104/pp.120.2.383

**Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J.** 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673–4680.

- Tigchelaar, E.C., McGlasson, W.B., Buescher, R.W.** 1978. Genetic regulation of tomato fruit ripening, *HortScience* 13: 508–513.
- Tiwari, S.B., Hagen, G., Guilfoye, T.** 2003. The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription, *Plant Cell* 15: 533–543.
- Tommasini, R., Vogt, E., Fromenteau, M., Hörtensteiner, S., Matile, P., Amrhein, N., Martinoia, E.** 1998. An ABC transporter of *Arabidopsis thaliana* has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. *Plant J* 13: 773–780
- Tomato Genome Consortium.** 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485: 635–641. doi: 10.1038/nature11119
- Trainotti, L., Spinello, R., Piovan, A., Spolaore, S., Casadoro, G.** 2001. beta-Galactosidases with a lectin-like domain are expressed in strawberry. *J. Exp. Bot.* 52: 1635–1645. doi: 10.1093/jexbot/52.361.1635
- Trainotti, L., Spolaore, S., Ferrarese, L., Casadoro, G.** 1997. Characterization of ppEG1, a member of a multigene family which encodes endo-beta-1,4-glucanase in peach, *Plant Mol. Biol.* 34: 791–802.
- Tsuchiya, M., Satoh, S., & Iwai, H.** 2015. Distribution of XTH, expansin, and secondary-wall-related CesA in floral and fruit abscission zones during fruit development in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Frontiers in Plant Science*, 6:1–9. doi:10.3389/fpls.2015.00323
- Tucker, G.A., Schindler, C.B., Roberts, J.A.** 1984. Flower abscission in mutant tomato plants, *Planta* 160: 164–167.
- Tucker, M.L., Baird, S.L., Sexton, R.** 1991. Bean leaf abscission: tissue-specific accumulation of a cellulase mRNA, *Planta* 186: 52–57
- Tucker, M.L., Burke, A., Murphy, C.A., Thai, V.K., Ehrenfried, M.L.** 2007. Gene expression profiles for cell wall-modifying proteins associated with soybean cyst nematode infection, petiole abscission, root tips, flowers, apical buds, and leaves. *J Exp Bot* 58: 3395-3406.
- Tucker, M.L., Sexton, R., Del Campillo, E., Lewis, L.N.** 1988. Bean abscission cellulase: characterization of a cDNA clone and regulation of gene expression by ethylene and auxin, *Plant Physiol.* 88: 1257–1262.
- Tucker ML, Yang R.** 2012. IDA-like gene expression in soybean and tomato leaf abscission and requirement for a diffusible stelar abscission signal. *AoB Plants*, pls035
- Tucker, M.L., Whitelaw, C.A., Lyssenko, N.N., Nath, P.** 2002. Functional analysis of regulatory elements in the gene promoter for an abscission-specific cellulase from bean and isolation, expression, and binding affinity of three TGA-type basic leucine zipper transcription factors. *Plant Physiol* 130: 1487-1496.

- Tudela, D., Primo-Millo, E.** 1992. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid transported from roots to shoots promotes leaf abscission in Cleopatra Mandarin (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) seedlings rehydrated after water stress, *Plant Physiol.* 100: 131–137.
- Tusnády, G.E., Sarkadi, B., Simon, I., and Váradi, A.** 2006. Membrane topology of human ABC proteins. *FEBS Lett.* 580: 1017-1022
- Tyler, B.m., Tripathy, S., Zhang, X., Dehal, P., Jiang, R.H.Y., Aerts, A., Arredondo, F.D., Baxter, I., Bensasson, D., and Beynon, D.L.** 2006. Phytophthora Genome Sequences Uncover Evolutionary Origins and Mechanisms of Pathogenesis. *Science* 313: 1261-1266.
- Tyzack, J.K., Wang, X., Belsham, G.J., and Proud, C.G.** 2000. ABC50 Interacts with Eukaryotic Initiation Factor 2 and Associates with the Ribosome in an ATP-dependent Manner. *J. Biol. Chem.* 275: 34131 -34139.
- Ueda, J., Miyamoto, K., Hashimoto, M.** 1996. Jasmonates promote abscission in bean petiole explants: its relationship to the metabolism of cell wall polysaccharides and cellulase activity, *J. Plant Growth Regul.* 15: 189–195.
- Ukitsu, H., Kuromori, T., Toyooka, K., Goto, Y., Matsuoka, k., Sakuradani, E., Shimizu, S., Kamiya, A., Imura, Y., Yuguchi, M., Wada, T., Hirayama, T., and Shinozaki, K.** 2007. Cytological and biochemical analysis of COF1, an Arabidopsis mutant of an ABC transporter gene. *Plant Cell Physiol.* 48: 1524-1533.
- Ulmasov, T., Hagen, G., Guilfoyle, T.J.** 1999. Activation and repression of transcription by auxin-response factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 5844–5849.
- Umehara, M., Hanada, A., Yoshida, S., Akiyama, K., Arite, T., TakedaKamiya, N., Magome, H., Kamiya, Y., Shirasu, K., Yoneyama, K. et al.** 2008. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* 455:195-200
- Van Dongen, J. T., Gupta, K. J., Ramírez-Aguilar, S. J., Araújo, W. L., Nunes-Nesi, A., & Fernie, A. R.** 2011. Regulation of respiration in plants: A role for alternative metabolic pathways. *Journal of Plant Physiology*, 168 (12): 1434–1443.
- Van Doorn, W.G., Beers, E.P., Dangel, J.L., Franklin-Tong, V.E., Gallois, P., Haranishimura, I., Jones, A.M., Kawai-Yamada, M., Lam, E., Mundy, J., Mur, L.A., Petersen, M., Smertenko, A., Taliansky, M., Van Breusegem, F., Wolpert, T., Woltering, W., Zhivotovsky, B., Bozhkov, P.V.** 2011. Morphological classification of plant cell deaths, *J. Exp. Bot.* 18: 1241–1246.
- Van Leeuwen, H., Monfort, A., Zhang, H.B., Puigdomènech, P.** 2003. Identification and characterization of a melon genomic region containing a resistance gene cluster from a constructed BAC library. Microlinearity between Cucumismelo and Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol* 51: 703–718.
- Van Nocker, S.** 2009. Development of the abscission zone, *Stewart Postharvest Rev.* 5: 1–6.

- Vandenbussche, F., Petrášek, J., Žádníková, P et al.** 2010. The auxin influx carriers AUX1 and LAX3 are involved in auxin-ethylene interactions during apical hook development in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Development* **137**: 597-606.
- Vandenbussche, F., Straeten, V.D.** 2007. One for all and all for one: cross-talk of multiple signals controlling the plant phenotype. *J. Plant Growth Regul.* **26**: 178-187.
- Vaughn, M. W., Tanurdzic, M., Lippman, Z., Jiang, H., Carrasquillo, R., Rabinowicz, P. D., et al.** 2007. Epigenetic natural variation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Biol.* **5**: e174. doi: 10.1371/journal.pbio.0050174
- Vazquez de Aldana, C.R., Marton, M.J., and Hinnebusch, A.G.** 1995. GCN20, a novel ATP binding cassette protein, and GCN1 reside in a complex that mediates activation of the eIF-2 alpha kinase GCN2 in amino acid-starved cells. *EMBO J.* **14**: 3184-3199
- Verrier, P.J., Bird, D., Burla, B., Dassa, E., Forestier, C., Geisler, M., Klein, M., Kolukisaoglu, U., Lee, Y., Martinoia, E., Murphy, A., Rea, P.A., Samuels, L., Schulz, B., Spalding, E.J., Yazaki, K., Theodoulou, F.L.** 2008. Plant ABC proteins—a unified nomenclature and updated inventory. *Trends Plant Sci* **13**: 151-159.
- Vijay, N., Poelstra, J.W., Künstner, A., Wolf, J.B.** 2012. Challenges and strategies in transcriptome assembly and differential gene expression quantification. A comprehensive in silico assessment of RNA-seq experiments. *Mol Ecol.* doi:10.1111/mec.12014
- Vollbrecht, E., Veit, B., Sinha, N., Hake, S.** 1991. The developmental gene Knotted-1 is a member of a maize homeobox gene family, *Nature* **350**: 241–243.
- Vrebalov, J., Pan, I., L., Arroyo, A., J., McQuinn, R., Chung, M., Poole, M., et al.** 2009. Fleshy fruit expansion and ripening are regulated by the Tomato SHATTERPROOF gene TAGL1. *Plant Cell* **21**: 3041–3062. doi: 10.1105/tpc.109.066936
- Vrebalov, J., Ruezinsky, D., Padmanabhan, V., White, R., Medrano, D., Drake, R., Schuch, W., Giovannoni, J.** 2002. A MADS-Box gene necessary for fruit ripening at the tomato Ripening-Inhibitor (Rin) locus, *Science* **296**: 343–346. doi: 10.1126/science.1068181
- 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. doi:10.1111/j. 1469-8137.2007.02254.x
- Walsh, J., Waters, C.A., Freeling, M.** 1998. The maize gene *liguleless2* encodes a basic leucine zipper protein involved in the establishment of the leaf blade–sheath boundary, *Genes Dev.* **12**: 208–218.
- Wanders, R.J., Visser, W.F., van Roermund, C.W., Kemp, S., Waterham, H.R.** 2007. The peroxisomal ABC transporter family. *Pflugers Arch* **453**: 719–734

- Wang, X., Liu, D., Li, A., Sun, X., Zhang, R., Wu, L., Mao, L.** 2013. Transcriptome Analysis of Tomato Flower Pedicel Tissues Reveals Abscission Zone-Specific Modulation of Key Meristem Activity Genes. *PLoS ONE*, 8(2).
- Wang, X., Xu, Y., Han, Y., Bao, S., Du, J., Yuan, M., Xu, Z., Chong, K.** 2006. Overexpression of RAN1 in rice and Arabidopsis alters primordial meristem, mitotic progress, and sensitivity to auxin. *Plant Physiology* **140**: 91-101
- Wang, X.M.** 2004. Lipidsignaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 392-336.
- Wang, X.Q., Xu, W.H., Ma, L.G., Fu, Z.M., Deng, X.W., Li, J.Y., Wang, Y.H.** 2006. Requirement of KNAT1/BP for the development of abscission zones in Arabidopsis thaliana. *J. Integr. Plant Biol.* 48: 15–26.
- Wanke, D., & Kolukisaoglu, H. U.** 2010. An update on the ABCC transporter family in plants: many genes, many proteins, but how many functions? *Plant Biology (Stuttgart, Germany)*, 12 Suppl 1, 15–25. doi:10.1111/j.1438-8677.2010.00380.x
- Webster, B.** 1975. Anatomical and histochemical modifications associated with abscission of Cucumis fruits. *J AmerSocHortSci* 100 (2): 180–184.
- Wei, P.C., Tan, F., Gao, X.Q., Zhang, X.Q., Wang, G.Q., Xu, H., Li, L.J., Chen, J., Wang, X.C.** 2010. Overexpression of AtDOF4.7, an Arabidopsis DOF Family Transcription Factor, Induces Floral Organ Abscission Deficiency in Arabidopsis. *Plant Physiology* **153**: 1031-1045.
- Westlake, C.J., Cole, S.P.C., and Deeley, R.G.** 2005. Role of the NH2-terminal membrane spanning domain of Multidrug Resistance Protein 1/ABCC1 in protein processing and trafficking. *Mol. Biol. Cell* 16: 2483- 2492
- Whitaker, T.W., Davis, G.N.** 1962. Cucurbits, botany, cultivation and utilization. Interscience Publishers Inc. New York, 250.
- Whitelaw, C.A., Lyssenko, N.N., Chen, L., Zhou, D., Mattoo, A.K., Tucker, M.L.** 2002. Delayed abscission and shorter internode correlated with a reduction in the ethylene receptor LeETR1 transcript in transgenic tomato. *Plant Physiol.* 128: 978-987.
- Wiersma, P.A., Zhang, H., Lu, C., Quail, A., Toivonen, P.M.A.** 2007. Survey of the expression of genes for ethylene synthesis and perception during maturation and ripening of 'Sunrise' and 'Golden Delicious' apple fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 44: 204-211.
- Wilson, Z.A., Song, J., Taylor, B., Yang, C.** 2011. The final split: the regulation of anther dehiscence. *J. Exp. Bot.* 62: 1633–1649.
- Winter, H., & Huber, S. C.** 2000. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 35(4): 253–289. <http://doi.org/10.1080/07352680091139178>

- Wright, M., Osborne, D.J.** 1974. Abscission in *Phaseolus vulgaris*; the positional differentiation and ethylene-induced expansion growth of specialised cells, *Planta* 120: 163–170.
- Wu, G., Lewis, D.R., and Spalding, E.P.** 2007. Mutations in *Arabidopsis* multidrug resistance-like ABC transporters separate the roles of acropetal and basipetal auxin transport in lateral root development. *Plant Cell* 19: 1826–1837
- Wu, X., Yu, Y., Han, L., Li, C., Wang, H., Zhong, N., Yao, Y., Xia, G.** 2012. The Tobacco BLADE-ON-PETIOLE 2 Gene Mediates Differentiation of the Corolla Abscission Zone by Controlling Longitudinal Cell Expansion, *Plant Physiol.* 159: 835–850.
- Wu, Z.C., Burns, J.K.** 2003. Isolation and characterization of a cDNA encoding a lipid transfer protein expressed in 'Valencia' orange during abscission. *J. exp. Bot.* 54: 1183–1191.
- Wu, Z.C., Burns, J.K.** 2004. A  $\beta$ -galactosidase gene is expressed during mature fruit abscission of 'Valencia' orange (*Citrus sinensis*). *J. exp. Bot.* 55: 1483–1490.
- Xu, M., Hu, T., McKim, S.M., Murmu, J., Haughn, G.W., Hepworth, S.R.** 2010. *Arabidopsis*, BLADE-ON-PETIOLE1 and 2 promote floral meristem fate and determinacy in a previously undefined pathway targeting APETALA1 and AGAMOUS-LIKE24, *Plant J.* 63: 974–989.
- Xu, X.M.**, 2004 "AtNAP7 is a plastidic SufC-like ATP-binding cassette/ATPase essential for *Arabidopsis* embryogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(24):9143–9148
- Yahyaoui, F.E.L., Wongs-Aree, C., Latché, A., Hackett, R., Grierson, D., Pech, J.C.** 2002. Molecular and biochemical characteristics of a gene encoding an alcohol acyl-transferase involved in the generation of aroma volatile esters during melon ripening, *Eur. J. Biochem.* 269: 2359–2365.
- Yamagami, T., Tsuchisaka, A., Yamada, K., Haddon, W.F., Harden, L.A., Theologis, A.** 2003. Biochemical diversity among the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase isozymes encoded by the *Arabidopsis* gene family, *J. Biol. Chem.* 278: 49102–49112.
- Yamaki, S., Asakura, T.** 1991. Stimulation of the uptake of sorbitol into vacuoles from apple fruit flesh by abscisic acid and into protoplasts by indoleacetic acid. *Plant Cell Physiol.* 32: 315–318.
- Yamaoka, S., Leaver, C.J.** 2008. EMB2473/MIRO1, an *Arabidopsis* Miro GTPase, is required for embryogenesis and influences mitochondrial morphology in pollen. *Plant Cell* 20: 589–601.
- Yang, S.F.** 1985. Biosynthesis and action of ethylene, *Hort Science* 20: 41–45.
- Yang, S.F., Hoffman, N.E.** 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35: 155–189.
- Yazaki, K., Shitan, N., Sugiyama, A., and Takanashi, K.** 2009. Cell and molecular biology of ATP-binding cassette proteins in plants. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 276: 264–299



- Yu, X., Li, L., Li, L., Guo, M., Chory, J., Yin, Y.** 2008. Modulation of brassinosteroid-regulated gene expression by Jumonji domain containing proteins ELF6 and REF6 in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **105**: 7618-7623.
- Yuan, R., Hartmond, U., Grant, A., Kender, W.J.** 2001. Physiological factors affecting response of mature 'valencia' orange fruit to CMN-Pyrazole. I. Effects of young fruit, shoot, and root growth, *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **126**: 414-419.
- Yuan, R., Wu, Z., Kostenyuk, I.A., Burns, J.K.** 2005. G-protein-coupled alpha2A-adrenoreceptor agonists differentially alter citrus leaf and fruit abscission by affecting expression of ACC synthase and ACC oxidase, *J. Exp. Bot.* **56**: 1867-1875.
- Yuan, R.C., Kender, W.J., Burns, J.K.** 2003. Young fruit and auxin transport inhibitors affect the response mature 'Valencia' oranges to abscission materials via changing endogenous plant hormones. *J. amer. Soc. hort. Sci.* **128**: 302-308.
- Yuan, R.G., Li, J.G.** 2003. Effect of sprayable 1-MCP, AVG, and NAA on ethylene biosynthesis, preharvest fruit drop, fruit maturity, and quality of 'Delicious' apple. *HortScience* **43**: 1454-1460.
- Zacarias, L., Talon, M., Ben-Cheikh, W., Lafuente, M.T., Primo-Millo, E.** 1995. Abscisic acid increases in non-growing and paclobutrazol-treated fruits of seedless mandarins, *Physiol. Plant* **95**: 613-619.
- Zahara, M.B., Scheuerman, R.W.** 1988. Hand-harvesting jointless vs. jointed-stem tomatoes, *Calif. Agric.* **42**: 14.
- Zamboni, A., Di Carli, M., Guzzo, F., Stocchero, M., Zenoni, S., Ferrarini, A., et al.** 2010. Identification of putative stage specific grapevine berry biomarkers and omics data integration into networks. *Plant Physiol.* **154**: 1439-1459. doi: 10.1104/pp.110.160275
- Zanchin, A., Marcato, C., Trainotti, L., Casadoro, G., Rascio, N.** 1995. Characterization of abscission zones in the flowers and fruits of peach [*Prunus persica* (L.) Batsch], *New Phytol.* **129**: 345-354.
- Zang, A., Xu, X., Neill, S., Cai, W.** 2010. Overexpression of OsRAN2 in rice and *Arabidopsis* renders transgenic plants hypersensitive to salinity and osmotic stress. *J Exp Bot* **61**: 777-789.
- Zegzouti, H., Jones, B., Marty, C., Maitre, B., Latché, A., Pech, J.C., Bouzayen, M.** 1999. Ethylene regulated gene expression in tomato fruit: characterization of novel ethylene responsive and ripening-related genes isolated by differential display, *Plant J.* **18**: 89-601.
- Zeng W., Brutus A., Kremer J. M., Withers J. C., Gao X., Jones A. D., et al.** 2011. A genetic screen reveals *Arabidopsis* stomatal and/or apoplastic defense against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *PLoS Pathog.* **7**: e1002291 10.1371/journal.ppat.1002291

- Zeroni, M., Galil, I., Ben-Yehoshuba, S.** 1976. Autoinhibition of ethylene formation in nonripening stages of the fruit of sycamore fig (*Ficus sycomorus* L.), *Plant Physiol.* 57: 647–650.
- Zhang, X., Qi, M., Xu, T., Lu, X., & Li, T.** 2015. Proteomics profiling of ethylene-induced tomato flower pedicel abscission. *Journal of Proteomics*, 121, 120 : 67–87.
- Zhang, M., Leng, P., Zhang, G., Li, X.** 2009. Cloning and functional analysis of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) genes encoding a key enzyme during abscisic acid biosynthesis from peach and grape fruits. *J. Plant Physiol.* 166: 1241–1252. doi: 10.1016/j.jplph.2009.01.013
- Zhang, X., Yazaki, J., Sundaresan, A., Cokus, S., Chan, S. W., Chen, H., et al.** 2006. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell* 126: 1189–1201. doi: 10.1016/j.cell.2006.08.003
- Zhang, X.S., O’Neill, S.D.** 1993. Ovary and gametophyte development are coordinately regulated by auxin and ethylene following pollination, *Plant Cell* 5: 403–418.
- Zheng, X.Y., Wolff, D.W.** 2000. Ethylene production, shelf-life and evidence of RFLP polymorphisms linked to ethylene genes in melon (*Cucumis melo* L.), *Theor. Appl. Genet.* 101: 613–624.
- Zheng, X.Y., Wolff, D.W., Crosby, K.M.** 2002. Genetics of ethylene biosynthesis and restriction fragment length polymorphism (RFLPs) of ACC oxidase and synthase genes in melon (*Cucumis melo* L.), *Theor. Appl. Genet.* 105: 397–403.
- Zhong, S., Fei, Z., Chen, Y. R., Zheng, Y., Huang, M., Vrebalov, J., et al.** 2013. Single-base resolution methylomes of tomato fruit development reveal epigenome modifications associated with ripening. *Nat. Biotechnol.* 31: 154–159. doi: 10.1038/nbt.2462
- Zhou, C.J., Lakso, A.N., Robinson, T.L., Gan, S.S.** 2008. Isolation and characterization of genes associated with shade-induced apple abscission. *Mol. Genet. Genomics* 280: 83–92.
- Zhou, Y., Lu, D., Li, C., Luo, J., Zhu, B.F., Zhu, J., Shangguan, Y., Wang, Z., Sang, T., Zhou, B., Han, B.** 2012. Genetic control of seed shattering in rice by the APETALA2 transcription factor SHATTERING ABORTION1, *Plant Cell* 24: 1034–1048.
- Zhu, H., Beers, E.P., Yuan, R.C.** 2008. Amino ethoxyvinylglycine inhibits fruit abscission induced by naphthalene acetic acid and associated relationships with expression of genes for ethylene biosynthesis, perception, and cell wall degradation in ‘Delicious’ apple. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 133: 727–734.
- Zhu, H., Dardick, C.D., Beers, E.P., Callanhan, A.M., Xia, R., Yuan, R.** 2011. Transcriptomics of shading-induced and NAA-induced abscission in apple (*Malus domestica*) reveals a shared pathway involving reduced photosynthesis, alterations in carbohydrate transport and signaling and hormone crosstalk, *BMC Plant Biol.* 11: 138.

*Bibliografía*

**Zhu, H., Yuan, R.G.** 2010. Effects of 1-methylcyclopropene and naphthalene cetic acid on fruit set and expression of genes related to ethylene biosynthesis and perception and cell wall degradation in apple. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 135: 402-409.

**Zilberman, D., Henikoff, S.** 2007. Genome-wide analysis of DNA methylation patterns. *Development* 134: 3959–3965. doi: 10.1242/dev.001131

**Zolman, B.K., Monroe-Augustus, M., Thompson, B., Hawes, J.W., Krukenberg, K.A., Matsuda, S.P.T., Bartel, B.** 2001 chy1, an Arabidopsis mutant with impaired  $\beta$ -oxidation, is defective in a peroxisomal  $\beta$ -hydroxyisobutyrylCoA hydrolase. *J Biol Chem* 276: 31037–31046

## *Bibliografía*