



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la
Agrodiversidad Valenciana

Regulación de la traducción durante la maduración del fruto

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Mejora Genética Vegetal

AUTOR/A: Crespo Martínez, Enrique

Tutor/a: Soler Aleixandre, Salvador

Cotutor/a externo: BRUMOS FUENTES, JAVIER

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023



Regulación de la traducción durante la maduración del fruto

Trabajo Fin de Máster

Instituto Universitario de Conservación y Mejora de la
Agrodiversidad Valenciana

Máster en Mejora Genética Vegetal

Autor: Enrique Crespo Martínez

Director: Javier Brumós Fuentes

Tutor Académico: Salvador Soler Aleixandre

Curso Académico: 2022/2023

Regulación de la traducción durante la maduración del fruto

Las plantas son capaces de adaptar sus programas internos de desarrollo de acuerdo con las señales externas que reciben del entorno. Un entorno en constante cambio, en el cual las plantas han desarrollado la habilidad de percibir e integrar toda la información del medio que las rodea. Y es evidente que, en ese proceso de integración, las hormonas vegetales juegan un papel indispensable.

El etileno es una hormona vegetal involucrada en diversos procesos de desarrollo. Es esencial en la maduración y ablandamiento de los productos vegetales y, por tanto, es uno de los principales determinantes de la calidad y vida útil de frutas y hortalizas. Una mejor comprensión de los mecanismos moleculares de cómo el etileno regula la maduración de los frutos puede tener aplicaciones directas en el sector agroalimentario.

En la mayoría de los casos, existe una unidireccionalidad en la expresión de la información contenida en el material genético. Primero, el ADN se transcribe a ARN mensajeros, que más tarde se traducen a proteínas. El etileno producido por el fruto durante la maduración tiene un claro impacto en la regulación de la expresión génica. En las últimas décadas, hemos estudiado esta regulación principalmente a nivel transcripcional. Mientras otros niveles de regulación, como los cambios en la eficiencia de la traducción, apenas han sido explorados. En nuestro laboratorio, hemos implementado una novedosa técnica, el *Ribosome footprinting*, que nos permite identificar ARN mensajeros regulados a nivel traduccional. Nuestros resultados sugieren que la traducción de ciertos ARN mensajeros se encuentra bajo una firme regulación durante la maduración del fruto.

En este Trabajo de Fin de Máster, se estudiarán los mecanismos moleculares responsables de la regulación de la traducción durante la maduración del fruto. En primer lugar, se analizarán los ARNs regulados a nivel traduccional, creando las herramientas y líneas necesarias para su identificación. En segundo lugar, se aprovechará este mecanismo como herramienta biotecnológica para retrasar el ablandamiento del fruto. Por último, se identificarán y estudiarán los elementos reguladores que confieren esta regulación de la traducción, así como su conservación. Los elementos más interesantes serán seleccionados y probados en planta para confirmar su función en la regulación de la traducción en respuesta a etileno.

Los resultados de este estudio nos permitirán identificar y optimizar el empleo de módulos reguladores de la traducción, los cuales son una nueva herramienta en las áreas de la biotecnología vegetal y de la biología sintética con potenciales aplicaciones a sistemas agrícolas.

Palabras clave: etileno, maduración, traducción, biotecnología, firmeza, EIN2, EBF2.

Translation regulation during fruit ripening

Plants can adapt their internal developmental programs according to the external signals they receive from the environment. It is a constantly changing environment, in which plants have developed the ability to perceive and integrate all the information from their surroundings. And it is evident that, in this integration process, plant hormones play an indispensable role.

Ethylene is a plant hormone involved in various developmental processes. It is essential in the ripening and softening of plant products, and therefore, it is one of the main determinants of the quality and shelf life of fruits and vegetables. A better understanding of the molecular mechanisms of how ethylene regulates fruit ripening can have direct applications in the agri-food sector.

In most cases, there is unidirectionality in the expression of the information contained in genetic material. First, DNA is transcribed into messenger RNA, which is later translated into proteins. The ethylene produced by the fruit during ripening has a clear impact on the regulation of gene expression. In recent decades, we have mainly studied this regulation at the transcriptional level, while other levels of regulation, such as changes in translation efficiency, have barely been explored. In our laboratory, we have implemented a novel technique called Ribosome footprinting, which allows us to identify messenger RNAs regulated at the translational level. Our results suggest that the translation of certain messenger RNAs is firmly regulated during fruit ripening.

In this Master's Thesis, we will study the molecular mechanisms responsible for the regulation of translation during fruit ripening. First, we will analyze translationally regulated RNAs, creating the necessary tools and lines for their identification. Second, we will leverage this mechanism as a biotechnological tool to delay fruit softening. Finally, we will identify and study the regulatory elements that confer this regulation of translation, as well as their conservation. The most interesting elements will be selected and tested in plants to confirm their function in the regulation of translation in response to ethylene.

The results of this study will allow us to identify and optimize the use of translation regulatory modules, which are a new tool in the fields of plant biotechnology and synthetic biology with potential applications in agricultural systems.

Key words: ethylene, ripening, translation, biotechnology, firmness, EIN2, EBF2.

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer la oportunidad a Javi. Sin ningún atisbo de duda, la persona clave para que todo esto haya sido posible. Realizar este trabajo a su lado ha supuesto un punto de inflexión en mi formación académica que me ha servido para despejar muchas dudas. Estaré siempre agradecido por todo lo aprendido y, sobre todo, por como lo he aprendido. Sé que he tenido un gran mentor. Espero que esto solo sea el principio de algo más grande.

Gracias a Damiano, mi fastuoso compañero de laboratorio. Todavía me debe un ristretto; por suerte, tendrá tiempo para saldar su deuda. Vamos juntos en esto.

Gracias a Diego, la última adquisición del grupo. Aún tenemos mucho tiempo por delante para risas, cafés y básquet.

Gracias a todas las personas del 2.07 y del 2.08, nunca he estado solo. El ambiente allí es inmejorable.

Gracias a todos mis compañeros del máster. Dudo que olvide todo lo vivido durante estos dos años. Especial mención al piset; desde luego, ha sido toda una experiencia compartir vida con ellos. Por desgracia, no corresponde en este trabajo hacer alusión a lo allí vivido.

Gracias a mi familia y amigos que, tal vez sin ser conscientes de ello, han sido fundamentales en este proceso.

Sara, a ti te guardo estas líneas. Nunca pude llegar a imaginar nada de lo que llegarías a suponer para mí, por ello soy consciente de que te debo unas gracias especiales. Te va a tocar acompañarme un poco más.

Este trabajo va dedicado a una persona que ha formado parte de mi vida de una forma especial, mi abuela. No la puedo comparar con nadie, pues era única. No le he podido enseñar este trabajo terminado, pero estoy seguro de que estaría orgullosa de su nieto.

Índice

1	Introducción	1
1.1	El aumento de la población y la necesidad de alimentos	1
1.2	El papel del etileno en la maduración del fruto	2
1.3	Ruta de la biosíntesis del etileno.....	4
1.4	Mecanismos moleculares de la regulación de la biosíntesis y señalización.....	5
1.5	Control postranscripcional de la ruta de señalización del etileno	9
1.6	Resultados preliminares	9
2	Objetivos	14
3	Materiales y métodos.....	15
3.1	Material vegetal y condiciones de cultivo	15
3.1.1	Material vegetal.....	15
3.1.2	Esterilización y estratificación de las semillas	15
3.1.3	Condiciones de crecimiento de las plantas	15
3.2	Cuantificaciones	16
3.2.1	Firmeza del fruto	16
3.2.2	Pérdida de agua.....	16
3.2.3	Producción de etileno	17
3.2.4	Número de ramilletes y altura.....	17
3.2.5	Análisis estadísticos	17
3.3	Técnicas de biología molecular.....	17
3.3.1	Aislamiento de ADN genómico.....	17
3.3.2	Amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	18
3.3.3	Generación de construcciones	18
3.3.4	Transformación de <i>Escherichia coli</i>	19
3.3.5	Purificación y comprobación de plásmidos.....	19
3.3.6	Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	20
3.3.7	Transformación de <i>A. thaliana</i> y <i>N. benthamiana</i>	21
3.3.8	Aislamiento de ARN total	21
3.4	Tratamiento con etileno en hojas de <i>N. benthamiana</i>	21
3.5	Visualización al microscopio.....	21
4	Resultados	22
4.1	Generación de líneas para identificar nuevos transcritos que interactúen con EIN2 <i>in vivo</i> utilizando HyperTRIBE.....	22
4.2	Retraso en el ablandamiento del fruto usando la región 3'UTR de <i>EBF2</i>	24

4.3	La pérdida de agua como aproximación no destructiva para cuantificar ablandamiento	25
4.4	Estudio de la producción de etileno de las líneas mutantes <i>pcl</i> complementadas con la región 3'UTR de <i>EBF2</i>	26
4.5	Estudio de cambios morfológicos en las líneas mutantes <i>pcl</i> complementadas con la región 3'UTR de <i>EBF2</i>	27
4.6	Análisis de la conservación del mecanismo molecular por el cual el etileno regula la traducción de <i>EBF2</i>	28
4.7	Caracterización molecular de la región 3'UTR de <i>EBF2</i>	30
5	Discusión	34
5.1	Identificación de nuevos transcritos que interactúan con EIN2.....	34
5.2	El uso de la región 3'UTR de <i>EBF2</i> como herramienta biotecnológica para retrasar el ablandamiento del fruto	35
5.3	Mediciones de la firmeza no destructivas.....	36
5.4	Las líneas mutantes <i>pcl</i> complementadas con la región 3'UTR de <i>EBF2</i> no presentan cambios en la producción de etileno o aspectos morfológicos.	37
5.5	La región 3'UTR de <i>EBF2</i> está conservada en angiospermas	38
5.6	El mecanismo molecular responsable de la regulación a nivel traduccional de <i>EBF2</i> 39	
6	Conclusiones.....	41
7	Bibliografía.....	42

1 Introducción

1.1 El aumento de la población y la necesidad de alimentos

La población actual es aproximadamente tres veces mayor que a mitad del siglo XX. La población mundial ha llegado a los 8 mil millones de personas y hay perspectivas de que pueda aumentar a 8.5 mil millones en 2030 y a 9.7 mil millones en 2050 (United Nations Department of Economic and Social Affairs, 2022). Aunque la tasa de crecimiento demográfico esté decreciendo, sigue y seguirá siendo positiva según las previsiones. Esto significa que hay y habrá más nacimientos que muertes y, por tanto, la población seguirá aumentando (Figura 1).

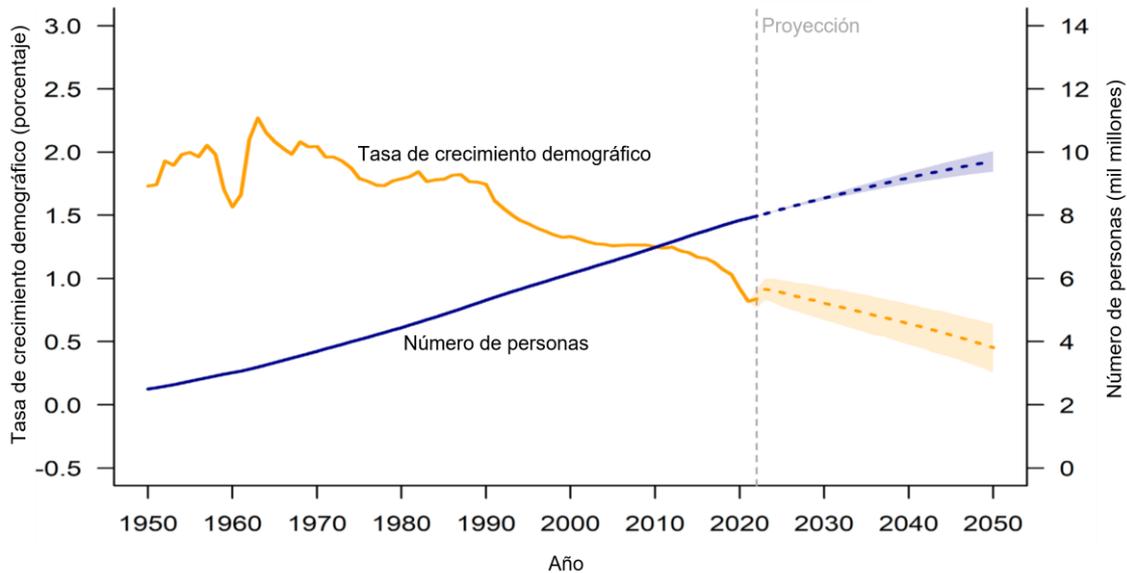


Figura 1. Evolución del aumento de la población mundial y proyección estimada hasta 2050. En el eje de la izquierda se muestran los valores porcentuales de la tasa de crecimiento demográfico (línea amarilla), en el eje de la derecha se muestran los valores para el número de personas en mil millones (línea azul) y en el eje inferior se muestra la línea temporal en años. La línea gris vertical discontinua indica la separación entre los datos actuales reales y las previsiones, así como las líneas amarillas y azules discontinuas (adaptada de United Nations Department of Economic and Social Affairs, 2022).

Este aumento de la población implica un necesario aumento en la disponibilidad de alimento para igualar el incremento en la demanda de alimentos que se espera, en un mundo donde el suelo arable disponible para el cultivo va en retroceso por causas como el cambio climático y la desertificación. Estudios realizados por la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) indican que la disponibilidad de alimento debe aumentar en un 70% en los próximos 30 años para satisfacer esta necesidad (Alexandratos y Bruinsma, 2012). El aumento debe ser generalizado en todos los tipos de alimento, incluidos los de origen vegetal. Para lograr este objetivo, hay que conseguir un aumento sostenible en la producción de alimento y minimizar el desperdicio de este durante la producción y distribución (Figura 2).

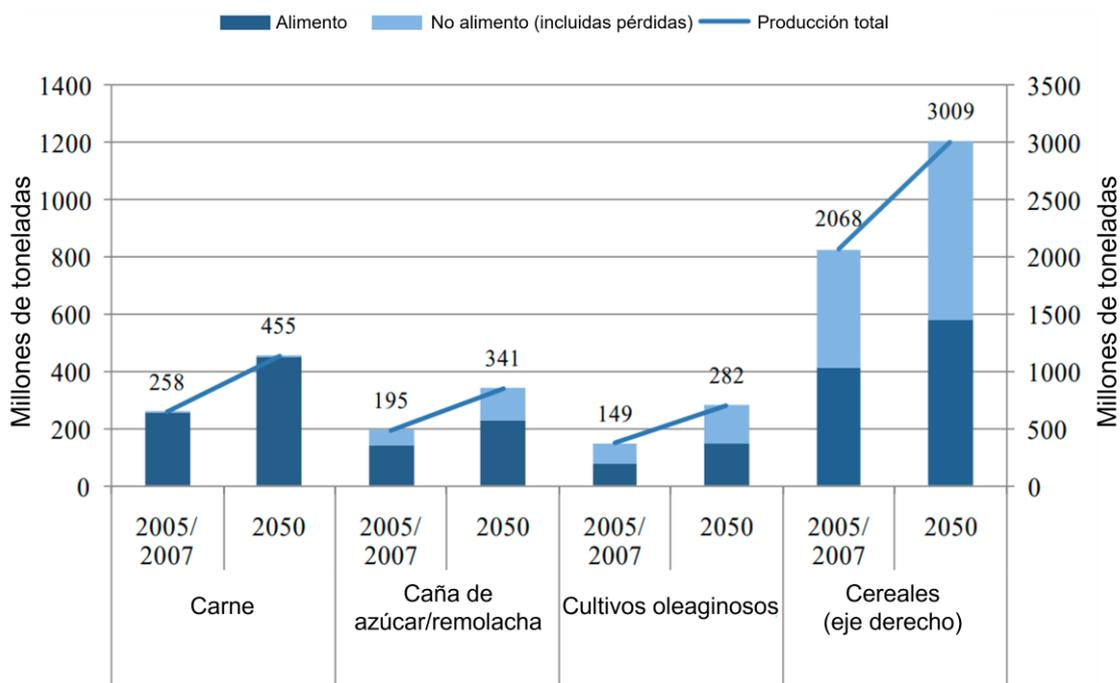


Figura 2. Producción y uso mundial de los principales productos de alimentación. En los ejes laterales se muestran los millones de toneladas producidas, indicadas por las barras para diferentes tipos de alimentos mostrados en el eje inferior para 2005/2007 y la previsión para 2050. Las líneas azules indican la producción total, el color azul oscuro muestra la proporción que se utiliza como alimento y el color azul claro muestra la proporción que no se utiliza como alimento, incluyendo las pérdidas (adaptada de Alexandratos y Bruinsma, 2012).

Las pérdidas de alimento procedentes de la agricultura durante la fase de postcosecha pueden llegar a suponer el 50% del cultivo (Cappellini et al., 1984; Lundqvist et al., 2008). Parte de las pérdidas están relacionadas con la alimentación del ganado. Se invierten altos valores calóricos en la dieta animal de los cuales recuperamos muy pocos al obtener productos alimenticios de origen animal. Una gran parte de las pérdidas tienen lugar en la fase postcosecha, pérdidas que ocurren en la cadena de distribución y en nuestras casas (Lundqvist et al., 2008). La disminución de estas pérdidas es uno de los grandes retos de la producción agrícola porque resultarían en un aumento en la disponibilidad de alimentos, que en la actualidad ya son producidos y los cuales han requerido una gran inversión de recursos. La mayoría de las pérdidas son debidas a la maduración excesiva y la senescencia, resultando en un ablandamiento de los tejidos que provoca infecciones de patógenos oportunistas. Por lo tanto, el desarrollo de cultivos menos susceptibles a esta maduración excesiva resultaría en una disminución de las pérdidas postcosecha y abordaría una necesidad que atiende a nuestra realidad actual y de futuro.

1.2 El papel del etileno en la maduración del fruto

Las hormonas son un grupo de moléculas orgánicas que a muy bajas concentraciones en la planta son capaces de controlar procesos fisiológicos, muchos de ellos de gran interés para la biotecnología. Es bien sabido que juegan un papel crucial en el crecimiento y desarrollo de las plantas, que son capaces de adaptar sus procesos internos de desarrollo de acuerdo con las señales externas que reciben del entorno. Un entorno en constante cambio, en el cual las plantas han desarrollado la habilidad de percibir e integrar toda la información del medio que las rodea. Y es evidente que, en ese proceso de integración, las hormonas vegetales juegan un papel fundamental.

El etileno fue la primera hormona gaseosa identificada, tiene mucha importancia en la agricultura y efectos en varios aspectos de los procesos de desarrollo que la planta experimenta en su ciclo de vida. Esta hormona ha sido objeto de estudio, sobre todo en tratar de esclarecer el mecanismo molecular de acción y aplicar ese conocimiento a la agricultura. En las dos décadas pasadas se han producido rápidos y significantes avances que han permitido entender la ruta de señalización y la regulación de la biosíntesis del etileno (Wen, 2014).

El etileno es la principal hormona vegetal que promueve la maduración, senescencia y ablandamiento en los cultivos hortícolas cosechados (principales causas de las pérdidas postcosecha) y es un determinante importante de la calidad y vida útil de las frutas y verduras. Un mejor entendimiento de cómo el etileno regula la maduración de las frutas podría resultar en aplicaciones directas para reducir el deterioro del fruto. En relación con esto último, el tomate se ha convertido en un sistema modelo para el estudio del papel que juega el etileno en la maduración y el deterioro del fruto. También es el sexto producto agrícola comercial más cultivado a nivel mundial, lo que le dota de un gran interés económico y lo posiciona como una fruta esencial en la dieta humana a lo largo de prácticamente todo el mundo (Seymour, Graham, et al., 2013). El tomate (*Solanum lycopersicum*) es una fruta climatérica, es decir, una vez recolectada puede seguir madurando, pero para ello requiere etileno. En los últimos años, los conocimientos obtenidos en el estudio de la maduración en el tomate han sido transferidos con éxito a otras especies de frutas carnosas, sugiriendo que muchos mecanismos moleculares y fisiológicos están conservados en una amplia gama de especies vegetales (Seymour, Østergaard, et al., 2013). Basándonos en estos estudios, llevados a cabo en tomate, sabemos que los niveles de producción, sensibilidad y respuesta al etileno están determinados por la etapa de desarrollo de la fruta. Durante el crecimiento vegetativo del tomate y en los estados inmaduros del fruto, se producen niveles bajos de etileno debido a que la síntesis de esta hormona está regulada de manera negativa. Esta fase se conoce como Sistema 1 (McMurchie et al., 1972). Al inicio de la maduración (en la etapa *mature green*) se observa un aumento repentino en la respiración, seguido de un considerable aumento en la producción de etileno. Esta fase se conoce como Sistema 2 y se caracteriza por una síntesis autocatalítica de etileno (Liu et al., 2015; McMurchie et al., 1972) (Figura 3).

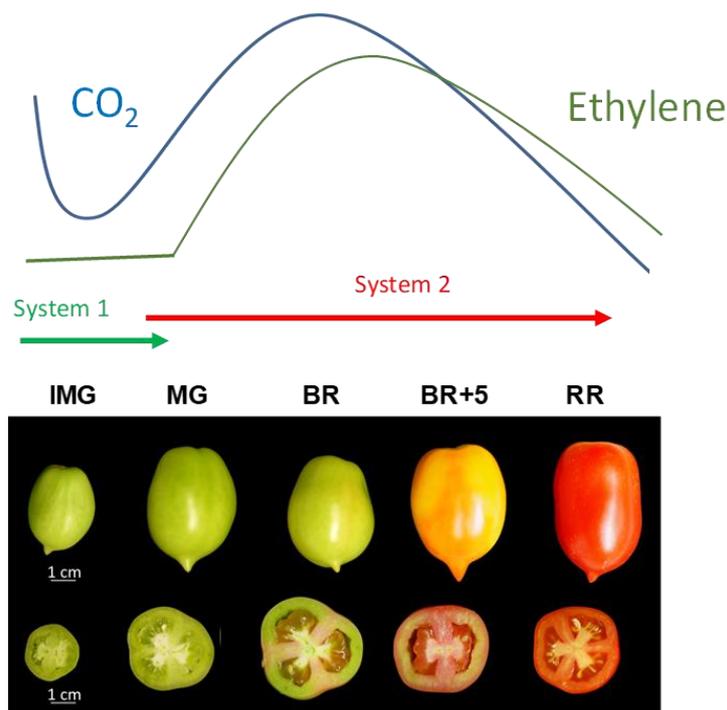


Figura 3. Niveles de producción, sensibilidad y respuesta al etileno, y respiración durante el proceso de maduración del fruto. Respiración del fruto y producción de etileno en diferentes etapas de maduración: IMG (*Inmature Green*), MG (*Mature Green*), BR (*Breaker*), BR +2 (*Breaker +2 días*), BR +5 (*Breaker +5 días*), RR (*Red Ripe*) y OR (*Over Ripe*) (Brumos, 2021).

Esta hormona gaseosa es un importante regulador del crecimiento de la planta, el desarrollo y respuestas a estreses bióticos y abióticos. Los procesos regulados por el etileno están estrechamente relacionados con las concentraciones endógenas de etileno y son iniciados por una producción elevada de esta hormona (Wen, 2014). La producción de etileno puede sufrir una importante inducción bajo estreses, como en el caso de plantas infectadas, y en determinadas etapas de desarrollo, como eventos de senescencia y maduración del fruto (Kende, 1993; Wang et al., 2002; Yang y Hoffman, 1984). El etileno juega un papel fundamental en estos dos últimos aspectos y, además, están estrechamente ligados con las pérdidas postcosecha. La regulación de la biosíntesis de etileno es un punto crucial para todas las funciones reguladas por esta hormona. Es debido a que, a diferencia de las auxinas u otras hormonas, el etileno no necesita ser activamente transportado o degradado en las células de la planta. Esto provoca que la biosíntesis del etileno sea el único punto regulatorio clave en el control de los niveles de etileno (Bürstenbinder y Sauter, 2012).

1.3 Ruta de la biosíntesis del etileno

La ruta de biosíntesis del etileno ha sido objeto de estudio en la segunda mitad del siglo XX. La identificación de la metionina, la S-adenosilmetionina (SAM) y el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) como compuestos intermediarios y precursores del etileno fue un punto de inflexión en la comprensión de esta ruta metabólica (Adams y Yang, 1977; Adams y Yang, 1979; Lieberman et al., 1965). La metionina da lugar a etileno mediante tres reacciones enzimáticas. A través del ciclo de Yang, la metionina se convierte en SAM por la SAM sintasa; SAM se convierte en ACC a través de la ACC sintasa (ACS); y la ACC oxidasa (ACO) degrada el ACC para liberar etileno

(Lin et al., 2009) (Figura 4). Se observó que el O₂ es absolutamente necesario para la síntesis del etileno, dado que permite la identificación del ACC como intermediario precursor (Barry et al., 1996, 2000; Yang y Hoffman, 1984).

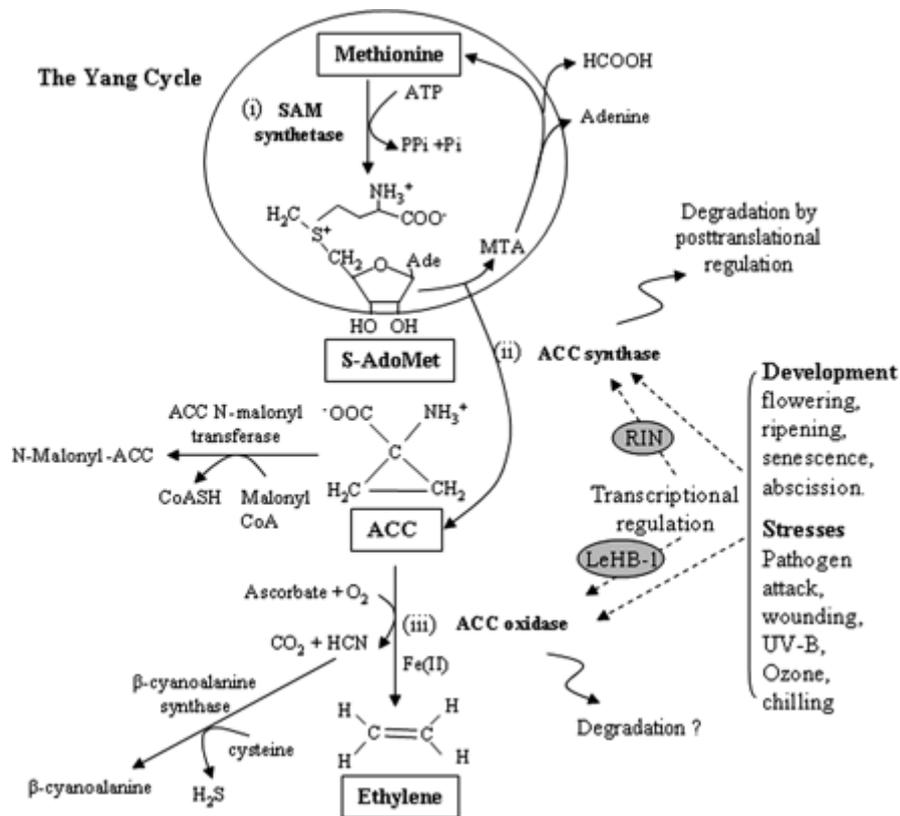


Figura 4. Ruta de biosíntesis del etileno. (i) La formación de S-adenosilmetionina a partir de metionina es catalizada por la SAM sintasa utilizando una molécula de ATP por cada molécula de S-adenosilmetionina sintetizada. (ii) Un paso limitante en la síntesis de etileno es la conversión de S-adenosilmetionina a ACC mediante la ACC sintasa. Se genera un subproducto llamado metiltioadenosina (MTA), junto con el ACC, durante la acción de la ACC sintasa. El reciclaje de MTA de regreso a metionina conserva el grupo metiltiol y permite mantener una concentración constante de metionina en las células incluso cuando se sintetiza etileno rápidamente y la disponibilidad de metionina es pequeño. La malonilación de ACC a malonil-ACC (MACC) agota la disponibilidad de ACC y reduce la producción de etileno. (iii) La ACC oxidasa cataliza el paso final de la síntesis de etileno utilizando ACC como sustrato y genera dióxido de carbono y cianuro. El cianuro es metabolizado por la β-cianoalanina sintasa para producir sustancias no tóxicas. Las flechas discontinuas indican la regulación transcripcional tanto de la ACC sintasa como de la ACC oxidasa por proteínas y señales de desarrollo y medioambientales (Lin et al., 2009).

Las dos enzimas claves en la ruta de biosíntesis son la ACS y la ACO. Ambas están codificadas por familias multigénicas con diferentes patrones de expresión espaciales y temporales, siendo los principales puntos de regulación en la biosíntesis del etileno. También la ubiquitinación, fosforilación y desfosforilación de la proteína ACS juegan un papel importante (Wen, 2014).

1.4 Mecanismos moleculares de la regulación de la biosíntesis y señalización

La biosíntesis del etileno en plantas y las enzimas implicadas en esta ruta están bien caracterizadas (Barry et al., 1996, 2000; Wang et al., 2002). Sin embargo, los mecanismos de regulación, tanto de la ruta de biosíntesis como de la ruta de señalización, incluyen más componentes y dependen de integraciones más complejas de señales internas y medioambientales.

Durante la maduración de los frutos de tomate, el aumento en la síntesis de etileno en la transición al Sistema 2 requiere la inducción de genes específicos de *ACO* y *ACS* (*SIACO1*, *SIACS2* y *SIACS4*) en tomate (Barry et al., 1996, 2000). Se han identificado factores de transcripción que participan en el control del cambio a la fase de maduración, y se ha demostrado que mutaciones espontáneas en algunos de estos genes afectan el proceso de maduración en el tomate. Entre estas mutaciones, *rin* (*ripening-inhibitor*), *nor* (*nonripening*) y *Cnr* (*Colourless nonripening*) presentan una serie de fenotipos similares. Los frutos de estos mutantes se desarrollan normalmente hasta la etapa de *mature green*, momento en el cual su maduración se detiene. Los frutos mutantes no experimentan el aumento climatérico en la respiración, son incapaces de hacer la transición al Sistema 2 y su respuesta a tratamientos exógenos de etileno se ve afectada de forma negativa (Klee y Giovannoni, 2011). Estos mutantes tienen un impacto severo en el proceso de maduración, afectando al color, sabor y textura (Klee y Giovannoni, 2011). Sin embargo, el papel de estos factores de transcripción como reguladores de la maduración se ha reconsiderado después de una reexaminación (Ito et al., 2017; Klee y Giovannoni, 2011). Actualmente, se considera que estos factores de transcripción clásicos son miembros de una red de regulación transcripcional redundante, más compleja y robusta de lo que se pensaba anteriormente, y no son reguladores maestros de la transición del Sistema 1 al Sistema 2 de la producción de etileno (Brumos, 2021; S. Li et al., 2020; R. Wang et al., 2020).

Durante la transición al Sistema 2, el fruto experimenta notables cambios en la producción, sensibilidad y respuesta al etileno que desencadenan la activación de cascadas reguladoras transcripcionales asociadas a los distintos procesos que conforman la maduración, como el ablandamiento del fruto, la producción de azúcares, ácidos, pigmentos y compuestos volátiles. El etileno juega un papel central en iniciar y regular los cambios asociados con la maduración, incluyendo alteraciones importantes en la transcripción de genes. La señalización del etileno está conservada en las plantas vasculares y se ha investigado en profundidad en *Arabidopsis thaliana*.

El primer paso en la percepción del etileno es la unión de este a los receptores. Las plantas contienen múltiples isoformas de receptores de etileno, los cuales tienen una arquitectura similar (Binder, 2020). Inicialmente, se identificaron sitios de unión al etileno en las membranas del retículo endoplásmico (Evans, Bengochea, et al., 1982; Evans, Dodds, et al., 1982). Posteriormente, se confirmó que los receptores de etileno se localizan en el retículo endoplásmico (Chen et al., 2002; Grefen et al., 2008). En *A. thaliana*, se han identificado cinco isoformas que se denominan ETR1 (ETHYLENE RESPONSE 1), ERS1 (ETHYLENE RESPONSE SENSOR 1), ETR2, ERS2 y EIN4 (Bleecker et al., 1988; Sakai et al., 1998). Mutaciones en cualquiera de estos receptores que impiden la unión del etileno causan distintos grados de insensibilidad al etileno en las plantas (Bleecker et al., 1988; Chang et al., 1993; Hall et al., 1999; Schaller y Bleecker, 1995; Wang et al., 2006). También hay algunas mutaciones en estos receptores que no tienen efecto en la unión del etileno, pero impiden la señalización a través del receptor, lo que también conduce esta insensibilidad al etileno (Wang et al., 2006). Proteínas homólogas en tomate también se unen al etileno con alta afinidad y mutaciones en ellas también resulta en insensibilidad al etileno (O'Malley et al., 2005; Okabe et al., 2012; Wilkinson et al., 1995).

El etileno se une al extremo N-terminal transmembrana de los receptores (Schaller y Bleecker, 1995). Para que ETR1 sea funcional, son necesarios iones de cobre que actúan como cofactor para la unión del etileno (Rodríguez et al., 1999). El transportador de cobre localizado en la membrana del retículo endoplasmático, RAN1 (RESPONSIVE TO ANTAGONIST 1), interactúa físicamente con al menos alguno de los receptores y es necesario para la entrega de cobre (Hirayama et al., 1999; Hoppen et al., 2019). La posterior señalización bioquímica de los

receptores aún no se ha determinado y los detalles de cómo se transduce la señal en este paso son desconocidos (Binder, 2020).

Dos proteínas, CTR1 (CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1) y EIN2 (ETHYLENE INSENSITIVE 2), son componentes centrales de la señalización del etileno (Alonso et al., 1999; Kieber et al., 1993) que interactúan físicamente con los receptores (Bisson y Groth, 2010; Cancel y Larsen, 2002; Huang et al., 2003; Zhong et al., 2008) y entre sí (Ju et al., 2012). CTR1 es una quinasa que fosforila los residuos serina/treonina de EIN2 y que funciona como un regulador negativo de la señalización del etileno (Kieber et al., 1993). EIN2 es necesario para la señalización del etileno y está compuesto por una gran región en el extremo N-terminal que contiene múltiples dominios transmembrana incrustados en la membrana del retículo endoplasmático y una porción citosólica en el extremo C-terminal (Alonso et al., 1999). Mutaciones en *CTR1* que abolen las interacciones del receptor con esta quinasa resultan en una CTR1 no funcional (Gao et al., 2003; Huang et al., 2003) y, además, mutaciones que bloquean las interacciones entre ETR1 y EIN2 resultan en insensibilidad al etileno (Bisson y Groth, 2015). Estas interacciones físicas son esenciales para el correcto funcionamiento de la ruta de señalización de etileno.

En ausencia de etileno, los receptores mantienen activo a CTR1 (Figura 5). CTR1 fosforila directamente a EIN2 (Ju et al., 2012), lo que resulta en la ubiquitinación de EIN2 a través del complejo SCF-E3 (SKP1 CULLEN F-BOX) que contiene las proteínas F-box ETP1 y ETP2 que tienen como objetivo EIN2. Posteriormente, esto resulta en la degradación de EIN2 por el proteasoma 26S (Qiao et al., 2009). Como consecuencia, los factores de transcripción EIN3, EIL1 (EIN3-LIKE) y EIL2 son dirigidos a la ubiquitinación por un complejo SCF-E3 que contiene las proteínas F-box EBF1 y EBF2 (Gagne et al., 2004; Potuschak et al., 2003). La degradación de estos factores de transcripción evita las respuestas al etileno. Por lo tanto, en ausencia de etileno, la transducción de la señal en la vía se encuentra bloqueada en distintos niveles.

En presencia de etileno, los receptores se inhiben, lo que conduce a una menor fosforilación de EIN2 por parte de CTR1. Por lo tanto, una explicación para la reducción de la fosforilación de EIN2 por CTR1 es que la unión del etileno a los receptores provoca cambios conformacionales en los receptores que reducen la interacción física entre CTR1 y EIN2, lo que causa una menor fosforilación de EIN2. Se cree que cuando la fosforilación de EIN2 se reduce, hay menos ubiquitinación de EIN2, lo que resulta en un aumento en los niveles de EIN2 y la posterior escisión de EIN2 por una proteasa desconocida para liberar el extremo C-terminal de EIN2 del extremo N-terminal, que queda unido a la membrana (Ju et al., 2012; Qiao et al., 2009, 2012; Wen et al., 2012).

El papel del extremo N-terminal de EIN2 es desconocido. Sin embargo, hay indicios de que tiene un papel en la señalización del etileno (Ma et al., 2013, 2018). En contraste, el extremo C-terminal de EIN2 tiene dos papeles conocidos. Este extremo contiene una secuencia de localización nuclear, lo que le permite llegar al núcleo y allí asociarse con la proteína ENAP1 (EIN2 NUCLEAR ASSOCIATED PROTEIN 1), que es necesaria para la capacidad del extremo C-terminal de EIN2 de aumentar la actividad de EIN3/EIL1 (Zhang et al., 2017) y promover la respuesta a etileno. Además EIN2 es capaz de asociarse a los transcritos de *EBF1* y *EBF2*, lo que provoca que este complejo ARN-proteína se dirija a los cuerpos de procesamiento (p-bodies) donde queda almacenado en presencia de etileno (Li et al., 2015; Merchante et al., 2015). Una consecuencia del almacenamiento del ARN mensajero de *EBF1* y *EBF2* es que estos transcritos no se traducen, evitando la producción de las proteínas F-box EBF1 y EBF2, reduciendo así la degradación de EIN3 y EIL1. Esto provoca una mayor eficiencia y activación de la ruta de señalización del etileno (An et al., 2010; Binder et al., 2007; Potuschak et al., 2003).

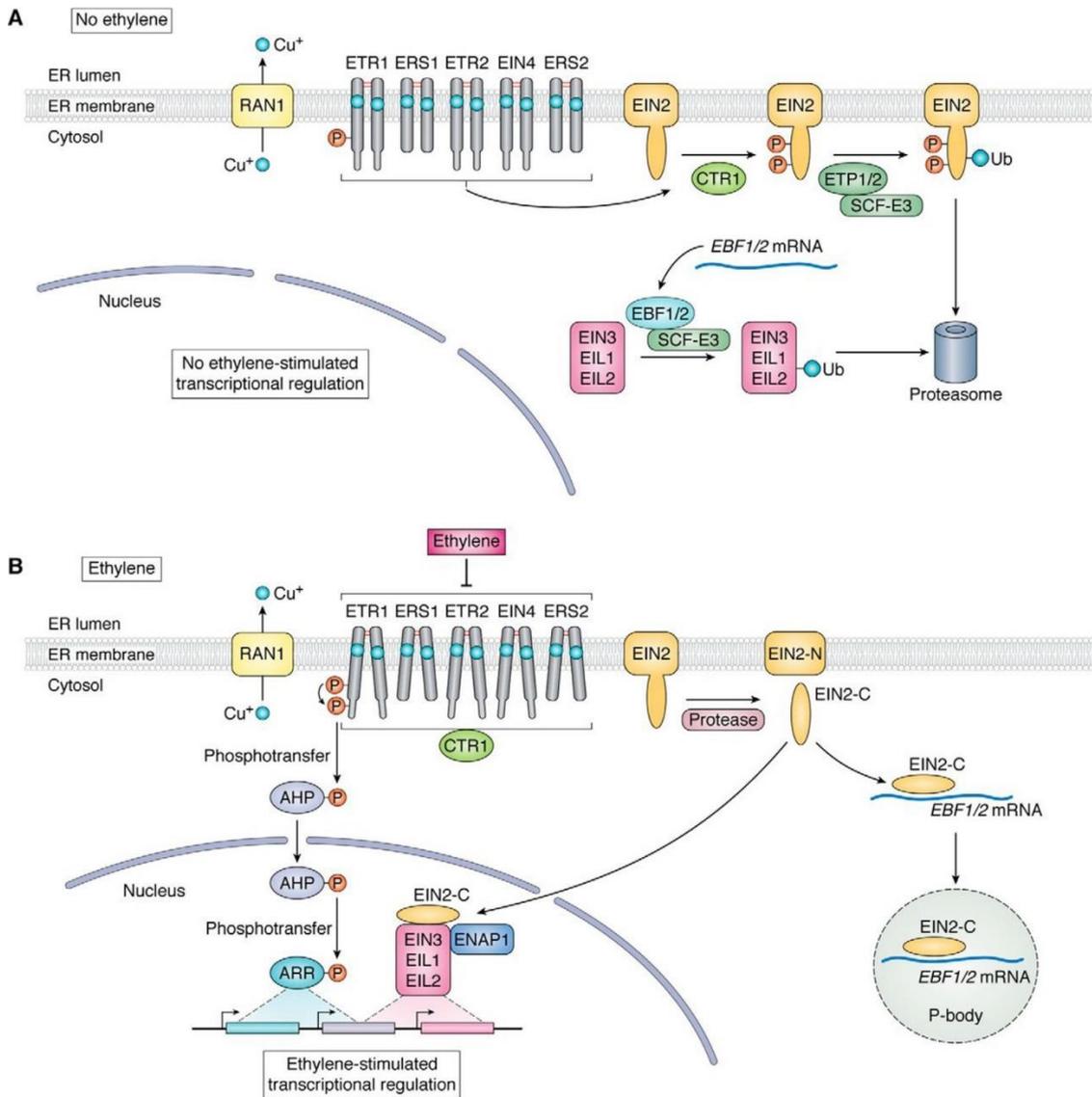


Figura 5. Modelo de señalización del etileno. RAN1 es un transportador de cobre que suministra cobre al lumen del retículo endoplásmico, donde se requiere para la biogénesis de los receptores y se utiliza como cofactor por los receptores para unirse al etileno. **(A)** En ausencia de etileno, los receptores marcan a CTR1, que fosforila EIN2. Esto resulta en la ubiquitinación de EIN2 por un complejo SCF-E3 que contiene las proteínas F-box ETP1/2, lo que causa la degradación de EIN2 por el proteasoma. Debido a que los niveles de EIN2 son bajos, un complejo SCF-E3 que contiene las proteínas F-box EBF1/2 ubiquitina a EIN3 y EIL1, lo que provoca su degradación por el proteasoma y evita que afecten la transcripción en el núcleo. **(B)** En presencia de etileno, este se une a los receptores con el cobre como cofactor. La unión del etileno puede causar un cambio conformacional que reduce la actividad quinasa de CTR1 y hace que CTR1 sea secuestrado por los receptores, de modo que ya no puede fosforilar a EIN2. La reducción en la fosforilación de EIN2 resulta en una menor ubiquitinación de EIN2 y un aumento en los niveles de EIN2. Una proteasa desconocida corta EIN2, liberando el extremo C-terminal del extremo N-terminal. Uno de los destinos del extremo C-terminal es unirse a los transcritos de *EBF1* y *EBF2* para quedar almacenados en cuerpos de procesamiento (p-bodies). La reducción de EBF1/2 resulta en una menor ubiquitinación de EIN3 y EIL1, lo que provoca niveles más altos de estos factores de transcripción. El otro destino del extremo C-terminal de EIN2 es translocarse al núcleo, donde aumenta la actividad transcripcional de EIN3/EIL1 a través de ENAP1. Esto conduce a numerosos cambios transcripcionales. Paralelamente a esta vía, ocurre una transferencia de un grupo fosfato desde una histidina conservada hacia un aspartato en el receptor ETR1. Esto es seguido por una transferencia fosforilada desde este residuo a la AHP y finalmente a ARR, lo que resulta en cambios transcripcionales (Binder, 2020).

En tomate, existen siete receptores de etileno y la expresión de tres de ellos, NR (NEVER RIPE) (Hackett et al., 2000), SIETR4 (ETHYLENE RESPONSE 4) y SIETR6 (Kevany et al., 2007), se ve inducida al inicio de la maduración del fruto. Sustituciones específicas de aminoácidos en el receptor de NR bloquean su capacidad de unirse al etileno, lo que resulta en un mutante dominante de insensibilidad al etileno (mutante *nr*). Los frutos del mutante *nr* no maduran incluso después de tratarlos con etileno, lo que respalda la relevancia de la percepción del etileno en la maduración. En el tomate, hay cuatro ortólogos de *CTR* (Hackett et al., 2000; Kevany et al., 2007). Existe un solo ortólogo de *EIN2* en tomate, *SIEIN2*, y su expresión en el fruto se regula durante la maduración, con los niveles más altos detectados en las etapas *mature green* y *breaker* (Wang et al., 2016). También hay nueve genes *EIL* en el genoma del tomate (Tieman et al., 2001). La sobreexpresión de *SIEIL1* también puede complementar el defecto de maduración del mutante *nr* y restaurar parcialmente los niveles de transcripción de *RIN* (Chen et al., 2004), lo que demuestra el papel crítico de los *SIEIL* en la maduración del fruto.

El modelo presentado anteriormente resume la principal ruta de señalización del etileno en plantas. Pero hay evidencias que muestran que la señalización ocurre, al menos en parte, a través de componentes que no están en la vía canónica presentada anteriormente. Estas vías alternativas (no canónicas) no son necesarias para las respuestas al etileno, pero parecen tener papeles en la modulación o en la alteración de las respuestas a otras hormonas (Binder, 2020). En esta vía, el fosfato se transfiere desde los receptores a AHP (HISTIDINE-CONTAINING PHOSPHOTRANSFER PROTEINS) y finalmente a ARR (RESPONSE REGULATOR PROTEINS) que funciona como factor de transcripción (Figura 5). Varios estudios han demostrado que el extremo C-terminal de ETR1 interactúa físicamente con las proteínas ARR y AHP (Scharein et al., 2008; Scharein y Groth, 2011; Zdarska et al., 2019).

1.5 Control postranscripcional de la ruta de señalización del etileno

La actividad de algunos componentes esenciales de la vía de señalización del etileno está controlada finamente por reguladores de la degradación de proteínas específicas. En *A. thaliana*, como se ha demostrado en anterioridad, los niveles de las proteínas EIN2 y EIN3/EIL1 están estrechamente regulados por proteínas especializadas de tipo F-box, donde ETP1 y ETP2 controlan los niveles de EIN2, mientras que EBF1 y EBF2 (SIEBF1-3 en el fruto de tomate) regulan los niveles de EIN3/EIL1. En ausencia de etileno, estas proteínas tipo F-box desencadenan la degradación a través del proteasoma de EIN2 y EIN3/EIL1, inhibiendo la ruta de señalización del etileno (Merchante et al., 2013). Además de controlar la estabilidad de las proteínas, el etileno también desempeña un papel crítico en la regulación específica de la traducción (Li et al., 2015; Merchante et al., 2015). Aunque *EBF2* es inducido por etileno a nivel transcripcional, su traducción es deficiente en presencia de etileno debido a la unión del extremo C-terminal de EIN2 a su región 3'UTR del transcrito (Merchante et al., 2015). Cuando los niveles de EBF2 son bajos, EIN3/EIL1 se estabilizan y la cascada transcripcional del etileno se activa. Al retirar el etileno, EIN2 es marcado para su degradación por ETP1/2 y, sin el efecto inhibitorio del extremo C-terminal de EIN2, los transcritos de *EBF2* se traducen masivamente, produciendo rápidamente la proteína EBF2 que reprime aún más la señalización del etileno al marcar EIN3/EIL1 para su degradación a través del proteasoma (Merchante et al., 2015).

1.6 Resultados preliminares

Los *SIEBFs* son susceptibles a la regulación traduccional durante el desarrollo del fruto de tomate. El nivel de transcripción de los reguladores negativos de la respuesta al etileno *SIEBFs* (Deng et al., 2018) se incrementa en las primeras etapas del Sistema 2 (Fernandez-Pozo et al., 2017; Liu et al., 2015) (Figura 6). Sin embargo, la respuesta y producción de etileno de la fruta (Figura 3)

también son mayores durante estas etapas, lo que sugiere que los efectos inhibitorios de los *EBFs* están de alguna manera restringidos y los factores de transcripción tipo EIN3 y SIEIL se estabilizan, activando la transcripción de genes aguas abajo de los SIEILs que promueven la maduración.

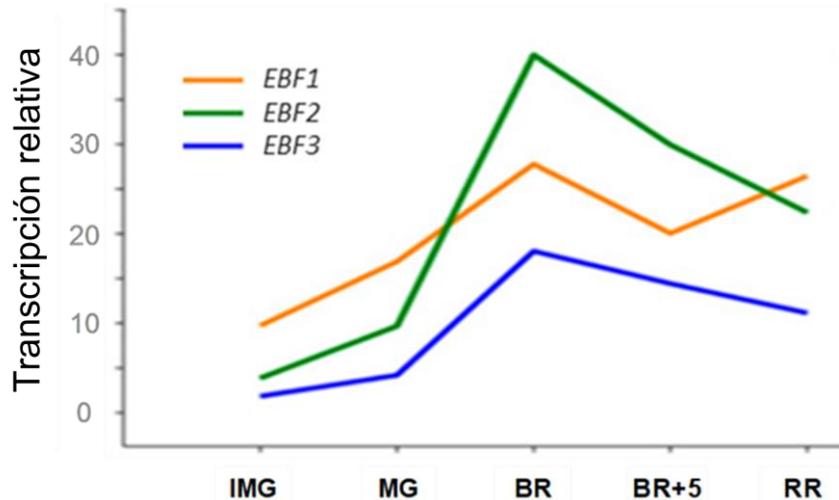


Figura 6. Niveles relativos de transcripción de los genes EBF en diferentes etapas de maduración. IMG (*Immature Green*), MG (*Mature Green*), BR (*Breaker*), BR+5 (*Breaker +5 días*) y RR (*Red Ripe*). La gráfica representa lecturas normalizadas por base para datos de RNA-seq obtenidos del análisis del transcriptoma en múltiples cultivares de tomate en la plataforma TomExpress (<http://tomexpress.toulouse.inra.fr/>).

En concordancia con este control de la traducción de los *SIEBFs*, se conoce que la región 3'UTR de *SIEBF2* es suficiente para conferir regulación mediada por etileno a un gen reportero expresado constitutivamente en plantas de *A. thaliana*, tomate y ensayos de expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana* (Figura 7), mostrando un mecanismo similar al descrito para *AtEBF2* (Li et al., 2015; Merchante et al., 2015). Estos resultados sugieren una conservación funcional en la regulación a nivel traduccional conferida por la región 3'UTR de *EBF2* en respuesta al etileno. Estos resultados también muestran que el mecanismo de regulación traduccional de los EBF es independiente de la fuente de etileno, bien sea exógena en los tratamientos de plántulas de *A. thaliana* (Merchante et al., 2015), o bien sea etileno producido endógenamente como ocurre durante la maduración del fruto de tomate. Bajo estas premisas, la traducción de los transcritos de *SIEBF* se bloquea, permitiendo la acumulación de los factores de transcripción de respuesta a etileno (SIEIL) y, por lo tanto, desencadenando todos los procesos de la maduración del fruto mediados por etileno.

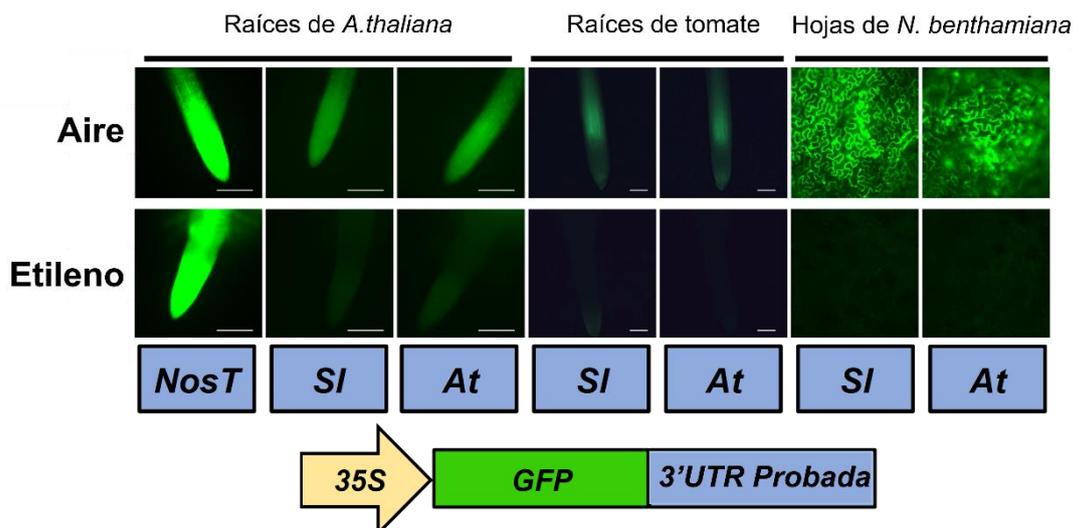


Figura 7. La inhibición de la traducción en respuesta a etileno conferida por las regiones 3'UTR de los *EBF2s* está conservada, al menos, en dicotiledóneas. Líneas transgénicas estables de *A.thaliana* y *S. lycopersicum* transformadas con las construcciones probadas, así como ensayos de expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana* con la misma construcción, demuestran que la traducción de los genes reporteros que albergan la región 3'UTR de *EBF2* de *S. lycopersicum* (*Sl*) o *A.thaliana* (*At*) se ve reprimida en presencia de etileno (baja intensidad de GFP). En condiciones control, la traducción de los reporteros no se ve afectada. La traducción de la construcción control que alberga el terminador *Nos* (*NosT*), una región 3'UTR universal, no se ve afectada por la presencia del etileno.

El Ribo-seq es una técnica que permite definir el translatoma (todos los transcritos que se están traduciendo y sus niveles de traducción) de cualquier organismo con una resolución de un simple codón (Ingolia et al., 2009; Merchante et al., 2015). Esta técnica es usada para definir el nivel de traducción de todos los transcritos de un organismo, comparando el número de lecturas con un RNA-seq de los mismos transcritos. En nuestro laboratorio se han obtenido resultados preliminares de Ribo-seq para dos etapas clave: *mature green*, que es la última etapa antes de la transición al Sistema 2, y *breaker +2*, que representa el pico de producción y respuesta al etileno en el fruto durante la maduración (Brumos, 2021). Los resultados obtenidos confirmaron que la traducción de *SIEBF2* está reprimida entre las etapas de maduración del fruto del tomate *mature green* y *breaker +2* (Figura 8).

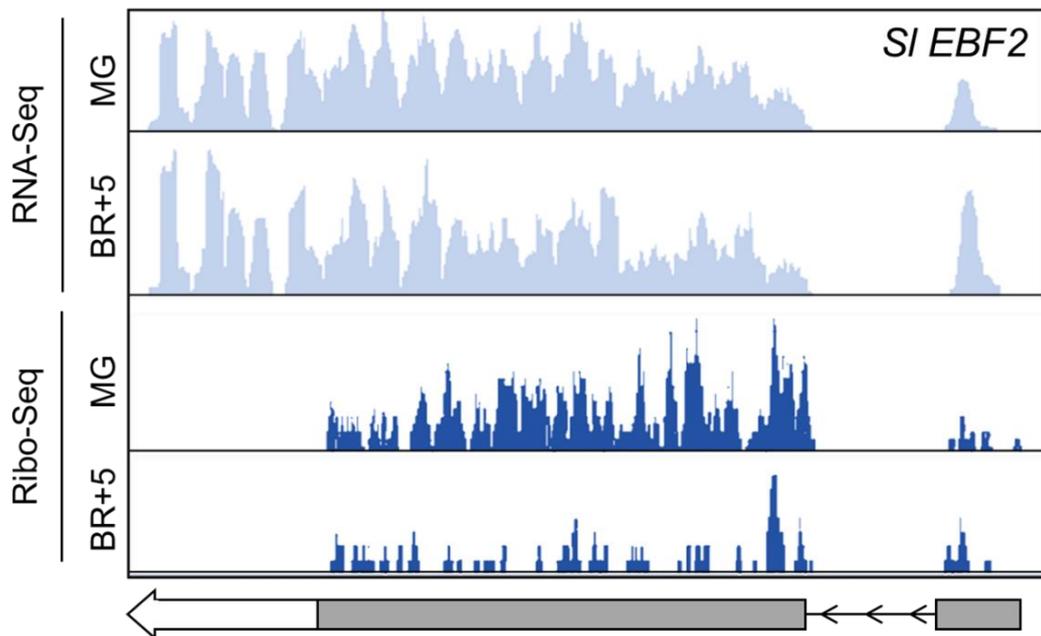


Figura 8. Resultados de RNA-seq y Ribo-seq de *SIEBF2* para los estadios de maduración MG (*Mature Green*) y BR+2 (*Breaker +2 días*). Los niveles de transcripción del gen *SIEBF2* se elevan, pero los niveles de traducción de este transcrito se reprimen en la etapa BR+2 (*Breaker + 2 días*) en comparación con la etapa MG (*Mature Green*).

La región 3'UTR de *EBF2*, como ya se ha mencionado antes, es suficiente para conferir regulación sobre la traducción mediada por etileno (Figura 7). Esta región es susceptible de utilizarse como una herramienta biotecnológica para controlar aspectos específicos durante la maduración del fruto a través de la regulación a nivel traduccional mediada por etileno de genes de interés. Como prueba de concepto, se ha utilizado este mecanismo para retrasar el ablandamiento del fruto. Esto disminuiría las pérdidas postcosecha y el desperdicio.

La enzima PCL (PECTATO LIASA) se ha caracterizado como el principal factor involucrado en el ablandamiento del fruto durante la maduración (Uluisik et al., 2016; L. Yang et al., 2017). Los frutos de las líneas mutantes para esta enzima permanecen firmes y no experimentan grandes cambios en la textura debido a la actividad reducida de esta enzima clave. En el presente trabajo, se ha probado un sistema para controlar el ablandamiento del fruto sin afectar otras características de la fruta. Se ha utilizado la región 3'UTR del gen *EBF2* de *A. thaliana* para la inhibición traduccional en presencia etileno, debido a su capacidad para bloquear la traducción del gen *PCL* mientras los niveles endógenos de etileno en la fruta se mantengan altos durante las etapas *breaker* del Sistema 2.

Para este propósito, se han utilizado líneas de tomate con el gen *PCL* fusionado con la región 3'UTR de *EBF2* (*pPCL:PCL-3'UTR EBF2*) complementando las líneas mutantes *pcl* de la variedad Ailsa Craig (Figura 9). Como control positivo, se han utilizado líneas con el gen *PCL* no modificado con la región 3'UTR nativa (*pPCL:PCL-3'UTR PCL*) complementando líneas mutantes *pcl*. Ambas construcciones estaban ya generadas y se obtuvieron mediante la técnica *recombineering* (Brumos et al., 2020). También se han usado líneas *wild-type* y mutantes *pcl* como controles.

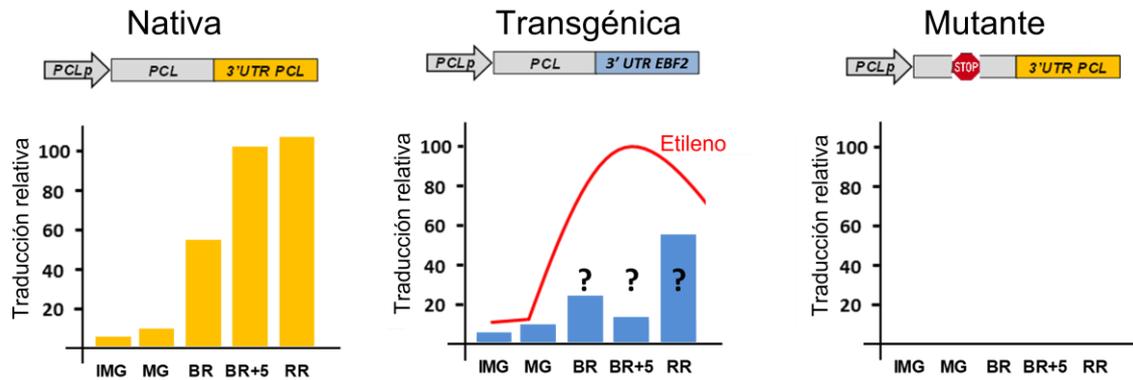


Figura 9. Líneas utilizadas para el estudio de la aplicación biotecnológica de la región 3'UTR de *EBF2* para conferir represión de la traducción mediada por etileno. En las líneas nativas, los niveles de traducción de esta enzima aumentan a partir del estadio MG (*Mature Green*), coincidiendo con la subida del pico de etileno. Las líneas mutantes para esta enzima tienen la expresión anulada. En las líneas con la construcción donde se ha sustituido la región 3'UTR nativa por la de *EBF2* complementando el mutante, es esperable que, coincidiendo con los altos niveles de etileno, la traducción de esta enzima se reduzca y vuelva a aumentar cuando los niveles de etileno bajen. Las gráficas se muestran en unidades arbitrarias de traducción y los símbolos ? representan los niveles esperados de proteína.

Debido al aumento de la biosíntesis de etileno después de la etapa *mature green* y la disminución en la etapa *red ripe* (Figura 3), se espera que los frutos de las líneas con la construcción donde se ha sustituido la región 3'UTR nativa por la región 3'UTR de *EBF2* (*pPCL:PCL-3'UTR EBF2*) complementando el mutante *pcl* permanezcan firmes mientras los niveles endógenos de etileno en el fruto sean altos (Figura 9). Por lo tanto, se espera que, en estas líneas, las altas concentraciones de etileno bloqueen la traducción del transcrito *PCL* durante las primeras etapas del Sistema 2. En contraste, cuando los niveles de etileno disminuyen, en la etapa *red ripe*, se espera que se reanude la traducción del transcrito de *PCL*, provocando un ablandamiento de los frutos.

2 Objetivos

Basado en los datos preliminares mostrados anteriormente, los objetivos de este Trabajo Final de Máster son los siguientes:

1. Identificar nuevos transcritos que interactúen con EIN2 *in vivo*.
2. Emplear los mecanismos conocidos de regulación traduccional como una herramienta biotecnológica.
3. Analizar la conservación del mecanismo molecular por el cual el etileno regula la traducción de *EBF2*.

3 Materiales y métodos

3.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

3.1.1 Material vegetal

Para identificar nuevos transcritos que interactúen con EIN2 *in vivo*, se está utilizando la técnica HyperTRIBE (McMahon et al., 2016) con dos tipos de líneas de *A. thaliana*: líneas control con la construcción *pEIN2:FLAG-ADAR-TNos* sobre el fondo genético del ecotipo de *A. thaliana* Columbia-0 (Col-0) y líneas con la construcción *pEIN2:EIN2-FLAG-ADAR-TNos* sobre el fondo genético de mutantes *ein2-5*. Para ambos tipos de líneas se disponía de semillas de generación transformante T1 y se generaron líneas T2 y T3 homocigotas.

Se utilizaron cuatro tipos de líneas ya generadas de *S. lycopersicum* de la variedad Ailsa Craig para emplear la regulación traduccional como una herramienta biotecnológica. Líneas control *wild-type*, líneas mutantes *pcl*, líneas transgénicas con la construcción *pPCL:PCL-3'UTR PCL* sobre el fondo genético de mutantes *pcl* y líneas transgénicas con la construcción *pPCL:PCL-3'UTR EBF2* sobre el fondo genético de mutantes *pcl*.

En cuanto al material utilizado en el análisis del mecanismo molecular por el cual el etileno regula la traducción de *EBF2*, se utilizaron plantas de *N. benthamiana* y *A. thaliana* (Col-0) para posteriormente ser transformadas con las correspondientes construcciones.

3.1.2 Esterilización y estratificación de las semillas

Las semillas de *A. thaliana* se esterilizaron siguiendo un protocolo donde el agente esterilizante era la lejía comercial. El protocolo consiste en los siguientes pasos. Inicialmente, las semillas se someten durante 15 minutos a un primer paso de esterilización utilizando una solución de lejía al 50% (v/v) con un 0.01% (v/v) de Tritón X-100, este detergente evita que las semillas formen agregados que impidan el buen contacto de las semillas con la solución esterilizante. Tras este paso, las semillas se someten a seis lavados consecutivos con agua desionizada autoclavada para eliminar cualquier resto de lejía. Tras el último lavado, las semillas se dejan en 200 μ L aproximadamente de agua y se almacenan a 4 °C en oscuridad durante un mínimo de tres días para su estratificación.

Para la esterilización de las semillas de tomate se siguió el siguiente protocolo. Primeramente, se separan las semillas del fruto que están unidas a la placenta. Se deja fermentar a temperatura ambiente durante tres días con agitación tres veces por día, para evitar el crecimiento de hongos, hasta que el tejido se degrada y las semillas se pueden separar más fácilmente de la materia mucilaginoso que las envuelve. En este proceso, la combinación de azúcares y levaduras naturalmente presentes es suficiente para empezar la fermentación. Posteriormente, las semillas se someten a un tratamiento de lejía comercial al 10% (v/v) durante 15 minutos. Se añade agua para diluir la lejía y se lavan las semillas con abundante agua con la ayuda de un colador. En este punto, el tejido de alrededor de las semillas debe separarse, quedándonos solo con las semillas. Seguidamente, las semillas se someten a un tratamiento de fosfato trisódico (Na_3PO_4) al 10% (p/v) para eliminar los posibles patógenos presentes en la superficie de las semillas. Por último, las semillas se lavan con abundante agua y se dejan secar dos días antes de ser guardadas.

3.1.3 Condiciones de crecimiento de las plantas

En cuanto a las plantas de *A. thaliana* cultivadas *in vitro*, las semillas previamente esterilizadas y estratificadas se sembraron resuspendidas en agarosa de bajo punto de fusión al 0.7% (p/v) en la superficie de placas de medio AT (MS 4.3 g/L, sacarosa 10 g/L y agar 8 g/L a un pH de 5.7) y se

cerraron con cinta microporada permitiendo la respiración y evitando las posibles contaminaciones.

Para la obtención de las líneas T2 y T3 homocigotas para los constructos *pEIN2:FLAG-ADAR-TNos* y *pEIN2:EIN2-FLAG-ADAR-TNos* a partir de líneas T1, las semillas se sembraron por triplicado en tres tipos de medio AT de forma independiente. Un medio AT a modo de control, un medio AT suplementado con ACC a 10 μM de concentración para identificar las plantas que presentaban la triple respuesta (reducción de la elongación, incremento del desarrollo lateral y el cambio en la orientación del desarrollo, originando hipocótilos más cortos, gruesos y con el gancho plumular cerrado) y un medio AT suplementado con glufosinato de amonio (BASTA®) a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de concentración para la selección de las plantas que posean y expresen el transgén.

Para la obtención de las líneas con las construcciones de diferentes regiones 3'UTR de *EBF2* de diferentes especies, se sembraron por duplicado en medio AT y en medio AT suplementado con el antibiótico kanamicina a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de concentración para identificar las plantas que posean y expresen el transgén.

La germinación se llevó a cabo en condiciones de oscuridad durante 3 días a temperatura ambiente y posteriormente se trasladaron a una cámara de cultivo en condiciones de fotoperiodo de día largo con un régimen de 16 h de luz/8 h de oscuridad ($90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 22 °C de temperatura y una humedad relativa entre el 50% y 70%. Tras 8-10 días, cuando las plantas forman las primeras hojas verdaderas, se trasladan a un sustrato con mezcla 3:1 (v/v) de compost de semillas y vermiculita respectivamente. Primeramente, en condiciones de alta humedad relativa para su mejor adaptación a las condiciones del fitotrón y tras dos días se mantuvieron a 22 °C, humedad relativa entre 50% y 70%, y bajo condiciones de fotoperiodo de día largo con un régimen de 16 h de luz/8 h de oscuridad.

En cuanto a las plantas cultivadas en el invernadero, las semillas de tomate se sembraron a una profundidad de aproximadamente 1 cm en un sustrato con mezcla 3:1 (v/v) de compost de semillas y vermiculita respectivamente, a 22 °C bajo condiciones de fotoperiodo de día largo con un régimen de 16 h de luz / 8 h de oscuridad. Cuando las plantas alcanzaron un tamaño de unos 30 cm aproximadamente, se trasplantaron a macetas de 8 L de capacidad con el mismo sustrato y se situaron en un invernadero de tipo capilla con la temperatura regulada entre 18 y 26 °C, luz complementada con lámparas de sodio y riego localizado.

Las semillas de *N. benthamiana* se sembraron en un sustrato con mezcla 3:1 (v/v) de compost de semillas y vermiculita respectivamente, a 22 °C bajo condiciones de fotoperiodo de día largo con un régimen de 16 h de luz / 8 h de oscuridad.

3.2 Cuantificaciones

3.2.1 Firmeza del fruto

La firmeza del fruto se cuantificó mediante el uso de un texturómetro (TA.XT2i, Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido) configurado con una sonda cilíndrica de 6 mm de diámetro (SMS P/6, ANAME, Madrid, España). Las pruebas se realizaron a una velocidad de compresión de 10 mm/min y 0.6 mm de deformación. Para las mediciones, los tomates se partían por la mitad en el plano coronal y se posicionaban para que la parte externa del tomate contactara con la sonda. Se cuantificaron, al menos, 10 frutos de tomate por estadio de maduración y línea.

3.2.2 Pérdida de agua

Para cuantificar la pérdida de agua y utilizar los datos como una aproximación para cuantificar el ablandamiento se utilizaron tres líneas independientes para cada tipo de línea y, al menos, 8

frutos cosechados de cada línea en la etapa *breaker* +2. Se hicieron mediciones del peso de cada fruto en una báscula de precisión a los días 0, 2, 5, 9, 13, 16, 19, 23, 34 y 42 después de la cosecha y relacionándolas con la etapa de maduración. Se calculó el porcentaje de pérdida de agua cuantificando el peso seco de cada una de las muestras al final del experimento.

3.2.3 Producción de etileno

La producción de etileno se midió en el servicio de metabolómica del IBMCP (UPV-CSIC) utilizando un detector de etileno basado en láser (ETD-300, Sensor Sense B.V., Nijmegen, Países Bajos) acoplado a una caja de control de válvula de gas (VC-6, Sensor Sense B.V., Nijmegen, Países Bajos). La producción de etileno en tiempo real se midió para cada fruto de tomate utilizando el modo de flujo continuo en frascos de vidrio de 100 mL. Se utilizó un frasco vacío como referencia. Las unidades de medida son nL de etileno liberado por hora por gramo de muestra.

3.2.4 Número de ramilletes y altura

Para el número de ramilletes y altura, se utilizaron dos líneas independientes y cinco plantas para cada tipo de líneas transgénicas: mutantes *pcl* complementados con el gen *PCL* seguido de la región 3'UTR nativa y mutantes *pcl* complementados con el gen *PCL* seguido de la región 3'UTR de *EBF2*. Se utilizó una línea y seis plantas para los mutantes *pcl* y *wild-type*. Se realizaron mediciones desde la base del tallo hasta la parte más alta de la planta a los 36 y 69 días después del sembrado. Los ramilletes se contaron a los 36 días después del sembrado.

3.2.5 Análisis estadísticos

Las posibles diferencias significativas entre los distintos tipos de líneas se evaluaron mediante pruebas de análisis de la varianza (ANOVA) de un solo factor. En los casos donde había diferencias significativas, la comparación de las medias entre los diferentes tipos de líneas se realizó utilizando la prueba de la diferencia mínima significativa o método LSD (Least Significant Difference) de Fisher. Para todas las pruebas se estableció un intervalo de confianza del 95%. El análisis estadístico fue realizado utilizando un programa informático de estadística (Statgraphics Centurion XVII, Statgraphics Technologies Inc., VA, EUA).

3.3 Técnicas de biología molecular

3.3.1 Aislamiento de ADN genómico

Para la extracción de ADN genómico de *A. thaliana*, se depositaron 100 μ L de bolas de 1 mm de diámetro en tubos de centrífuga donde también se depositaron aproximadamente 200 mg de tejido joven. El tejido se congeló con nitrógeno líquido para facilitar su triturado en un agitador hasta alcanzar una textura de fino polvo. Se añadió 250 μ L del tampón de extracción CTAB (Tris-HCl 100 mM pH 8, NaCl 1.4 M, CTAB 3% (p/v), EDTA 20 mM y β -mercaptoetanol 2% (v/v)) y se agitó con el vórtex 30 segundos. Posteriormente, se incubó a 65 °C durante 30 minutos. Después, las muestras se enfriaron 1 minuto en hielo y se añadió 250 mL de cloroformo. Se agitaron durante 30 segundos sin vórtex para ser sometidos a una centrifugación a 14000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se transfirió la capa acuosa a nuevos tubos previamente llenados con 250 μ L de isopropanol y se agitaron por inversión 4 veces. Se volvieron a someter a una centrifugación a 14000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Cuidadosamente se descartó el sobrenadante (el DNA estaba precipitado), se añadió etanol 70% para el lavado y se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante por aspiración y se dejó secar el pellet 10 min. Finalmente, los pellets de DNA se resuspendieron en 200 μ L de agua desionizada y se almacenaron a -20 °C hasta su posterior uso.

3.3.2 Amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de los fragmentos de interés a partir del ADN genómico se llevó a cabo mediante el uso de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Varios tipos de PCR fueron efectuadas según el objetivo (Figura 19) y los cebadores utilizados (Tabla 1), teniendo en cuenta que los cebadores que anillan al principio de la región a amplificar tienen en 5' la secuencia CACC para su posterior clonaje en el vector pENTR™ TOPO® (excepto los cebadores usados en las dos primeras reacciones para la generación del fragmento de la región 3'UTR de *EBF2* con la delección de los 90 nucleótidos con el sufijo -mega que tienen regiones solapantes al otro fragmento y los que anillan en la secuencia *M13* y *GFP*).

Tabla 1. Cebadores usados en las reacciones PCR para la amplificación de fragmentos.

Nombre	Secuencia	Descripción
3'EBF2FOR _{gw}	CACCTAAAATCCCACCTTTTCTACAAAACCTTAG	Compatible con pENTR™/D-TOPO® Hibridación al principio de 3'UTR <i>EBF2</i>
3'EBF2REV _{mega}	GGCAGATACATAACACACAAGAAGTTACACCGCCATTGC	Mega cebador para delección
3'EBF2FOR _{mega}	GCAATGGCGGTGTAACCTTCTGTGTGTATGTATCTGCC	Mega cebador para delección
3'EBF2Rev	CACAACAAAATGATCCAATTATGTAAGGATC	Hibridación al final de 3'UTR <i>EBF2</i>
1xFOR3'EBF2	CACCTAATCTTCCACTGTAGAGCTTTTGG	Compatible con pENTR™/D-TOPO® Hibridación al principio de los 107 nt
1xREV3'EBF2	CTTTTGGCAGATACATAACACACA	Hibridación al final de los 107 nt
M13FOR	GTAACGACGACGCCAG	Hibridación en el vector de entrada
GFPFOR	CCACTACCTGAGCACCCAGT	Hibridación en el vector de destino

Todas ellas se realizaron utilizando la polimerasa Phusion High-Fidelity DNA Polymerase® (Thermo Scientific™) siguiendo las instrucciones del fabricante con alguna modificación: 30 segundos iniciales a 98 °C, seguido de 40 ciclos de 5 segundos a 98 °C, 10 segundos a 56 °C y 30 segundos a 72 °C, y 10 minutos finales a 72 °C. Los componentes de la reacción utilizados para un volumen total de 10 µL fueron: 1 µL DNA genómico (100 ng/µL), 2 µL de tampón 5X Phusion™ HF Buffer, 2 µL de NTPs a concentración 2 mM, 0.5 µL de los cebadores a concentración 20 µM, 0.5 µL de Phusion™ DNA Polymerase y 3.5 µL de agua; con la excepción de la PCR para unir los dos fragmentos para generar la delección, donde se utilizó el producto de PCR de las otras dos reacciones como ADN molde.

Los productos de las reacciones PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio en tampón TAE 1X (Tris 0.40 M, acetato 0.19 M y EDTA 1 mM a pH 7.5). Para su carga en el gel, las muestras se mezclaron con tampón de carga 6x TriTrack DNA Loading Dye (Thermo Scientific™) según el fabricante. Las electroforesis se realizaron a un voltaje constante de 100 V.

3.3.3 Generación de construcciones

Todos los vectores se generaron con los sistemas pENTR™/D-TOPO® y Gateway® (Invitrogen™) mediante kits comerciales. Este método de clonaje se basa en la utilización de topoisomerasas y recombinasas que permiten la inserción y transferencia entre vectores de secuencias de ADN flanqueadas con secuencias de reconocimiento determinadas. La topoisomerasa reconoce las secuencias CACC del producto de PCR y la secuencia saliente GTGC en el vector de entrada (pENTR™ TOPO®). La recombinasa reconoce los sitios *att*, y en nuestro caso solo la utilizamos para que reconociera los sitios *attL* del vector de entrada y los sitios *attR* del de vector destino pGWB6 (Nakagawa et al., 2007) para obtener el vector de expresión. En este vector, las secuencias de interés se insertarán justo detrás de la secuencia de la proteína *GFP* bajo el promotor constitutivo 35S.

En un primer paso, los productos de PCR con las secuencias que reconoce la topoisomerasa se insertaron en el vector de entrada mediante una reacción TOPO® utilizando el kit pENTR™/D-TOPO® Cloning (Invitrogen™). Esta reacción se llevó a cabo en un volumen total de 6 µL de reacción conteniendo 2.4 µL de producto de PCR, 0.8 µL de la solución de sales, 0.8 µL de TOPO® vector y 2 µL de agua. Se incubó durante 1 día a temperatura ambiente siguiendo el protocolo y recomendaciones de la casa comercial.

En un segundo paso, la transferencia de las secuencias de interés desde los vectores de entrada al vector destino se llevaron a cabo mediante reacciones Gateway® tipo LR, mediante el kit LR clonase II® (Invitrogen™) para obtener el vector de expresión. Esta reacción se llevó a cabo en un volumen total de 2.5 µL de reacción conteniendo 0.1 µL del vector de entrada con el inserto, 0.5 µL del vector pGWB6 (150 ng/ µL), 1.4 µL del tampón TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM a pH 8.0) y 0.5 µL de 5X LR Clonase™ Reaction Buffer. Se incubó durante 1 día a temperatura ambiente siguiendo el protocolo y recomendaciones de la casa comercial.

Las construcciones de la región 3'UTR de *EBF2* de *A. thaliana*, *Setaria viridis*, *S. lycopersicum* y *Zea mays* ya se disponían en el vector destino pGWB6 (Nakagawa et al., 2007) con anterioridad en el laboratorio. Los pasos anteriores se realizaron para la región de 107 nucleótidos que contiene la región de 90 nucleótidos de interés y la región 3' UTR de *EBF2* con la delección de los 90 nucleótidos.

3.3.4 Transformación de *Escherichia coli*

Para la amplificación de plásmidos, la transformación de bacterias *E.coli* con los vectores de entrada se hizo mediante transformación química debido a la alta concentración de sales en la reacción TOPO® que impiden su electroporación. Primeramente, se añadió 2 µL de las reacciones TOPO® a un vial de células *E. coli* competentes químicamente One Shot® (Invitrogen™) y se agitaron suavemente. Después se incubaron en hielo durante 5-30 minutos, para ser sometidas a un choque térmico durante 30 segundos a 42°C sin agitar. Después, se añadió 1 mL de medio LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y NaCl 10 g/L). Para finalizar, se plaquearon en placas LB sólido con 1.5% (p/v) de agar suplementadas con los antibióticos kanamicina (50 µg/mL) e higromicina (50 µg/mL) para la selección y se incubaron a 37 °C durante un día.

La transformación de bacterias *E.coli* con los vectores de expresión se hizo mediante electroporación con la cepa TOP 10. Para ello, se introdujo 1 µL del vector de expresión en los viales que contenían 50 µL de TOP 10 competentes previamente descongelados. Todo este volumen se introdujo en las cubetas de electroporación y se le dio un pulso a 1500 V usando un electroporador (Electro Cell Manipulator™ ECM 399, BTX® Harvard Apparatus, MA, EUA). En las propias cubetas se introdujeron 500 µL de LB y se pipeteó todo el medio posible a nuevos tubos para dejar recuperar las células en la cámara de 37 °C durante una hora en agitación. Después se sembraron en placas de medio LB con 1.5 % (p/v) de agar con los antibióticos kanamicina (50 µg/mL) e higromicina (50 µg/mL) y se incubaron a 37 °C durante un día.

3.3.5 Purificación y comprobación de plásmidos

Para las extracciones de plásmidos, se picaron las colonias deseadas y se inocularon en tubos que contenían 4 mL de LB líquido con los antibióticos. Se incubaron a 37 °C durante un día en agitación. El kit comercial utilizado para la purificación de plásmidos fue el E.Z.N.A® Plasmid DNA Mini Kit I (Omega Bio-tek™) y se realizó siguiendo el protocolo facilitado por el fabricante.

La confirmación de la correcta inserción del inserto en el vector de entrada se realizó mediante reacciones PCR con cebadores que anillan en las secuencias *M13* de este vector y cebadores que

anillan en el inserto en concreto (Tabla 1). Para un volumen total de 20 μL de reacción, se utilizaron 2 μL del tampón MyTaq™ Mix (Ecogen™), 5 μL del tampón GoTaq® Green Master Mix (Promega™) con la enzima, 1.6 μL de los cebadores a concentración 20 μM , 2 μL de la extracción de plásmido y 7.8 μL de agua. Las condiciones del termociclador fueron: 2 minutos iniciales a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 54 °C y 1 minuto a 72 °C, y 10 minutos finales a 72 °C. Los productos de las reacciones PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) con 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de bromuro de etidio en tampón TAE 1X. Las electroforesis se realizaron a un voltaje constante de 100 V. También se realizaron secuenciaciones por el método Sanger en el servicio de secuenciación del IBMCP para comprobar que la secuencia del inserto era correcta. Se trataron 5 μL de los productos de las reacciones PCR anteriores con 0.5 μL del limpiador de PCR ExoSAP-IT™ (Applied Biosystems™), 0.5 μL de agua y se sometieron a un programa de 30 minutos a 37 °C y 15 minutos a 80 °C. Se mezclaron 2 μL del producto del tratamiento anterior con 8 μL de agua con los cebadores (Tabla 1) para una concentración final del plásmido de 200 ng/ μL . El análisis de las secuencias y alineamientos se realizaron con el programa Benchling (<https://www.benchling.com/>) y el algoritmo MAFFT.

La confirmación de la correcta transferencia del inserto del vector de entrada al vector destino también se realizó mediante reacciones PCR con cebadores que anillan en la secuencia *GFP* de este vector y cebadores que anillan en el inserto (Tabla 1). Para un volumen total de 20 μL de reacción, se utilizaron 2 μL del tampón MyTaq™ Mix (Ecogen™), 5 μL del tampón GoTaq® Green Master Mix (Promega™) con la enzima, 1.6 μL de los cebadores a concentración 20 μM , 2 μL de la extracción de plásmido y 7.8 μL de agua. Las condiciones del termociclador fueron: 2 minutos iniciales a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 54 °C y 1 minuto a 72 °C, y 10 minutos finales a 72 °C. Los productos de las reacciones PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) con 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de bromuro de etidio en tampón TAE 1X. Las electroforesis se realizaron a un voltaje constante de 100 V.

3.3.6 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Para las transformaciones de bacterias *A. tumefaciens* se utilizó la cepa C58. Para la electroporación, se utilizó 1 μL del vector de expresión correspondiente en viales que contenían 50 μL de bacterias competentes previamente descongelados. Todo este volumen se introdujo en las cubetas de electroporación y se le dio un pulso a 1440 V usando un electroporador (Electro Cell Manipulator™ ECM 399, BTX® Harvard Apparatus, MA, EUA). En las propias cubetas se introdujeron 500 μL de LB líquido y se traspasó todo el líquido posible a un nuevo tubo para dejar recuperar las células en la cámara de 28 °C en agitación. Después se sembraron en placas de medio LB con 1.5 % (p/v) de agar y los antibióticos kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e higromicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para ser incubadas a 28 °C durante un día.

La confirmación de que las colonias eran portadoras del vector de expresión se realizó mediante reacciones PCR con cebadores (Tabla 1) que anillan en la secuencia *GFP* de este vector y cebadores que anillan en el inserto en concreto. Se resuspendieron parte de las colonias en 20 μL de agua que posteriormente se utilizarían para las reacciones PCR. Para un volumen total de 20 μL de reacción, se utilizaron 2 μL del tampón MyTaq™ Mix (Ecogen™), 5 μL del tampón GoTaq® Green Master Mix (Promega™) con la enzima, 1.6 μL de los cebadores a concentración 20 μM , 2 μL de las colonias resuspendidas y 7.8 μL de agua. Las condiciones del termociclador fueron: 5 minutos iniciales a 98 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 54 °C y 1 minuto a 72 °C, y 10 minutos finales a 72 °C. Los productos de las reacciones PCR se separaron

mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio en tampón TAE 1X. Las electroforesis se realizaron a un voltaje constante de 100 V.

3.3.7 Transformación de *A. thaliana* y *N. benthamiana*

La transformación de *A. thaliana* se realizó según el siguiente protocolo de inmersión floral. Se incubaron 500 mL de colonias independientes de *A.thumefaciens* con kanamicina (50 µg/mL) conteniendo la construcción deseada a 28 °C durante dos días en agitación. Se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min. Seguidamente, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 250 mL de solución de transformación (glucosa 5% (p/v) y Silwet L-77 200 µL/L). Por último, se sumergió la parte aérea de las plantas en floración en esta solución durante 30 segundos aproximadamente.

La transformación transitoria de hojas de *N. benthamiana* se realizó según el siguiente protocolo. Se incubaron 20 mL de colonias independientes de *A.thumefaciens* con kanamicina (50 µg/mL) conteniendo la construcción deseada a 28 °C durante dos días en agitación. Se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 min. Seguidamente, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 50 mL de agua para lavarlas. Posteriormente, se volvieron a centrifugar a 4000 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 2 mL de solución de transformación (MgCl₂ 10 M, MES 10 mM, acetosiringona 200 µM). Se diluyeron las bacterias a una OD₆₀₀ de 0.4 en 10 mL de la solución de transformación. Para prevenir el silenciamiento y mejorar la eficiencia, una cepa de *A.thumefaciens* que contiene la proteína p19 fue incluida a una OD₆₀₀ de 0.2. Las soluciones finales con las bacterias se incubaron a temperatura ambiente durante 3 horas antes de la infiltración de la parte abaxial de las hojas con ayuda de una jeringuilla sin aguja (Wang y Balint-Kurti, 2015).

3.3.8 Aislamiento de ARN total

La extracción de ARN total de plántulas de *A. thaliana* se realizó con el kit de extracción de ARN NucleoSpin™ RNA Plant Kit (Macherey-Nagel™) según las indicaciones del fabricante. Durante la extracción se realizó una digestión de ADN mediante la DNasa proporcionada por el fabricante.

3.4 Tratamiento con etileno en hojas de *N. benthamiana*

Las hojas de *N. benthamiana* agroinyectadas con las construcciones de interés fueron pulverizadas con una solución de ACC a 10 µM y Silwet L-77 a concentración 200 µL/L. Transcurridas 3 horas, se recolectaron las hojas.

3.5 Visualización al microscopio

Fragmentos de las hojas de *N. benthamiana* fueron montados sobre un portaobjetos y cubiertos con un cubreobjetos, se visualizaron y se tomaron fotos utilizando el microscopio de fluorescencia (Leica DM5000 B, Leica® Microsystems AG, Wetzlar, Alemania) con el filtro para GFP, utilizando el programa del microscopio (Leica Application Suite LAS V4.8, Leica® Microsystems AG, Wetzlar, Alemania).

4 Resultados

4.1 Generación de líneas para identificar nuevos transcritos que interactúen con EIN2 *in vivo* utilizando HyperTRIBE

La identificación de nuevos transcritos que interactúen con EIN2 es uno de los objetivos de este trabajo. Para ello, se está utilizando la técnica HyperTRIBE (Targets of RNA-binding proteins Identified By Editing). Esta técnica está basada en la capacidad de la enzima ADAR (ADENOSINE DEAMINASE ACTING ON RNA) de asociarse a ARN y catalizar el cambio de adenosina a inosina por proximidad. La técnica consiste en la expresión de una construcción traduccional de proteína de fusión compuesta por la proteína de unión a ARN objeto de estudio y el dominio catalítico de edición de ARN de la versión mutante hiperactiva de la enzima ADAR, que cataliza eficientemente la edición de adenosina a inosina en los transcritos que se asocian a la proteína objeto de estudio *in vivo*. Mediante RNA-seq tradicional, los transcritos que se asocian específicamente a la proteína de unión a ARN se pueden identificar fácilmente. Estos transcritos que contienen inosinas editadas (secuenciadas como guaninas) se identifican simplemente comparando las secuencias editadas con las secuencias control sin necesidad de ningún paso de entrecruzamiento o inmunoprecipitación (Rahman et al., 2018; Xu et al., 2018). Esta técnica ya ha sido adaptada y utilizada en *A.thaliana* anteriormente con resultados satisfactorios para la identificación de transcritos que se asocian a proteínas de unión a ARN concretas (Arribas-Hernández, Rennie, Köster, et al., 2021; Arribas-Hernández, Rennie, Schon, et al., 2021; Rennie et al., 2021).

De forma natural en las plantas, en ausencia de etileno, EIN2 permanece en la membrana del retículo endoplasmático y la vía de señalización del etileno se mantiene apagada. En presencia de etileno, EIN2 se escinde y el extremo C-terminal de EIN2 se asocia con la región 3'UTR del transcrito *EBF2*, impidiendo así su traducción (Figura 5). Mediante HyperTRIBE, con la expresión de EIN2 fusionada al dominio catalítico de ADAR, se está tratando de identificar transcritos que se asocian con EIN2 y, de esta forma, vean regulada su traducción y localización subcelular por EIN2 y la presencia de etileno (Figura 10). En ausencia de etileno, EIN2 con ADAR fusionada se mantiene en la membrana del retículo endoplasmático y la vía de señalización del etileno se mantiene apagada. En estas condiciones, el transcrito de *EBF2* se traduce y la proteína provoca la degradación de los factores de transcripción EIN3/EIL1 en el núcleo. En presencia de etileno, el extremo C-terminal de EIN2 con ADAR fusionada se escindiría y se uniría a la región 3'UTR de *EBF2* provocando dichas mutaciones en este transcrito (control interno) e impidiendo su traducción. Pero más importante, EIN2 se puede asociar a otros transcritos desconocidos y provocar mutaciones en ellos. Mediante la secuenciación del transcriptoma, se pueden detectar estas mutaciones e identificar así nuevos transcritos que se asocian a EIN2.

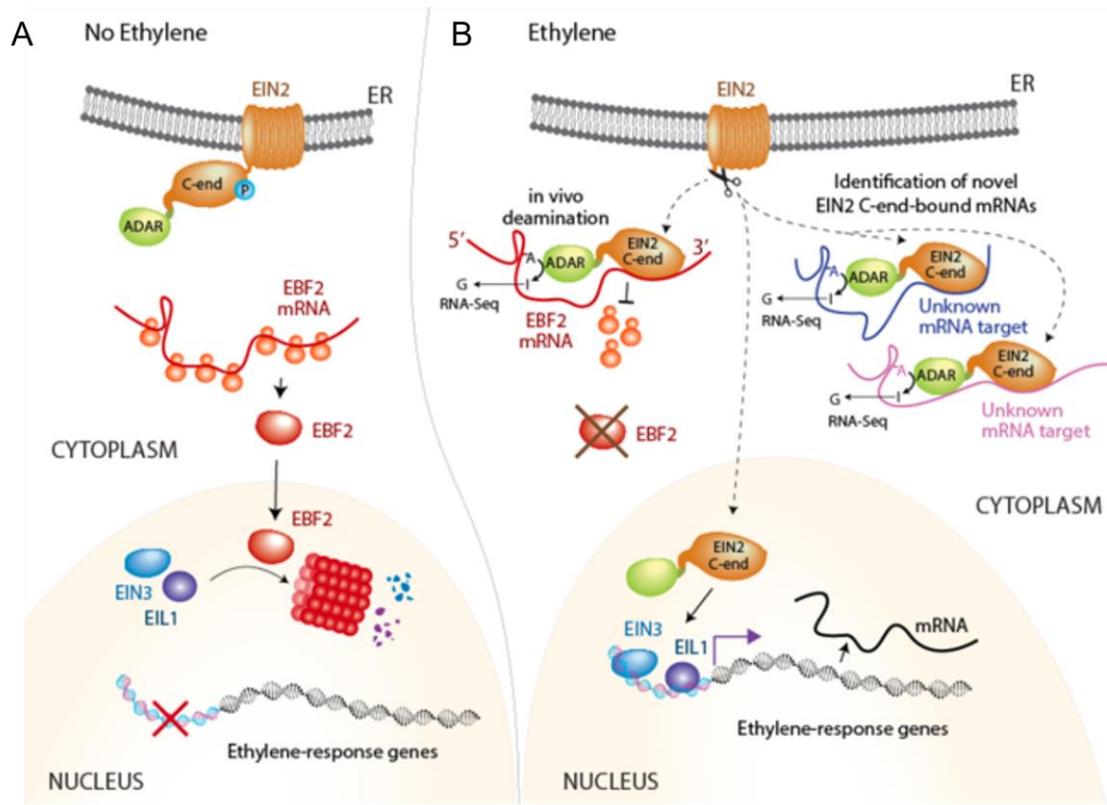


Figura 10. Empleo de HyperTRIBE para identificar transcritos cuya traducción es regulada por el etileno. (A) En ausencia de etileno, EIN2 permanece en el retículo endoplásmico (ER). El transcrito de *EBF2* es traducido y la proteína EBF2 producida se desplaza al núcleo, dirigiendo la degradación por el proteasoma de EIN3/EIL1, lo que impide la transcripción de genes de respuesta al etileno. (B) En presencia de etileno, el extremo C-terminal de EIN2 se separa y se desplaza al núcleo, donde promueve la actividad de EIN3/EIL1. En el citoplasma, el extremo C-terminal de EIN2 se une a la región 3'UTR del transcrito de *EBF2*, inhibiendo su traducción. EIN3/EIL1 se estabilizan y se activa la transcripción de genes de respuesta al etileno. Al fusionar al extremo C-terminal de *EIN2* el dominio catalítico de la enzima de edición de ARN ADAR, los transcritos que se asocian al extremo C-terminal de EIN2 se desaminarán *in vivo*. Mediante secuenciación se identificarán los transcritos de *EBF2* (control interno) y también otros transcritos que se asocian a el extremo C-terminal de EIN2.

Para este propósito, se han generado dos tipos de líneas que se encuentran en la generación transformante T2 y T3, habiendo sido identificados individuos homocigotos para el transgén (Figura 11). El primer tipo de línea generada corresponde a plantas de *A. thaliana* que llevan una construcción con el gen *EIN2* fusionado a *ADAR* bajo la regulación del promotor de *EIN2* complementando el mutante *ein2-5* (*pEIN2:EIN2-FLAG-ADAR-TNos*). El segundo tipo, corresponde a plantas de *A. thaliana* que llevan la construcción *ADAR* bajo el promotor de *EIN2* con el fondo genético de Col-0 (*pEIN2:FLAG-ADAR-TNos*) a modo de control. Las líneas se han seleccionado según la resistencia a un marcador de selección y a la complementación del mutante *ein2-5* mediante el fenotipo característico de respuesta a etileno conocido como triple respuesta (reducción de la elongación, incremento del desarrollo lateral y el cambio en la orientación del desarrollo, originando hipocótilos más cortos, gruesos y con el gancho plumular cerrado). Se han seleccionado líneas homocigotas para estas dos construcciones.

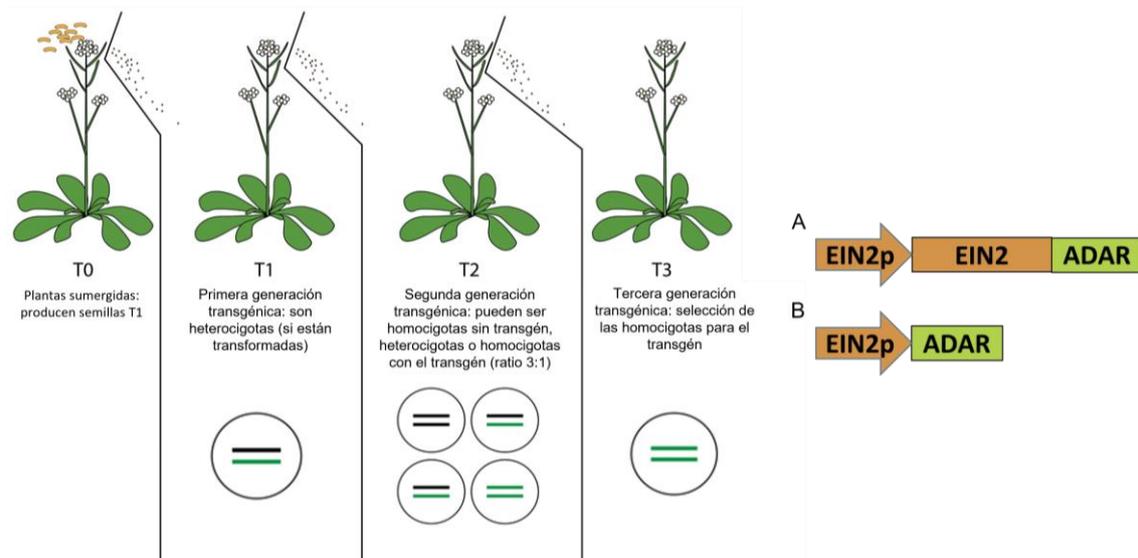


Figura 11. Generación de líneas y construcciones utilizadas en la técnica HyperTRIBE. Se disponía de semillas de generación transformante T1 y se generaron líneas T2 y T3 homocigotas para las construcciones: **(A)** *EIN2* fusionado a *ADAR* bajo el promotor de *EIN2* complementando el mutante *ein2-5* y **(B)** *ADAR* bajo el promotor de *EIN2* con el fondo genético de Col-0 a modo de control. Las semillas se sembraron por triplicado en tres tipos de medio AT de forma independiente. Un medio AT a modo de control, un medio AT suplementado con ACC a 10 μ M de concentración para identificar las plantas que presentaban la triple respuesta y un medio AT suplementado con glufosinato de amonio a 20 μ g/mL de concentración para la selección de las plantas que posean y expresen el transgén.

Cinco líneas independientes de cada tipo de construcción se han sometido a las dos condiciones, etileno y aire. Actualmente estamos purificando ARN para formar un total de 20 librerías para su futura secuenciación.

4.2 Retraso en el ablandamiento del fruto usando la región 3'UTR de *EBF2*

El ablandamiento del fruto, como se ha indicado en la introducción, es responsable de una parte importante en las pérdidas postcosecha y su retraso ayudaría a aumentar la disponibilidad de alimento. El retraso en el ablandamiento del fruto mediante el uso de la región 3'UTR de *EBF2*, aprovechando los niveles endógenos de etileno durante el proceso de maduración, ha sido uno de los objetivos de este trabajo para retrasar el ablandamiento del fruto sin afectar a otros aspectos.

Se realizaron mediciones de la firmeza mediante el uso de un texturómetro en las diferentes etapas de maduración del fruto para los cuatro tipos de líneas: las líneas *wild-type*, las líneas mutantes *pcl*, las líneas complementando al mutante con el gen nativo *PCL* y las líneas con la construcción donde la región 3'UTR nativa es reemplazada por la región 3'UTR de *EBF2* (Figura 12). El uso de las líneas *wild-type* y las complementadas con el gen nativo *PCL* (como controles positivos), y las líneas mutantes *pcl* (como control negativo) sirven como referencia para establecer los valores máximos y mínimos en las cuantificaciones de firmeza.

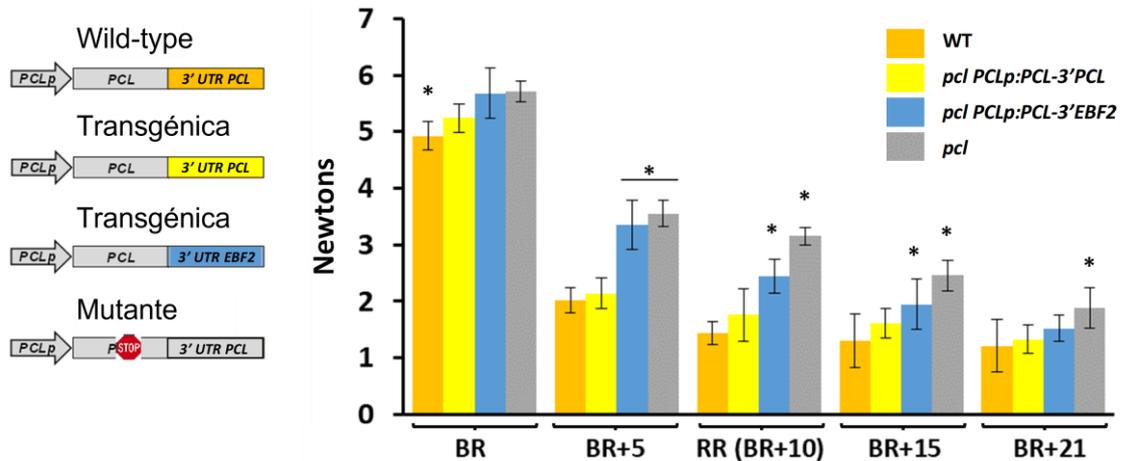


Figura 12. Cuantificación de firmeza del fruto mediante texturómetro. Se muestran los resultados de la firmeza de los frutos en newtons (eje y) para las líneas *wild-type*, las líneas mutantes *pcl*, las líneas complementando al mutante con el gen nativo *PCL* y las líneas con la construcción donde la región 3'UTR nativa es reemplazada por la región 3'UTR de *EBF2*. Las etapas de maduración (eje x) mostradas son: BR (*Breaker*), BR +5 (*Breaker* +5 días), RR o BR +10 (*Red Ripe* o *Breaker* +10 días), BR +15 (*Breaker* +15 días) y BR +21 (*Breaker* +21 días). Se indican las barras de error típico y los símbolos * marcan las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Para las líneas *wild-type* y mutantes *pcl* se observa que la firmeza va disminuyendo a medida que avanzan los estadios de maduración del fruto (Figura 12), relacionado con el aumento en los niveles de etileno (Figura 3). Las líneas mutantes *pcl* siempre presentan más firmeza que las líneas *wild-type*. Esto último es debido a que las mutantes no expresan la enzima PCL, principal responsable del ablandamiento del fruto. Las líneas mutantes complementadas con la región 3'UTR nativa muestran una evolución de su firmeza similar a la firmeza de las líneas *wild-type* y las líneas mutantes complementadas con la región 3'UTR de *EBF2*, coincidiendo con el aumento de etileno en las etapas *breaker*, muestran más firmeza respecto a las *wild-type* y las transgénicas con la construcción nativa. Cuando el etileno disminuye en las etapas de maduración más avanzadas, la firmeza se iguala. Como se esperaba, los frutos que contienen la construcción *pPCL:PCL-3'EBF2* permanecen firmes durante más tiempo y muestran un ablandamiento retardado en comparación con los frutos *wild-type* o los mutantes complementados con la construcción que posee la región 3'UTR nativa.

4.3 La pérdida de agua como aproximación no destructiva para cuantificar ablandamiento

Las técnicas de medición de la firmeza del fruto mediante el uso de texturómetros, penetrómetros o instrumentos similares tienen la principal desventaja de que son técnicas de cuantificación destructivas. Solo se puede llevar a cabo una medición por muestra y no permiten monitorizar la pérdida de firmeza de un mismo fruto a lo largo del proceso de maduración. Por estas razones, hemos buscado métodos alternativos para cuantificar la pérdida de firmeza de los frutos. La pérdida de agua se ha evaluado como una aproximación para la cuantificación del ablandamiento (Figura 13). Se caracterizó la pérdida de agua para los cuatro tipos de líneas que previamente se habían utilizado para la caracterización de la firmeza mediante el uso del texturómetro: las líneas *wild-type*, las líneas mutantes *pcl*, las líneas complementando al mutante con el gen nativo *PCL* y las líneas con la construcción donde la región 3'UTR nativa es reemplazada por la región 3'UTR de *EBF2*.

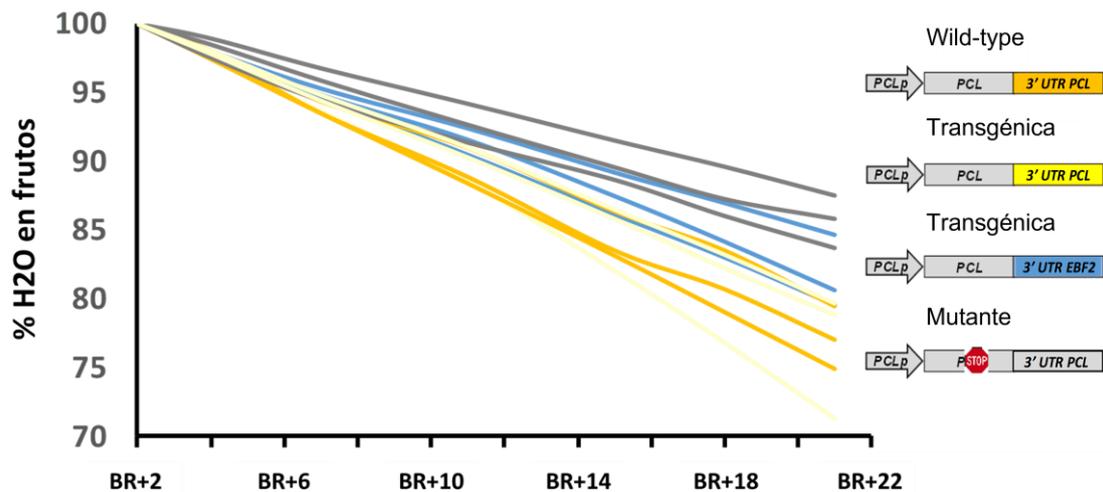


Figura 13. Cuantificación de la pérdida de agua del fruto. Se muestran los resultados de la pérdida de agua de los frutos en porcentaje (eje y) para las líneas *wild-type*, las líneas mutantes *pcl*, las líneas complementando al mutante con el gen nativo *PCL* y las líneas con la construcción donde la región 3'UTR nativa es reemplazada por la región 3'UTR de *EBF2*. Las etapas de maduración (eje x) mostradas son: BR +2 (*Breaker* +2 días), BR +6 (*Breaker* +6 días), BR +10 (*Breaker* +10 días), BR+14 (*Breaker* +14 días), BR+18 (*Breaker* +18 días) y BR +22 (*Breaker* +22 días). Se utilizaron tres líneas independientes para cada tipo de línea y, al menos, 8 frutos cosechados de cada línea en la etapa BR +2 (*Breaker* +2).

Todas las líneas evaluadas pierden agua a lo largo del proceso de maduración del fruto, pero hay diferencias observables entre líneas, indicativo de que pierden agua de forma diferente. La pérdida de agua está relacionada con la pérdida de firmeza, cuando esta es mayor, más firmeza se pierde. Las líneas mutantes y las líneas transgénicas con la región 3'UTR de *EBF2* pierden agua más despacio que las líneas *wild-type* y las líneas transgénicas con el gen nativo *PCL*. Las líneas mutantes son las que pierden agua a un menor ritmo, seguidas de la línea transgénica con la región 3'UTR de *EBF2*.

4.4 Estudio de la producción de etileno de las líneas mutantes *pcl* complementadas con la región 3'UTR de *EBF2*

Un aspecto importante es demostrar que en estas líneas solo se ve afectada la firmeza y no hay cambios con el etileno producido, indicativo de que es el propio etileno el que está retrasando el ablandamiento del fruto. Se realizaron mediciones del etileno producido (Figura 14) por tomates de las líneas anteriormente mencionadas: las líneas *wild-type*, las líneas mutantes *pcl*, las líneas complementando al mutante con el gen nativo *PCL* y las líneas con la construcción donde la región 3'UTR nativa es reemplazada por la región 3'UTR de *EBF2*.

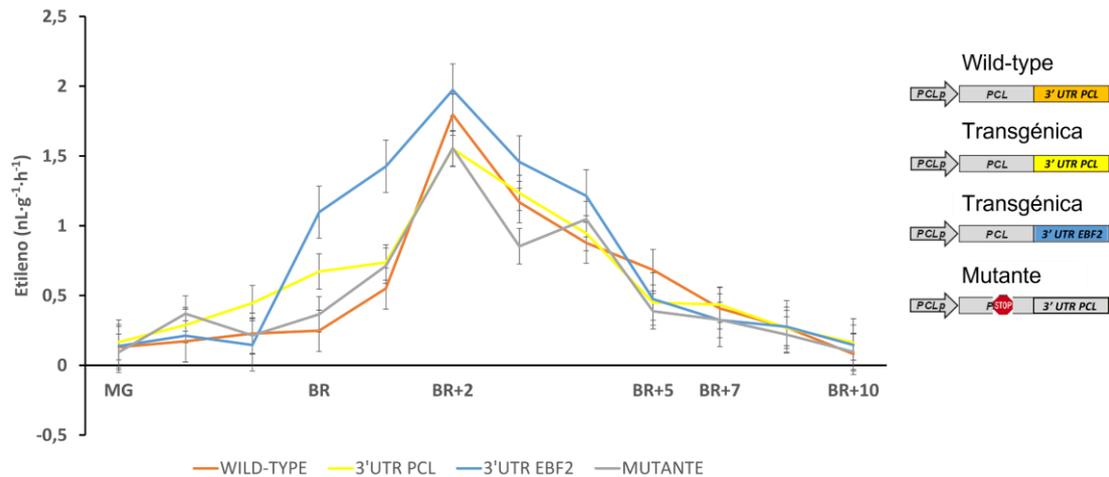


Figura 14. Producción de etileno de los frutos. Se muestran los resultados de la producción de etileno de los frutos en nL de etileno liberado por hora por gramo de muestra (eje y) para las líneas *wild-type*, las líneas mutantes *pcl*, las líneas complementando al mutante con el gen nativo *PCL* y las líneas con la construcción donde la región 3'UTR nativa es reemplazada por la región 3'UTR de *EBF2*. Las etapas de maduración (eje x) mostradas son: MG (*Mature Green*), BR (*Breaker*), BR +2 (*Breaker* +2 días), BR +5 (*Breaker* +5 días), BR +7 (*Breaker* +7 días) y BR +10 (*Breaker* +10 días). Se indican las barras de error típico.

La producción de etileno sigue el mismo patrón (Figura 3) en todas las líneas. Al inicio de la maduración, en la etapa *mature green*, se observa un aumento repentino en la producción de etileno, presentando los máximos de producción en las etapas *breaker*. En las etapas posteriores se aprecia la disminución en la producción de etileno. Esto sugiere que las líneas utilizadas en este estudio no presentan ningún tipo de alteración en la producción de etileno a lo largo de la maduración y que las diferencias observadas en los valores de firmeza pueden ser directamente atribuidas a los niveles de la enzima PCL.

4.5 Estudio de cambios morfológicos en las líneas mutantes *pcl* complementadas con la región 3'UTR de *EBF2*

Al igual que en el apartado anterior, sobre la producción de etileno, es importante demostrar que en estas líneas solo se ve afectada la firmeza y no hay cambios morfológicos. Se realizaron mediciones (Figura 15) en las plantas del número de ramilletes a los 36 días y de la altura a los 36 y 69 días de las líneas anteriormente mencionadas: las líneas *wild-type*, las líneas mutantes *pcl*, las líneas complementando al mutante con el gen nativo *PCL* y las líneas con la construcción donde la región 3'UTR nativa es reemplazada por la región 3'UTR de *EBF2*.

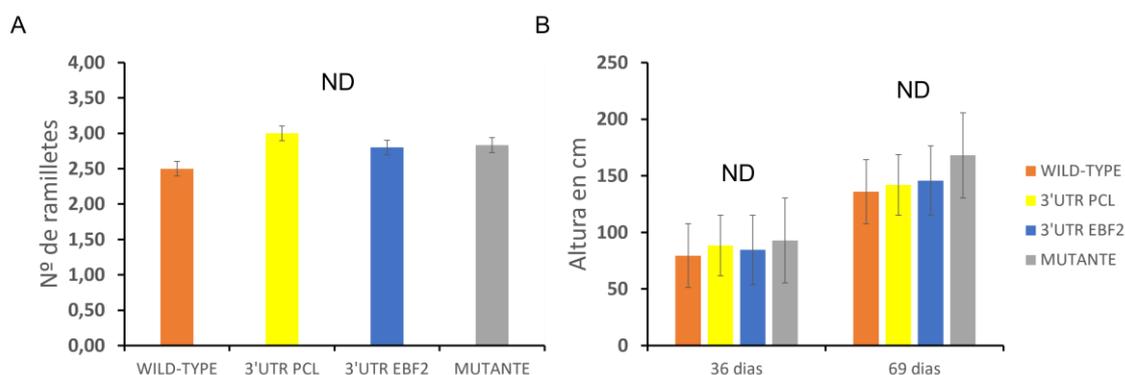


Figura 15. Número de ramilletes y altura de las plantas. (A) Se muestra número de ramilletes a los 36 días (eje y) para los diferentes tipos de líneas (eje x). (B) Se muestra la altura en centímetros (eje y) a los 36 y 69 días para los diferentes tipos de líneas (eje x). En ambos gráficos, los tipos de líneas analizados son: líneas *wild type*, líneas mutantes *pcl*, líneas complementando al mutante con el gen nativo *PCL* y líneas con la construcción donde la región 3'UTR nativa es reemplazada por la región 3'UTR de *EBF2*. Se indican las barras de error típico y los símbolos ND marcan que no hay diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Al igual que en la producción de etileno, tampoco se observan diferencias a nivel morfológico de la planta. Todas las líneas únicamente presentan una pequeña variación en el número de ramilletes a los 36 días y, del mismo modo, una pequeña variación en la altura tanto a los 36 como a los 69 días. Para los dos caracteres, no hay diferencias significativas entre líneas.

4.6 Análisis de la conservación del mecanismo molecular por el cual el etileno regula la traducción de *EBF2*

En concordancia con lo mencionado en apartados anteriores para control de la traducción de *EBF2*, se conoce que la región 3'UTR de *EBF2* de *A. thaliana* y *S. lycopersicum* es suficiente para conferir regulación mediada por etileno a un gen reportero expresado constitutivamente en plantas de *A. thaliana*, tomate y ensayos de expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana* (Figura 7). Estos resultados sugieren una conservación funcional en la regulación traduccional conferida por la región 3'UTR de *EBF2* en respuesta al etileno en dicotiledóneas. Se realizaron análisis filogenéticos (Huerta-Cepas et al., 2016; L. Yang et al., 2017) y se confirmó la presencia y evolución de esta familia de proteínas F-box en plantas angiospermas, lo que sugiere que la regulación traduccional de los *EBFs* de la vía de señalización del etileno está conservada (Binder et al., 2007; Wang et al., 2002).

Para probar esta hipótesis, se utilizaron las regiones 3'UTR del gen *EBF2* de diferentes grupos de plantas con flores para confirmar la conservación funcional del mecanismo de regulación de la traducción conferido por estos elementos en respuesta al etileno (Figura 16): brásicas (*A. thaliana*) y solanáceas (*S. lycopersicum*), que ya han sido mostradas antes (Figura 7), y monocotiledóneas (*S. viridis* y *Z. mays*). Se generaron construcciones reporteras (Figura 16) para monocotiledóneas modelo como *S. viridis* (Sv) y *Zea Mays* (Zm), *p35S:GFP-stop-3'UTR SvEBF2* y *p35S:GFP-stop-3'UTR ZmEBF2* respectivamente.

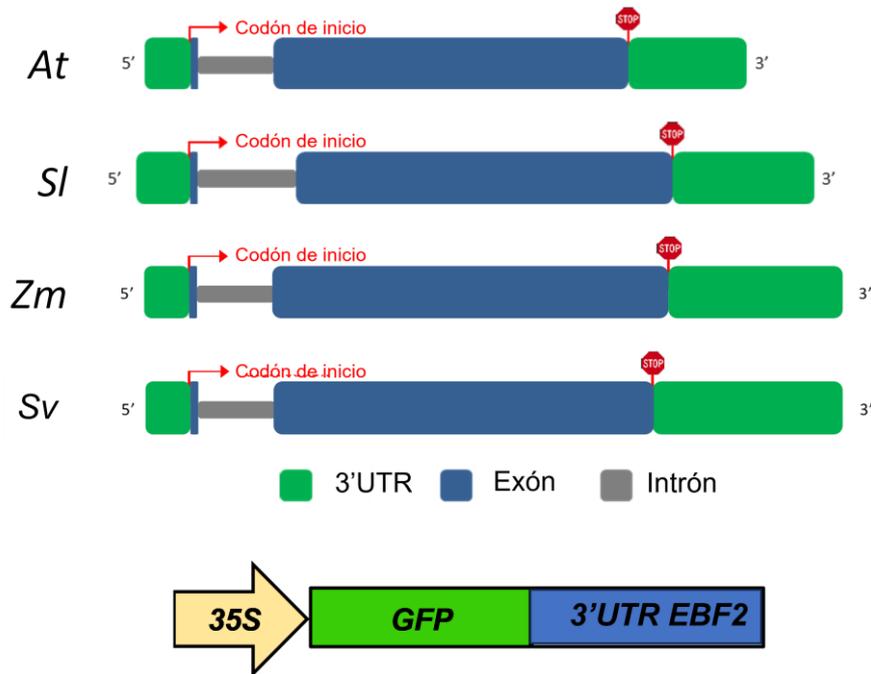


Figura 16. Regiones 3'UTR de *EBF2* y la construcción reportera. Estructura de los genes de *EBF2* para *A. thaliana* (At), *S. lycopersicum* (Sl), *Z. mays* (Zm) y *S. veridis* (Sv), mostrando la conservación del gran tamaño o longitud de la región 3' UTR en los transcritos analizados. Se han generado construcciones con el gen reportero *GFP* bajo el promotor constitutivo *35S*.

A continuación, se probaron los niveles de expresión de estos genes reporteros en ensayos de expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana* en presencia y ausencia de etileno (Figura 17). Los resultados muestran que, tanto para *Z. mays* (Zm) como *S. veridis* (Sv), la fluorescencia en presencia de etileno disminuyó en intensidad, al igual que el control en *A. thaliana* (At). La fluorescencia en condiciones control (aire) tiene una intensidad mayor para todas ellas. Estos resultados sugieren que la traducción del gen reportero se ve reprimida en presencia de etileno.

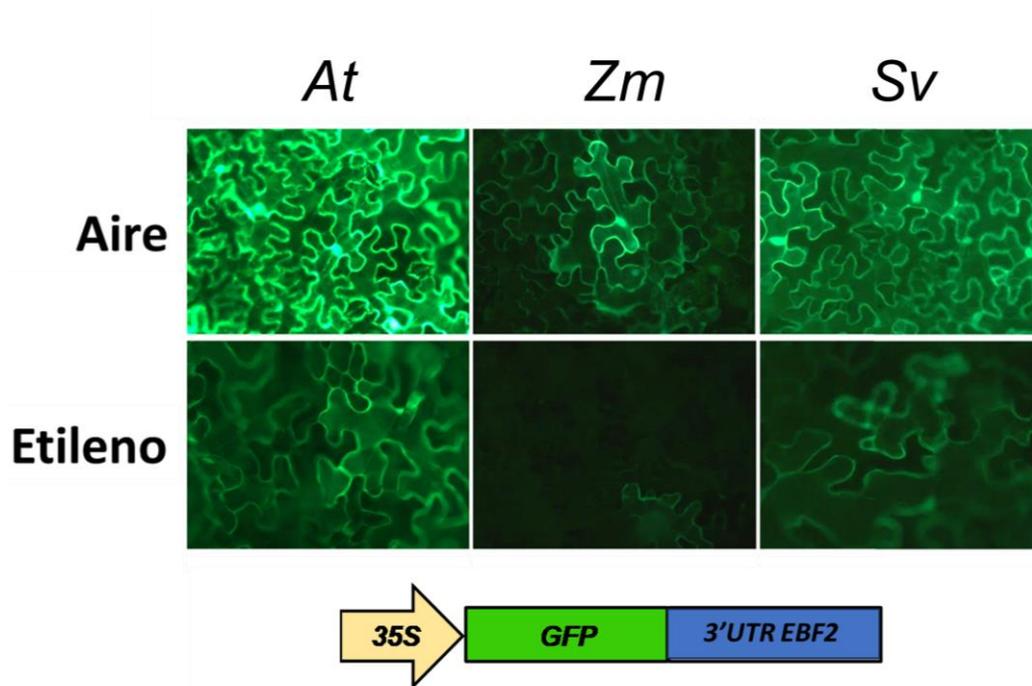


Figura 17. Expresión transitoria del gen reportero con regiones 3'UTR de EBF2 de diferentes especies. Imágenes del microscopio de fluorescencia de hojas de *N. benthamiana* agroinyectadas con las construcciones 3'UTR de *EBF2* de *A. thaliana* (At), *Z. mays* (Zm) y *S. veridis* (Sv) con el gen reportero *GFP* bajo el promotor constitutivo *35S* en condiciones control (aire) y tratadas con etileno.

4.7 Caracterización molecular de la región 3'UTR de *EBF2*

En investigaciones previas, se analizaron las secuencias de las regiones 3'UTR de los ortólogos de *EBF2* en especies distantes sin identificar ningún motivo conservado a nivel de secuencia que pueda ser responsable de la regulación de la traducción. Sin embargo, al modelar la estructura secundaria del ARN de estas regiones 3'UTR utilizando diferentes algoritmos (Gray et al., 2022; Miladi et al., 2020; Sato et al., 2021), se descubrió una región de aproximadamente 90 nucleótidos en las regiones 3'UTR que, aunque no está conservada a nivel de secuencia entre las especies distantes, forma una estructura de doble bucle presente en todas las regiones 3'UTR de *EBF2* modeladas.

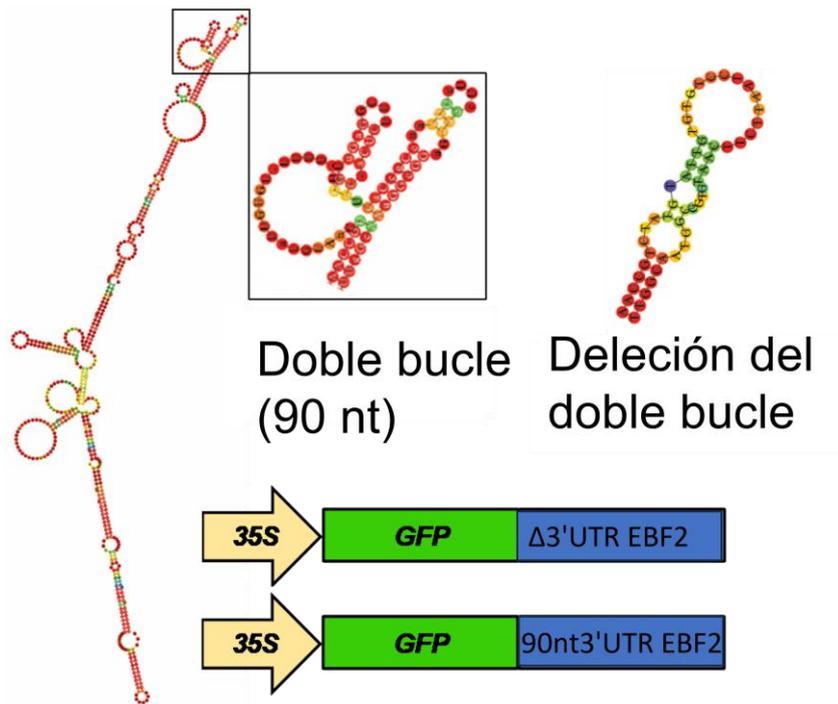


Figura 18. Construcciones generadas para la caracterización molecular de la región 3'UTR de *EBF2*. Construcciones con el gen reportero *GFP* bajo el promotor constitutivo *35S* con la región de 90 nucleótidos responsable del doble bucle y la deleción de este.

Para evaluar el efecto de esta región en respuesta al etileno, se eliminó la secuencia de 90 nucleótidos que forma esta estructura de doble bucle de la región 3'UTR de *EBF2* y se generaron construcciones reporteras con la región 3'UTR con la deleción de estos 90 nucleótidos (*p35S:GFP-stop- $\Delta 3'UTR EBF2$*) (Figura 18 y 19). Asimismo, se generaron construcciones reporteras que contengan solo la secuencia de 90 nucleótidos (*p35S:GFP-stop-90nt3'UTR EBF2*) (Figura 18 y 19).

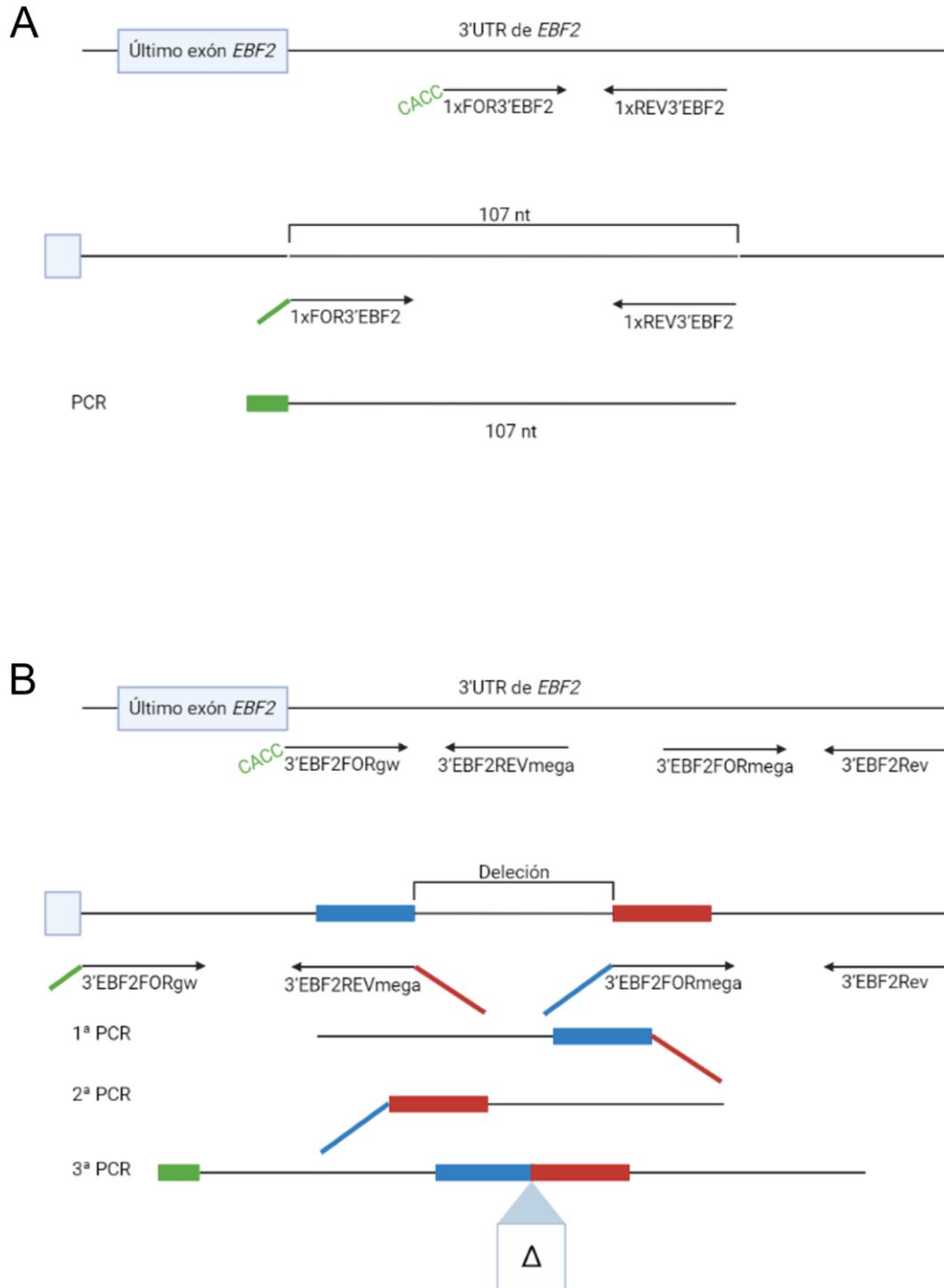


Figura 19. Esquemmatización de las PCRs realizadas para la obtención de las construcciones. (A) PCR con cebadores flanqueantes a la secuencia de 107 nucleótidos que contienen los 90 nucleótidos de interés. El cebador que anilla al principio de la región a amplificar tiene en 5' la secuencia CACC para su posterior clonaje (se muestra con las regiones verdes). **(B)** Tres PCRs fueron necesarias para la generación de la deleción de los 90 nucleótidos de interés. En las dos primeras, se generaron fragmentos de la región 3'UTR flanqueantes a los 90 nucleótidos de interés con secuencias solapantes al otro fragmento (se muestra con las regiones rojas y azules). En la tercera, se generó la región 3'UTR con la deleción de los 90 nucleótidos. El cebador que anilla al principio de la región 3'UTR tiene en 5' la secuencia CACC para su posterior clonaje (se muestra con las regiones verdes) y los cebadores con el sufijo -mega tienen regiones solapantes al otro fragmento (se muestra con las regiones rojas y azules).

Posteriormente se transformaron hojas de *N. benthamiana* y se evaluaron los efectos de estas modificaciones en la respuesta al etileno en el microscopio de fluorescencia (Figura 20). No se observaron grandes diferencias entre aire y etileno para las líneas reporteras con la secuencia de 90 nucleótidos responsable de la formación del doble bucle, indicando que esta secuencia por sí sola no es suficiente para conferir regulación traduccional. Tampoco hay diferencias entre aire y etileno para las líneas reporteras con la delección de los 90 nucleótidos. Estos resultados, por su parte, sugieren que esta secuencia de 90 nucleótidos es necesaria para conferir la regulación traduccional mediada por etileno.

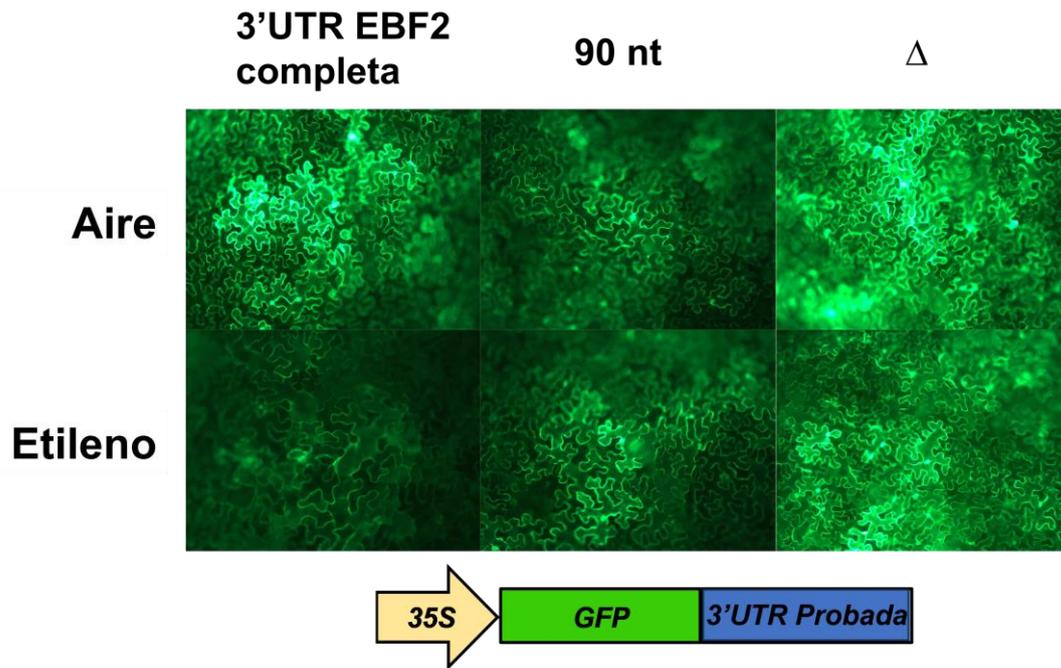


Figura 20. Expresión transitoria del gen reportero bajo el control de las secuencias de la región 3'UTR de EBF2 analizadas. Imágenes del microscopio de fluorescencia de hojas de *N. benthamiana* agroinyectadas con las construcciones 3'UTR de *EBF2*, la región de 90 nucleótidos responsables de la formación del doble bucle y la región de 3'UTR de *EBF2* con la delección de los 90 nucleótidos de *A. thaliana* con el gen reportero *GFP* bajo el promotor constitutivo *35S* en condiciones control (Aire) y tratadas con etileno.

5 Discusión

5.1 Identificación de nuevos transcritos que interactúan con EIN2

Uno de los objetivos iniciales de este trabajo era la identificación de nuevos transcritos que interactúen con EIN2. La identificación de nuevos ARNs mensajeros que interactúan con esta proteína va a permitir ampliar el conocimiento actual de la ruta de señalización del etileno y la identificación de nuevos actores cuya traducción se vea reprimida en presencia de esta hormona y que podrían jugar un papel importante en la respuesta a etileno. Además, también se podría identificar nuevos elementos reguladores de la traducción (como la región 3'UTR de *EBF2*) y así mejorar la comprensión de la regulación de la expresión génica específicamente a nivel traduccional. Estos conocimientos podrían ser de gran utilidad para el desarrollo de nuevas y útiles herramientas en las áreas de biotecnología vegetal y biología sintética. Los resultados del experimento propuesto pueden sentar las bases para mejorar nuestra comprensión global de los procesos del desarrollo de plantas regulados a través de la vía de señalización del etileno.

Las técnicas tradicionales para identificar transcritos asociados a las proteínas de unión al ARN *in vivo* suelen estar basadas en la precipitación de los complejos ARN-proteína mediante procedimientos bioquímicos basados en anticuerpos. Dos de las técnicas más usadas son CLIP (Cross-Linking and Immunoprecipitation) (Ule et al., 2005) y RIP (RNA Immunoprecipitation) (Gilbert y Svejstrup, 2006), el primero de ellos conlleva un paso de entrecruzamiento. Este tipo de métodos presentan desventajas importantes (Rahman et al., 2018): requieren grandes cantidades de material vegetal inicial, pueden tener una gran tasa de falsos positivos y el procedimiento experimental no es sencillo. Por estos motivos, para este objetivo se ha utilizado la técnica HyperTRIBE. En comparación con otros métodos, presenta las siguientes ventajas (Rahman et al., 2018): un procedimiento experimental eficiente y sencillo, tiene un protocolo de análisis informático bien implementado para normalizar los niveles de unión de proteína a ARN teniendo en cuenta los niveles de transcrito presentes, ahorro de costes al secuenciar bibliotecas con menos profundidad y tiene menor tasa de falsos negativos. Otro aspecto importante, como se ha dicho con anterioridad, es que su uso ya ha sido establecido en plantas con resultados satisfactorios (Arribas-Hernández, Rennie, Köster, et al., 2021; Arribas-Hernández, Rennie, Schon, et al., 2021; Rennie et al., 2021; Ule et al., 2005). La técnica elegida también presenta desventajas (Rahman et al., 2018), las cuales se están teniendo en cuenta. La principal limitación (Rahman et al., 2018) es que no es posible conocer la secuencia exacta de unión, debido a que las mutaciones identificadas por secuenciación en los transcritos asociados a la proteína se encuentran en las inmediaciones del lugar de unión de la proteína pero no con suficiente resolución para poder definir el sitio exacto de unión. Otra limitación de la técnica es la baja tasa de edición (sobre el 2%) de la enzima ADAR, pero esta limitación puede minimizarse con un buen diseño experimental, suficientes replicas biológicas y mayor profundidad de secuenciación si es requerido. También, la sobreexpresión de la proteína de fusión podría conducir a cambios fenotípicos y en los perfiles de expresión génica no deseados. Un exceso de la proteína de fusión también podría resultar en una unión inespecífica a transcritos que no son objetivos de esta proteína en condiciones control. En nuestro proyecto, según lo mencionado anteriormente, ambas construcciones se han generado utilizando el promotor nativo de *EIN2*, un gen que bajo las condiciones de nuestro experimento no va a aumentar su expresión de forma notable. Por lo tanto, cabe esperar que los niveles de expresión de nuestra proteína de fusión no alcancen niveles de sobreexpresión o saturación. Es posible que la enzima tenga preferencia por ciertas secuencias, como las adyacentes a UAG (provocando falsos positivos). Aunque la versión de la

enzima utilizada confiere una mayor velocidad de edición y menos preferencia por la secuencia adyacente a UAG (disminuyendo este sesgo). En resumen, HyperTRIBE es una técnica simple y precisa para identificar nuevos transcritos que se asocien a la proteína de interés (en nuestro caso EIN2). En un futuro próximo, se utilizarán otras técnicas más dirigidas a un número reducido de transcritos de interés para definir con mayor resolución los sitios de unión de EIN2 a sus transcritos diana.

A la finalización de este trabajo, todas las líneas para este experimento explicadas anteriormente están ya generadas, y se han sometido a condiciones control (aire) y a tratamiento con etileno. Las plantas han sido recolectadas y actualmente se está extrayendo el ARN para su posterior secuenciación. El análisis se realizará comparando el transcriptoma de las plantas crecidas en condiciones control y las sometidas a tratamiento de etileno. Las posibles diferencias entre ellas indicarán posibles transcritos que se asocien con EIN2. También está previsto realizar ensayos *Western Blot* para determinar el nivel de expresión de la proteína de fusión y determinar si hay grandes diferencias en los niveles de la enzima ADAR entre las líneas transgénicas.

5.2 El uso de la región 3'UTR de *EBF2* como herramienta biotecnológica para retrasar el ablandamiento del fruto

En los resultados preliminares (Figura 7 y 8) se ha mostrado la capacidad de esta región, tanto de *A. thaliana* como de *S. lycopersicum*, para conferir regulación a nivel traduccional mediada por etileno. Este gas es la principal hormona vegetal que promueve la maduración de los frutos climatéricos, entre otros procesos biológicos, y los niveles de producción, sensibilidad y respuesta al etileno están determinados por la etapa de desarrollo del fruto (Figura 3). Al inicio del Sistema 2, en la etapa *mature green*, la producción de etileno sufre un importante incremento. Estos dos aspectos, la capacidad conferir regulación a nivel traduccional dependiente de etileno y los altos niveles endógenos de esta hormona durante la maduración, hicieron que la región 3'UTR de *EBF2* fuera propuesta para su uso como herramienta biotecnológica para controlar aspectos específicos durante la maduración del fruto mediante la regulación a nivel traduccional mediada por etileno de cualquier transcrito de interés.

Como prueba de concepto, se ha utilizado este mecanismo como una herramienta biotecnológica para reprimir la traducción de genes específicos en ciertos procesos de la maduración, como es la pérdida de firmeza. El objetivo de esta aproximación es inhibir la traducción de un gen en particular, involucrado específicamente en el ablandamiento del fruto de tomate, sin afectar ninguno de los otros procesos que tiene lugar durante la maduración. Concretamente, estamos reduciendo la traducción de la enzima PCL utilizando la región 3'UTR de *EBF2* y aprovechando los altos niveles de etileno endógeno producido por el fruto durante las primeras fases de la maduración que bloquean la traducción de este transcrito, mientras que el proceso general de maduración no se ve alterado. El objetivo principal es retrasar el ablandamiento para disminuir las pérdidas postcosecha y el desperdicio sin afectar a otros aspectos organolépticos del fruto.

Como ya he comentado, hemos sido capaces de confirmar nuestra hipótesis inicial en la cual predecíamos que, durante las etapas *breaker* de maduración caracterizadas por la alta producción de etileno, la traducción del transcrito de la enzima PCL fusionado a la región 3'UTR de *EBF2* se ve reprimida (Figura 12). Causando, en esas etapas de la maduración, un retraso en la pérdida de firmeza del fruto con respecto a los controles. Las líneas mutantes complementadas con la enzima *PCL* seguida de la región 3'UTR de *EBF2* mostraron datos de firmeza mayores que los controles. *Breaker* +5 fue la etapa donde la diferencia de firmeza fue

mayor, comparado con las líneas transgénicas con la región 3'UTR nativa y las líneas *wild-type*. Incluso en esta etapa, la firmeza fue muy similar a las líneas mutantes *pcl*. Como era de esperar, cuando los niveles de etileno empiezan a disminuir en las etapas posteriores, la firmeza de estas tres líneas comienza a reducirse notablemente. Las líneas mutantes *pcl*, como se preveía, siempre muestran niveles de firmeza más elevados en todas las etapas de maduración. Esto último es debido a que las líneas mutantes no expresan la enzima PCL, principal responsable del ablandamiento del fruto.

Actualmente, estamos llevando a cabo más mediciones de firmeza para realizar un análisis más exhaustivo en puntos clave del proceso de maduración del fruto. Nos estamos centrando sobre todo en obtener más mediciones entre las etapas *breaker* y *breaker* +5 (donde la producción de etileno es más alta y hay más cambios en su concentración en poco tiempo). Estas mediciones se están llevando a cabo con la inclusión de nuevos parámetros que permitirán el cálculo del módulo de elasticidad. De esta forma, las mediciones serán independientes del instrumento y la sonda, permitiendo que sean más comparables (Fariñas et al., 2021; Landahl et al., 2009). También más mediciones en las etapas posteriores son necesarias para caracterizar bien la caída de la firmeza desencadenada por el descenso en la producción de etileno en estas etapas.

La identificación y comprensión del mecanismo responsable de la alteración de la traducción de genes asociados a la maduración, como el estudiado en este trabajo, pueden abrir nuevas vías para desarrollar nuevos enfoques para el control inteligente de la maduración del fruto. Mientras que las prácticas comunes de manejo de la fruta, como la recolección de frutas verdes, su almacenamiento en cámaras con altas concentraciones de CO₂ y en frío, o el uso de la mutación *rin* en variedades comerciales, no solo retrasan la maduración y prolongan la vida útil, sino que también tienen un gran impacto en la calidad del tomate (reduciendo el aroma, el sabor y los rasgos de color). La manipulación precisa de subprocesos específicos de la maduración puede modificar solo un rasgo particular sin afectar negativamente a los demás. El desarrollo de este sistema regulatorio para controlar el ablandamiento del fruto puede abrir nuevas posibilidades para el control de transcritos mediante la represión de su traducción por etileno de cualquier gen de interés, así como a nivel comercial, con posibles aplicaciones directas y repercusiones en la minimización del desperdicio de alimentos.

5.3 Mediciones de la firmeza no destructivas

Tradicionalmente, los métodos utilizados para monitorizar la evolución de la firmeza del fruto durante la maduración son mecánicos, basados en pruebas de compresión o punción. Requieren manipulación y alteración de las muestras, es por ello por lo que se consideran metodologías destructivas. Por esa razón, se requiere la cuantificación de grandes cantidades de muestras para obtener resultados significativos. Las técnicas de cuantificación de la firmeza que se muestra en los resultados (Figura 12) utilizadas en este trabajo han sido de este tipo.

Como alternativa, se han utilizado métodos no invasivos como las imágenes por resonancia magnética (RMN) para monitorizar la firmeza de los frutos individuales a lo largo de las diferentes etapas de maduración del tomate sin destruir la muestra (Ito et al., 2020). Sin embargo, la principal desventaja de esta técnica es la limitación del tamaño de la muestra que se puede analizar. Los equipos de RMN asequibles solo pueden obtener imágenes de tomates con un diámetro menor a 25 mm, lo que limita este tipo de análisis a variedades en miniatura como Micro Tom.

Se ha estudiado la pérdida de agua como una aproximación para la cuantificación del ablandamiento (Figura 13). Todas las líneas utilizadas perdían agua a lo largo del proceso de

maduración del fruto. Las líneas mutantes *pcl* perdían agua más lentamente, como era esperable. Las líneas transgénicas que complementaban al mutante *pcl* con la región 3'UTR de *EBF2* perdían agua de forma más lenta que las otras dos líneas control. Estos resultados concuerdan con los resultados de la cuantificación de firmeza realizada con métodos destructivos (Figura 12). Sin embargo, se conoce que la pérdida de agua también depende de otros factores como la cutícula. Puede que la pérdida de agua no solo se deba a la degradación de las paredes celulares de las células del pericarpio, causando el ablandamiento del fruto. También hay otros factores a considerar, pero entre las líneas utilizadas en nuestros experimentos no hay ninguna otra diferencia fenotípica a la que se le pueda atribuir una pérdida de agua diferencial y, por tanto, pérdida de firmeza distinta entre los frutos de distintas líneas. En general, es una buena aproximación para cuantificar de forma indirecta el ablandamiento del fruto. Es un método recomendable debido a su alta utilidad y eficacia cuando se cuantifican un elevado número de frutos, su bajo coste y su poca complejidad técnica.

Como alternativa a las técnicas destructivas y, a su vez, para superar las limitaciones de las técnicas no destructivas como la RMN (precio elevado y el tamaño de fruto pequeño), en el laboratorio estamos implementando el uso de técnicas de ultrasonidos para examinar de manera no destructiva los tejidos internos del fruto (Camarena et al., 2007; Flitsanov et al., 2000; Magwaza y Tesfay, 2015). Mediante ultrasonidos se pueden medir la composición de la muestra y determinar su estructura. Dado que las propiedades de la textura dependen de la estructura y composición, se podría cuantificar mediante esta técnica la firmeza. Ya existen algunos estudios donde se ha empleado esta técnica para estimar con precisión el contenido de agua de diferentes tejidos vegetales y la firmeza del fruto en aguacate (Gómez Álvarez-Arenas et al., 2016; Zhang et al., 2022).

En colaboración con el FoodPEEL lab (<https://foodpeel.blogs.upv.es/>) de la UPV, estamos implementando el uso de ultrasonidos para monitorizar la firmeza de un fruto en diferentes momentos a lo largo del proceso de maduración. Estas metodologías se están empleando para la cuantificación de la firmeza de los frutos de tomate producidos por el tipo *wild type*, el mutante *pcl* y las líneas transgénicas que complementan al mutante *pcl*. Los resultados preliminares obtenidos hasta la fecha son prometedores. En frutas firmes, la mayor parte de la señal de ultrasonidos se refleja en los tejidos externos del tomate, generando un eco fuerte y fácilmente identificable. No se obtienen ecos generados por los tejidos internos en las frutas firmes. A medida que el tomate se ablanda, la reflexión en los tejidos externos disminuye y aparecen ecos en los tejidos internos del fruto. En frutas blandas, la señal de los tejidos externos es más difusa y la penetración de los ultrasonidos es mayor que en los tomates más firmes. Se observan claramente ecos provenientes de los tejidos internos, lo que refleja la presencia de cavidades de aire, semillas o irregularidades en los tejidos de la fruta. Esta técnica optimizada nos permitirá recopilar datos de la evolución del ablandamiento de la fruta en muestras individuales a lo largo del proceso de maduración, sin la destrucción de las muestras.

5.4 Las líneas mutantes *pcl* complementadas con la región 3'UTR de *EBF2* no presentan cambios en la producción de etileno o aspectos morfológicos.

La demostración de que estas líneas no tienen alterados ninguno de sus procesos internos, funciones y aspecto, es fundamental para confirmar que la regulación de la traducción del gen *PCL* solo afecta a la firmeza del fruto sin alterar ningún otro fenotipo de la planta o fruto. Para poder demostrar esto último, se realizaron mediciones de la producción de etileno (Figura 13) y se comprobó que ciertos aspectos morfológicos, como la altura y el número de ramilletes (Figura 14).

Los resultados obtenidos en la medición de producción de etileno muestran que prácticamente no hay diferencias en los niveles de producción de esta hormona entre las líneas analizadas. La producción de etileno para todas ellas sigue el patrón normal descrito con anterioridad (Figura 3). Al inicio de la maduración, justo después del pico en respiración del fruto, se observa un aumento repentino en la producción de etileno en la etapa *mature green* (BR -2), alcanzando el pico aproximadamente en la etapa *breaker*. En las etapas posteriores, se aprecia la disminución en la producción de etileno, siguiendo los patrones esperados de producción. En la gráfica no se observan diferencias notables. De estos resultados se puede concluir que no hay diferencias en los niveles de producción de etileno entre las líneas mutantes *pcl*, las líneas mutantes complementadas con la construcción que posee la región 3'UTR de *EBF2* y las líneas control, tanto las *wild-type*, como las mutantes complementadas con la construcción que posee la región 3'UTR nativa de *PCL*.

El patrón de producción de etileno observado para las líneas (Figura 14) se relaciona con los datos de firmeza obtenidos (Figura 12). Las etapas que presentan una mayor producción de etileno coinciden con las etapas que presentan una mayor firmeza en las líneas mutantes *pcl* complementadas con la región 3'UTR de *EBF2* en comparación con las líneas *wild-type* y las líneas mutantes *pcl* complementadas con la región 3'UTR nativa de *PCL*. Este hecho significa que altos niveles de etileno reprimen la traducción de la enzima, retrasando la pérdida de firmeza. Cuando los niveles de etileno bajan, se traduce la enzima y el fruto se ablanda. Esto también demuestra que es el etileno el que regula los niveles de la enzima PCL, aunque es cierto que más mediciones de firmeza entre las etapas *breaker* y *breaker* +5 son necesarias para obtener más resolución y poder de análisis. Por lo tanto, hemos demostrado que utilizando esta aproximación podemos generar represión de la traducción mediada por etileno de cualquier gen de interés.

Para demostrar que las líneas mutantes *pcl* complementadas con la región 3'UTR de *EBF2* no presentan cambios a nivel morfológico, en comparación con las líneas control, se contaron el número de ramilletes por planta a los 36 días y se midió la altura a los 36 y 69 días. Los resultados obtenidos (Figura 15) no muestran diferencias significativas entre las líneas analizadas. Se puede concluir que no hay cambio en los aspectos morfológicos analizados entre las líneas *wild-type*, las líneas mutantes *pcl* y las líneas transgénicas mutantes *pcl* complementadas con las regiones 3'UTR de *EBF2* y *PCL*.

5.5 La región 3'UTR de *EBF2* está conservada en angiospermas

Tras los análisis filogenéticos llevados a cabo previamente a este trabajo, se confirmó la presencia y evolución de esta familia de proteínas F-box en plantas con flores y musgos. Esto supone un claro indicio de que el papel de los *EBFs* en la vía de señalización del etileno puede estar conservada. Sin embargo, la pregunta clave es si estas regiones 3'UTR de los ortólogos de *EBF2* son capaces de conferir regulación a nivel traduccional de estos genes en respuesta al etileno.

En los resultados preliminares de este trabajo (Figura 7), se muestra como las líneas reporteras GFP con las regiones 3'UTR de *EBF2* de *S. lycopersicum* y *A. thaliana* ven disminuida su intensidad de fluorescencia en tratamientos con etileno. Además, los resultados para las dos construcciones se muestran en raíces de *A. thaliana*, raíces de tomate y expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana*. Estos resultados indican que el mecanismo de regulación de la traducción conferido por estas regiones 3'UTR está conservado en especies dicotiledóneas.

La presencia de regiones 3'UTR largas en los transcritos de los *EBFs* de especies monocotiledóneas, como ocurre en el caso anteriormente estudiado de las dicotiledóneas, sugiere que el mecanismo de regulación de la traducción también podría estar conservado, al

menos, entre angiospermas. Para probar esta hipótesis, en este trabajo se han usado las regiones 3'UTR de *EBF2* de especies de plantas monocotiledóneas para confirmar la conservación funcional del mecanismo de regulación de la traducción conferido por esta región en respuesta al etileno (Figura 16). Se han generado construcciones reporteras similares a las mostradas para *A. thaliana* y tomate (Figura 7) para monocotiledóneas modelo como el maíz y *S. Viridis*. Se han probado en ensayos de expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana* en presencia y ausencia de etileno. En los resultados (Figura 17), tanto para la región 3'UTR de *EBF2* de maíz, como para el 3'UTR de *S. viridis*, los niveles de fluorescencia son más bajos en presencia de etileno que en condiciones control (aire).

Tanto los resultados preliminares como los resultados de este trabajo indican que la región 3'UTR de *EBF2* está conservada en brásicas (*A. thaliana*), solanáceas (*S. lycopersicum*) y monocotiledóneas (*S. viridis* y *Z. mays*). El próximo paso, será la obtención de líneas estables para todas las construcciones reporteras con las regiones 3'UTR de *EBF2* de las especies mencionadas para conseguir resultados más sólidos y comparables.

Esta conservación del mecanismo de regulación a nivel traduccional en las especies monocotiledóneas y dicotiledóneas estudiadas en este trabajo da pie a proponer futuros enfoques y aplicaciones en otras especies. Estos resultados muestran la conservación del mecanismo por el cual las regiones 3'UTR logran la función reguladora de la traducción más allá de las plantas modelo y establece la universalidad de este mecanismo, al menos, entre las plantas angiospermas. Se podrían desarrollar nuevas aplicaciones biotecnológicas (como la descrita en este trabajo para retrasar el ablandamiento) para controlar la traducción, con un posible impacto en diferentes cultivos y plantas ornamentales de interés económico. Se podría controlar la traducción de genes de interés durante procesos dependientes de etileno modificando diversas respuestas que están mediadas o reguladas por etileno y, así, poder atenuar los efectos perjudiciales de la hormona durante situaciones de estrés leve o controlado (como sequías, inundaciones, salinidad, ataques de patógenos), lo cual podría tener aplicaciones importantes en un contexto de agricultura personalizada altamente tecnificada.

5.6 El mecanismo molecular responsable de la regulación a nivel traduccional de *EBF2*

Todos los transcritos de los ortólogos de *EBF2* analizados tienen regiones 3'UTR inusualmente largas. Es conocido que los transcritos con regiones 3'UTR más largas de lo habitual presentan tasas de traducción más bajas (Mayr, 2019). Específicamente, la longitud de la región 3'UTR de *EBF2* de *A. thaliana* es de aproximadamente de 600 nucleótidos, mientras que la longitud promedio de las regiones 3'UTR de los transcritos de *A. thaliana* (Kawaguchi y Bailey-Serres, 2005) es de 248 nucleótidos. De manera similar, la longitud promedio de las regiones 3'UTR de tomate (Aoki et al., 2010) es de 257 nucleótidos y el tamaño de la región 3'UTR de *EBF2* es de 700 nucleótidos. Asimismo, para el maíz (Soderlund et al., 2009), las longitudes promedio de las regiones 3'UTR de los ARNm son de 321 y la longitud de la región 3'UTR de *EBF2* es de casi 800 nucleótidos. Para *S. viridis* ocurre de forma similar.

Esta inusual longitud de estas regiones 3'UTR, en comparación con las regiones 3'UTR de la mayoría de los genes en distintas especies, es una característica conservada en todas las secuencias de *EBF2* analizadas. El siguiente objetivo fue buscar secuencias concretas o motivos conservados dentro de estas regiones que pudieran ser responsables de la regulación a nivel traduccional. Tras analizar las secuencias de las regiones 3'UTR de los ortólogos de *EBF2* en especies distantes, no se identificó ningún motivo conservado que pudiese ser responsable de

esta regulación. Sin embargo, al utilizar programas de modelaje de la estructura secundaria del ARN utilizando diferentes algoritmos, se observó una región de aproximadamente 90 nucleótidos en las regiones 3'UTR que, aunque no está conservada a nivel de secuencia entre las especies distantes, forma una estructura de doble bucle presente en todas las regiones 3'UTR de *EBF2* modeladas. La hipótesis es que esta estructura conservada podría ser esencial para regular la traducción de *EBF2*.

Para evaluar el efecto de esta región en respuesta al etileno, se generaron construcciones reporteras (Figura 18 y 19) que contenían solo la secuencia de 90 nucleótidos. Asimismo, se eliminó la secuencia de 90 nucleótidos que forma esta estructura de doble bucle de la región 3'UTR de *EBF2* y se generaron construcciones reporteras con la región 3'UTR sin esa secuencia.

Si la estructura de doble bucle es suficiente para la regulación de la traducción de *EBF2* en respuesta al etileno, las líneas con la construcción que contiene la secuencia de 90 nucleótidos en presencia de etileno deberían ver reprimidos los niveles de traducción del gen reportero y la intensidad de la fluorescencia disminuida respecto a las condiciones control (aire). Si la estructura de doble bucle es necesaria para la regulación de la traducción de *EBF2* en respuesta al etileno, las líneas con la construcción que carece de la secuencia de 90 nucleótidos deberían mostrar insensibilidad al etileno. En presencia de etileno, la región 3'UTR sin los 90 nucleótidos no sería capaz de reprimir la traducción del gen reportero, manteniendo la misma intensidad de fluorescencia que en las condiciones control (aire).

Se transformaron hojas de *N. benthamiana* para evaluar el efecto de estas modificaciones en la respuesta al etileno de las anteriores líneas (Figura 20). Los resultados han mostrado que no hay cambios en la intensidad de fluorescencia para ninguna de las construcciones. No hay diferencias en los niveles de intensidad de fluorescencia entre aire y etileno para la construcción de los 90 nucleótidos, indicando que esta secuencia de no es suficiente para conferir regulación a nivel traduccional por ella misma. Lo que sugiere que hay otras secuencias requeridas para conferir la inhibición de traducción en respuesta a etileno. Tampoco hay diferencia entre aire y etileno para la construcción que posee la delección de 90 nucleótidos, indicando que esta secuencia es necesaria para conferir regulación a nivel traduccional. Sin esta secuencia, no hay ningún tipo de represión de la traducción y la región 3'UTR de *EBF2* pierde su actividad en presencia de etileno. En resumen, esta secuencia de 90 nucleótidos no es suficiente, pero si necesaria para conferir regulación a nivel traduccional.

Como en el caso del apartado anterior, el siguiente paso es la generación de líneas transgénicas estables para todas las construcciones reporteras para conseguir resultados más sólidos y comparables. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que hay algún elemento adicional en el 3'UTR de *EBF2* involucrado en este mecanismo de regulación de la traducción en respuesta a etileno. Es de gran importancia definir mejor las regiones de la secuencia del 3'UTR de *EBF2* responsables de esta regulación. Si esto último se consigue, se podrían introducir mutaciones puntuales, utilizando técnicas de edición como CRISPR/Cas, en las secuencias concretas de la región 3'UTR de *EBF2* para causar interrupciones importantes en la estructura y así identificar los nucleótidos clave responsables de la regulación de la traducción conferida por esta estructura en la región 3'UTR. Asimismo, también se podrían multimerizar estas secuencias para intentar producir hipersensibilidad al etileno.

6 Conclusiones

Las conclusiones de este Trabajo Final de Máster se resumen en:

1. Se han desarrollado líneas para el uso de la técnica HyperTRIBE, que permitirá la identificación de nuevos transcritos que interactúen con EIN2 *in vivo*.
2. La región 3'UTR de *EBF2* ha sido utilizada con éxito como herramienta biotecnológica para retrasar el ablandamiento del fruto.
3. El mecanismo molecular por el cual el etileno regula la traducción de *EBF2* está conservado en angiospermas.

7 Bibliografía

- Adams, D O, y Yang, S. (1979). Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(1), 170-174.
- Adams, Douglas O, y Yang, S. F. (1977). Methionine metabolism in apple tissue: implication of S-adenosylmethionine as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Plant Physiology*, 60(6), 892-896.
- Alexandratos, N., y Bruinsma, J. (2012). *World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision*.
- Alonso, J. M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S., y Ecker, J. R. (1999). EIN2, a Bifunctional Transducer of Ethylene and Stress Responses in Arabidopsis. *Science*, 284(5423), 2148-2152. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.284.5423.2148>
- An, F., Zhao, Q., Ji, Y., Li, W., Jiang, Z., Yu, X., Zhang, C., Han, Y., He, W., Liu, Y., Zhang, S., Ecker, J. R., y Guo, H. (2010). Ethylene-Induced Stabilization of ETHYLENE INSENSITIVE3 and EIN3-LIKE1 Is Mediated by Proteasomal Degradation of EIN3 Binding F-Box 1 and 2 That Requires EIN2 in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 22(7), 2384-2401. <https://doi.org/10.1105/TPC.110.076588>
- Aoki, K., Yano, K., Suzuki, A., Kawamura, S., Sakurai, N., Suda, K., Kurabayashi, A., Suzuki, T., Tsugane, T., Watanabe, M., Ooga, K., Torii, M., Narita, T., Shin-i, T., Kohara, Y., Yamamoto, N., Takahashi, H., Watanabe, Y., Egusa, M., ... Shibata, D. (2010). Large-scale analysis of full-length cDNAs from the tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivar Micro-Tom, a reference system for the Solanaceae genomics. *BMC Genomics*, 11(1), 1-16. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-210/FIGURES/8>
- Arribas-Hernández, L., Rennie, S., Köster, T., Porcelli, C., Lewinski, M., Staiger, D., Andersson, R., y Brodersen, P. (2021). Principles of mRNA targeting via the Arabidopsis m6A-binding protein ECT2. *eLife*, 10. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.72375>
- Arribas-Hernández, L., Rennie, S., Schon, M., Porcelli, C., Enugutti, B., Andersson, R., Nodine, M., y Brodersen, P. (2021). The ythdf proteins ect2 and ect3 bind largely overlapping target sets and influence target mrna abundance, not alternative polyadenylation. *eLife*, 10. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.72377>
- Barry, C. S., Blume, B., Bouzayen, M., Cooper, W., Hamilton, A. J., y Grierson, D. (1996). Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. *The Plant Journal*, 9(4), 525-535.
- Barry, C. S., Llop-Tous, M. I., y Grierson, D. (2000). The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato. *Plant Physiology*, 123(3), 979-986.
- Binder, B. M. (2020). Ethylene signaling in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 295(22), 7710-7725.
- Binder, B. M., Walker, J. M., Gagne, J. M., Emborg, T. J., Hemmann, G., Bleecker, A. B., y Vierstra, R. D. (2007a). The Arabidopsis EIN3 Binding F-Box Proteins EBF1 and EBF2 Have Distinct but Overlapping Roles in Ethylene Signaling. *The Plant Cell*, 19(2), 509-523. <https://doi.org/10.1105/TPC.106.048140>
- Bisson, M. M. A., y Groth, G. (2010). New insight in ethylene signaling: Autokinase activity of ETR1 modulates the interaction of receptors and EIN2. *Molecular Plant*, 3(5), 882-889.

<https://doi.org/10.1093/mp/ssq036>

- Bisson, M. M. A., y Groth, G. (2015). Targeting Plant Ethylene Responses by Controlling Essential Protein-Protein Interactions in the Ethylene Pathway. *Molecular Plant*, 8(8), 1165-1174. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.03.014>
- Bleecker, A. B., Estelle, M. A., Somerville, C., y Kende, H. (1988). Insensitivity to Ethylene Conferred by a Dominant Mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 241(4869), 1086-1089. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.241.4869.1086>
- Brumos, J. (2021). ScienceDirect Plant Biology Gene regulation in climacteric fruit ripening. *Current Opinion in Plant Biology*, 63(Figure 1), 102042. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2021.102042>
- Brumos, J., Zhao, C., Gong, Y., Soriano, D., Patel, A. P., Perez-Amador, M. A., Stepanova, A. N., y Alonso, J. M. (2020). An Improved Recombineering Toolset for Plants. *The Plant Cell*, 32(1), 100-122. <https://doi.org/10.1105/TPC.19.00431>
- Bürstenbinder, K., y Sauter, M. (2012). Early Events in the Ethylene Biosynthetic Pathway—Regulation of the Pools of Methionine and S-Adenosylmethionine. *Annual Plant Reviews Volume 44: The plant hormone ethylene*, 44, 19-52.
- Camarena, F., Martínez-Mora, J. A., y Ardid, M. (2007). Ultrasonic study of the complete dehydration process of orange peel. *Postharvest Biology and Technology*, 43(1), 115-120. <https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2006.07.012>
- Cancel, J. D., y Larsen, P. B. (2002). Loss-of-Function Mutations in the Ethylene Receptor ETR1 Cause Enhanced Sensitivity and Exaggerated Response to Ethylene in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 129(4), 1557-1567. <https://doi.org/10.1104/PP.003780>
- Cappellini, R. A., Ceponis, M. J., y Moline, H. E. (1984). *Postharvest Pathology of Fruits and Vegetables: Postharvest Losses in Perishable Crops*.
- Chang, C., Kwok, S. F., Bleecker, A. B., y Meyerowitz, E. M. (1993). *Arabidopsis* Ethylene-Response Gene ETR1: Similarity of Product to Two-Component Regulators. *Science*, 262(5133), 539-544. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.8211181>
- Chen, G., Alexander, L., y Grierson, D. (2004). Constitutive expression of EIL-like transcription factor partially restores ripening in the ethylene-insensitive Nr tomato mutant. *Journal of experimental botany*, 55(402), 1491-1497.
- Chen, Y. F., Randlett, M. D., Findell, J. L., y Schallert, G. E. (2002). Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(22), 19861-19866. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201286200>
- Deng, H., Pirrello, J., Chen, Y., Li, N., Zhu, S., Chirinos, X., Bouzayen, M., Liu, Y., y Liu, M. (2018). A novel tomato F-box protein, SIEBF3, is involved in tuning ethylene signaling during plant development and climacteric fruit ripening. *The Plant Journal*, 95(4), 648-658. <https://doi.org/10.1111/TPJ.13976>
- Evans, D. E., Bengochea, T., Cairns, A. J., Dodds, J. H., y Hall, M. A. (1982). Studies on ethylene binding by cell-free preparations from cotyledons of *Phaseolus vulgaris* L.: subcellular localization. *Plant, Cell y Environment*, 5(1), 101-107. <https://doi.org/10.1111/1365-3040.ep11588010>
- Evans, D. E., Dodds, J. H., Lloyd, P. C., apGwynn, I., y Hall, M. A. (1982). A study of the subcellular localisation of an ethylene binding site in developing cotyledons of *Phaseolus*

- vulgaris L. by high resolution autoradiography. *Planta*, 154(1), 48-52.
<https://doi.org/10.1007/BF00385495/METRICS>
- Fariñas, L., Sanchez-Torres, E. A., Sanchez-Jimenez, V., Diaz, R., Benedito, J., y Garcia-Perez, J. V. (2021). Assessment of avocado textural changes during ripening by using contactless air-coupled ultrasound. *Journal of Food Engineering*, 289, 110266.
<https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2020.110266>
- Fernandez-Pozo, N., Zheng, Y., Snyder, S. I., Nicolas, P., Shinozaki, Y., Fei, Z., Catala, C., Giovannoni, J. J., Rose, J. K. C., y Mueller, L. A. (2017). The Tomato Expression Atlas. *Bioinformatics*, 33(15), 2397-2398. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTX190>
- Flitsanov, U., Mizrach, A., Liberzon, A., Akerman, M., y Zauberman, G. (2000). Measurement of avocado softening at various temperatures using ultrasound. *Postharvest Biology and Technology*, 20(3), 279-286. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00138-1](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00138-1)
- Gagne, J. M., Smalle, J., Gingerich, D. J., Walker, J. M., Yoo, S. D., Yanagisawa, S., y Vierstra, R. D. (2004). Arabidopsis EIN3-binding F-box 1 and 2 form ubiquitin-protein ligases that repress ethylene action and promote growth by directing EIN3 degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(17), 6803-6808. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0401698101/ASSET/90DC53C4-1C7F-4A76-9933-81F94104272F/ASSETS/GRAPHIC/ZPQ0170446320006.JPEG>
- Gao, Z., Chen, Y. F., Randlett, M. D., Zhao, X. C., Findell, J. L., Kieber, J. J., y Schaller, G. E. (2003). Localization of the Raf-like Kinase CTR1 to the Endoplasmic Reticulum of Arabidopsis through Participation in Ethylene Receptor Signaling Complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(36), 34725-34732. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305548200>
- Gilbert, C., y Svejstrup, J. Q. (2006). RNA immunoprecipitation for determining RNA-protein associations in vivo. *Current protocols in molecular biology*, Chapter 27(1).
<https://doi.org/10.1002/0471142727.MB2704S75>
- Gómez Álvarez-Arenas, T., Gil-Pelegrin, E., Ealo Cuello, J., Fariñas, M. D., Sancho-Knapik, D., Collazos Burbano, D. A., y Peguero-Pina, J. J. (2016). Ultrasonic Sensing of Plant Water Needs for Agriculture. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 16(7).
<https://doi.org/10.3390/S16071089>
- Gray, M., Chester, S., y Jabbari, H. (2022). KnotAli: informed energy minimization through the use of evolutionary information. *BMC Bioinformatics*, 23(1), 1-28.
<https://doi.org/10.1186/S12859-022-04673-3/TABLES/8>
- Grefen, C., Städele, K., Růžička, K., Obrdlik, P., Harter, K., y Horák, J. (2008). Subcellular Localization and In Vivo Interactions of the Arabidopsis thaliana Ethylene Receptor Family Members. *Molecular Plant*, 1(2), 308-320. <https://doi.org/10.1093/MP/SSM015>
- Hackett, R. M., Ho, C.-W., Lin, Z., Foote, H. C. C., Fray, R. G., y Grierson, D. (2000). Antisense inhibition of the Nr gene restores normal ripening to the tomato Never-ripe mutant, consistent with the ethylene receptor-inhibition model. *Plant Physiology*, 124(3), 1079-1086.
- Hall, A. E., Chen, Q. G., Findell, J. L., Schaller, G. E., y Blecker, A. B. (1999). The Relationship between Ethylene Binding and Dominant Insensitivity Conferred by Mutant Forms of the ETR1 Ethylene Receptor. *Plant Physiology*, 121(1), 291-300.
<https://doi.org/10.1104/PP.121.1.291>
- Hirayama, T., Kieber, J. J., Hirayama, N., Kogan, M., Guzman, P., Nourizadeh, S., Alonso, J. M.,

- Dailey, W. P., Dancis, A., y Ecker, J. R. (1999). RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in Arabidopsis. *Cell*, 97(3), 383-393. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80747-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80747-3)
- Hoppen, C., Müller, L., Hänsch, S., Uzun, B., Milić, D., Meyer, A. J., Weidtkamp-Peters, S., y Groth, G. (2019). Soluble and membrane-bound protein carrier mediate direct copper transport to the ethylene receptor family. *Scientific Reports 2019 9:1*, 9(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47185-6>
- Huang, Y., Li, H., Hutchison, C. E., Laskey, J., y Kieber, J. J. (2003). Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 33(2), 221-233. <https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.2003.01620.X>
- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Forslund, K., Cook, H., Heller, D., Walter, M. C., Rattei, T., Mende, D. R., Sunagawa, S., Kuhn, M., Jensen, L. J., Von Mering, C., y Bork, P. (2016). eggNOG 4.5: a hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences. *Nucleic Acids Research*, 44(Database issue), D286. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKV1248>
- Ingolia, N. T., Ghaemmaghami, S., Newman, J. R. S., y Weissman, J. S. (2009). Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5924), 218-223. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1168978>
- Ito, Y., Nishizawa-Yokoi, A., Endo, M., Mikami, M., Shima, Y., Nakamura, N., Kotake-Nara, E., Kawasaki, S., y Toki, S. (2017). Re-evaluation of the rin mutation and the role of RIN in the induction of tomato ripening. *Nature plants*, 3(11), 866-874.
- Ito, Y., Sekiyama, Y., Nakayama, H., Nishizawa-Yokoi, A., Endo, M., Shima, Y., Nakamura, N., Kotake-Nara, E., Kawasaki, S., Hirose, S., y Toki, S. (2020). Allelic Mutations in the Ripening -Inhibitor Locus Generate Extensive Variation in Tomato Ripening. *Plant Physiology*, 183(1), 80-95. <https://doi.org/10.1104/PP.20.00020>
- Ju, C., Yoon, G. M., Shemansky, J. M., Lin, D. Y., Ying, Z. I., Chang, J., Garrett, W. M., Kessenbrock, M., Groth, G., Tucker, M. L., Cooper, B., Kieber, J. J., y Chang, C. (2012). CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(47), 19486-19491. https://doi.org/10.1073/PNAS.1214848109/SUPPL_FILE/PNAS.201214848SI.PDF
- Kawaguchi, R., y Bailey-Serres, J. (2005). mRNA sequence features that contribute to translational regulation in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*, 33(3), 955-965. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKI240>
- Kende, H. (1993). Ethylene biosynthesis. *Annual review of plant biology*, 44(1), 283-307.
- Kevany, B. M., Tieman, D. M., Taylor, M. G., Cin, V. D., y Klee, H. J. (2007). Ethylene receptor degradation controls the timing of ripening in tomato fruit. *The Plant Journal*, 51(3), 458-467.
- Kieber, J. J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K. A., y Ecker, J. R. (1993). CTR1, a Negative Regulator of the Ethylene Pathway in Arabidopsis: A II E-a Member of the Raf Family of Protein Kinase. *Cell*, 72, 427-441.
- Klee, H. J., y Giovannoni, J. J. (2011). Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. *Annual review of genetics*, 45, 41-59.

- Landahl, S., Meyer, M. D., y Terry, L. A. (2009). Spatial and temporal analysis of textural and biochemical changes of imported avocado cv. hass during fruit ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), 7039-7047. https://doi.org/10.1021/JF803669X/ASSET/IMAGES/LARGE/JF-2008-03669X_0005.JPEG
- Li, S., Zhu, B., Pirrello, J., Xu, C., Zhang, B., Bouzayen, M., Chen, K., y Grierson, D. (2020). Roles of RIN and ethylene in tomato fruit ripening and ripening-associated traits. *The New phytologist*, 226(2), 460-475. <https://doi.org/10.1111/NPH.16362>
- Li, W., Ma, M., Feng, Y., Li, H., Wang, Y., Ma, Y., Li, M., An, F., y Guo, H. (2015). EIN2-Directed Translational Regulation of Ethylene Signaling in Arabidopsis. *Cell*, 163(3), 670-683. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.037>
- Lieberman, M., Kunishi, A. T., Mapson, L. W., y Wardale, D. A. (1965). Ethylene production from methionine. *Biochemical Journal*, 97(2), 449-459.
- Lin, Z., Zhong, S., y Grierson, D. (2009). *Recent advances in ethylene research*. 60(12), 3311-3336. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp204>
- Liu, M., Pirrello, J., Chervin, C., Roustan, J. P., y Bouzayen, M. (2015). Ethylene Control of Fruit Ripening: Revisiting the Complex Network of Transcriptional Regulation. *Plant Physiology*, 169(4), 2380-2390. <https://doi.org/10.1104/PP.15.01361>
- Lundqvist, J., De Fraiture, C., y Molden, D. (2008). *Saving water: from field to fork: curbing losses and wastage in the food chain*.
- Ma, B., He, S. J., Duan, K. X., Yin, C. C., Chen, H., Yang, C., Xiong, Q., Song, Q. X., Lu, X., Chen, H. W., Zhang, W. K., Lu, T. G., Chen, S. Y., y Zhang, J. S. (2013). Identification of rice ethylene-response mutants and characterization of MHZ7/OsEIN2 in distinct ethylene response and yield trait regulation. *Molecular Plant*, 6(6), 1830-1848. <https://doi.org/10.1093/mp/sst087>
- Ma, B., Zhou, Y., Chen, H., He, S. J., Huang, Y. H., Zhao, H., Lu, X., Zhang, W. K., Pang, J. H., Chen, S. Y., y Zhang, J. S. (2018). Membrane protein MHZ3 stabilizes OsEIN2 in rice by interacting with its Nramp-like domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(10), 2520-2525. https://doi.org/10.1073/PNAS.1718377115/SUPPL_FILE/PNAS.1718377115.SAPP.PDF
- Magwaza, L. S., y Tesfay, S. Z. (2015). A Review of Destructive and Non-destructive Methods for Determining Avocado Fruit Maturity. *Food and Bioprocess Technology*, 8(10), 1995-2011. <https://doi.org/10.1007/S11947-015-1568-Y>
- Mayr, C. (2019). What Are 3' UTRs Doing? *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 11(10). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A034728>
- McMahon, A. C., Rahman, R., Jin, H., Shen, J. L., Fieldsend, A., Luo, W., y Rosbash, M. (2016). TRIBE: Hijacking an RNA-Editing Enzyme to Identify Cell-Specific Targets of RNA-Binding Proteins. *Cell*, 165(3), 742-753. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.03.007>
- McMurchie, E. J., McGlasson, W. B., y Eaks, I. L. (1972). Treatment of fruit with propylene gives information about the biogenesis of ethylene. *Nature*, 237(5352), 235-236.
- Merchante, C., Alonso, J. M., y Stepanova, A. N. (2013). Ethylene signaling: simple ligand, complex regulation. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(5), 554-560. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2013.08.001>
- Merchante, C., Brumos, J., Yun, J., Hu, Q., Spencer, K. R., Enríquez, P., Binder, B. M., Heber, S.,

- Stepanova, A. N., y Alonso, J. M. (2015). Gene-Specific Translation Regulation Mediated by the Hormone-Signaling Molecule EIN2. *Cell*, 163(3), 684-697. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.036>
- Miladi, M., Raden, M., Will, S., y Backofen, R. (2020). Fast and accurate structure probability estimation for simultaneous alignment and folding of RNAs with Markov chains. *Algorithms for Molecular Biology : AMB*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/S13015-020-00179-W>
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., y Kimura, T. (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104(1), 34-41. <https://doi.org/10.1263/JBB.104.34>
- O'Malley, R. C., Rodriguez, F. I., Esch, J. J., Binder, B. M., O'Donnell, P., Klee, H. J., y Bleeker, A. B. (2005). Ethylene-binding activity, gene expression levels, and receptor system output for ethylene receptor family members from Arabidopsis and tomato†. *The Plant Journal*, 41(5), 651-659. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2004.02331.X>
- Okabe, Y., Asamizu, E., Ariizumi, T., Shirasawa, K., Tabata, S., y Ezura, H. (2012). Availability of Micro-Tom mutant library combined with TILLING in molecular breeding of tomato fruit shelf-life. *Breeding Science*, 62(2), 202-208. <https://doi.org/10.1270/JSBBS.62.202>
- Potuschak, T., Lechner, E., Parmentier, Y., Yanagisawa, S., Grava, S., Koncz, C., y Genschik, P. (2003). EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two Arabidopsis F box proteins: EBF1 and EBF2. *Cell*, 115(6), 679-689. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00968-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00968-1)
- Qiao, H., Chang, K. N., Yazaki, J., y Ecker, J. R. (2009). Interplay between ethylene, ETP1/ETP2 F-box proteins, and degradation of EIN2 triggers ethylene responses in Arabidopsis. *Genes y Development*, 23(4), 512-521. <https://doi.org/10.1101/GAD.1765709>
- Qiao, H., Shen, Z., Huang, S. S. C., Schmitz, R. J., Urich, M. A., Briggs, S. P., y Ecker, J. R. (2012). Processing and subcellular trafficking of ER-tethered EIN2 control response to ethylene gas. *Science*, 338(6105), 390-393. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1225974/SUPPL_FILE/QIAO.SM.REVISION.1.PDF
- Rahman, R., Xu, W., Jin, H., y Rosbash, M. (2018). Identification of RNA-binding protein targets with HyperTRIBER. *Nature Protocols* 2018 13:8, 13(8), 1829-1849. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0020-y>
- Rennie, S., Magnusson, D. H., y Andersson, R. (2021). hyperTRIBER: a flexible R package for the analysis of differential RNA editing. *bioRxiv*, 2021.10.20.465108. <https://doi.org/10.1101/2021.10.20.465108>
- Rodríguez, F. I., Esch, J. J., Hall, A. E., Binder, B. M., Eric Schaller, G., y Bleeker, A. B. (1999). A Copper Cofactor for the Ethylene Receptor ETR1 from Arabidopsis. *Science*, 283(5404), 996-998. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.283.5404.996>
- Sakai, H., Hua, J., Chen, Q. G., Chang, C., Medrano, L. J., Bleeker, A. B., y Meyerowitz, E. M. (1998). ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signaling in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(10), 5812-5817. <https://doi.org/10.1073/PNAS.95.10.5812/ASSET/0569509B-B00E-45FD-ABB2-B761E749DDEF/ASSETS/GRAPHIC/PQ0980761005.JPEG>

- Sato, K., Akiyama, M., y Sakakibara, Y. (2021). RNA secondary structure prediction using deep learning with thermodynamic integration. *Nature Communications* 2021 12:1, 12(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21194-4>
- Schaller, G. E., y Bleecker, A. B. (1995). Ethylene-Binding Sites Generated in Yeast Expressing the Arabidopsis ETR1 Gene. *Science*, 270(5243), 1809. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.270.5243.1809>
- Scharein, B., y Groth, G. (2011). Phosphorylation Alters the Interaction of the Arabidopsis Phosphotransfer Protein AHP1 with Its Sensor Kinase ETR1. *PLOS ONE*, 6(9), e24173. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0024173>
- Scharein, B., Voet-van-Vormizeele, J., Harter, K., y Groth, G. (2008). Ethylene signaling: Identification of a putative ETR1–AHP1 phosphorelay complex by fluorescence spectroscopy. *Analytical Biochemistry*, 377(1), 72-76. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2008.03.015>
- Seymour, G. B., Graham, B., Chapman, Natalie, H., Chew, L, B., Rose, y K, C. J. (2013). Regulation of ripening and opportunities for control in tomato and other fruits. *Plant Biotechnology Journal*, 11(3), 269-278.
- Seymour, G. B., Østergaard, L., Chapman, N. H., Knapp, S., y Martin, C. (2013). Fruit ripening and development. *Annu. Rev. Plant Biol*, 64, 219-241.
- Soderlund, C., Descour, A., Kudrna, D., Bomhoff, M., Boyd, L., Currie, J., Angelova, A., Collura, K., Wissotski, M., Ashley, E., Morrow, D., Fernandes, J., Walbot, V., y Yu, Y. (2009). Sequencing, Mapping, and Analysis of 27,455 Maize Full-Length cDNAs. *PLOS Genetics*, 5(11), e1000740. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1000740>
- Tieman, D. M., Ciardi, J. A., Taylor, M. G., y Klee, H. J. (2001). Members of the tomato LeEIL (EIN3-like) gene family are functionally redundant and regulate ethylene responses throughout plant development. *The Plant Journal*, 26(1), 47-58.
- Ule, J., Jensen, K., Mele, A., y Darnell, R. B. (2005). CLIP: a method for identifying protein-RNA interaction sites in living cells. *Methods (San Diego, Calif.)*, 37(4), 376-386. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2005.07.018>
- Ulusik, S., Chapman, N. H., Smith, R., Poole, M., Adams, G., Gillis, R. B., Besong, T. M. D., Sheldon, J., Stieglmeyer, S., Perez, L., Samsulrizal, N., Wang, D., Fisk, I. D., Yang, N., Baxter, C., Rickett, D., Fray, R., Blanco-Ulate, B., Powell, A. L. T., ... Seymour, G. B. (2016). Genetic improvement of tomato by targeted control of fruit softening. *Nature Biotechnology* 2016 34:9, 34(9), 950-952. <https://doi.org/10.1038/nbt.3602>
- United Nations Department of Economic and Social Affairs, P. D. (2022). *World Population Prospects 2022: Summary of Results*. <https://www.un.org/development/desa/pd/content/World-Population-Prospects-2022>
- Wang, G.-F., y Balint-Kurti, P. J. (2015). Cytoplasmic and nuclear localizations are important for the hypersensitive response conferred by maize autoactive Rp1-D21 protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(9), 1023-1031.
- Wang, K. L.-C., Li, H., y Ecker, J. R. (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. *The plant cell*, 14(suppl_1), S131-S151.
- Wang, R.-H., Yuan, X.-Y., Meng, L.-H., Zhu, B.-Z., Zhu, H., Luo, Y.-B., y Fu, D.-Q. (2016). Transcriptome analysis provides a preliminary regulation route of the ethylene signal transduction component, SIEIN2, during tomato ripening. *PLoS One*, 11(12), e0168287.

- Wang, R., Angenent, G. C., Seymour, G., y de Maagd, R. A. (2020). Revisiting the role of master regulators in tomato ripening. *Trends in plant science*, 25(3), 291-301.
- Wang, W., Esch, J. J., Shiu, S. H., Agula, H., Binder, B. M., Chang, C., Patterson, S. E., y Bleeker, A. B. (2006). Identification of Important Regions for Ethylene Binding and Signaling in the Transmembrane Domain of the ETR1 Ethylene Receptor of Arabidopsis. *The Plant Cell*, 18(12), 3429-3442. <https://doi.org/10.1105/TPC.106.044537>
- Wen, C.-K. (2014). *Ethylene in plants*. Springer.
- Wen, X., Zhang, C., Ji, Y., Zhao, Q., He, W., An, F., Jiang, L., y Guo, H. (2012). Activation of ethylene signaling is mediated by nuclear translocation of the cleaved EIN2 carboxyl terminus. *Cell Research* 2012 22:11, 22(11), 1613-1616. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.145>
- Wilkinson, J. Q., Lanahan, M. B., Yen, H. C., Giovannoni, J. J., y Klee, H. J. (1995). An Ethylene-Inducible Component of Signal Transduction Encoded by Never-ripe. *Science*, 270(5243), 1807. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.270.5243.1807>
- Xu, W., Rahman, R., y Rosbash, M. (2018). Mechanistic implications of enhanced editing by a HyperTRIBE RNA-binding protein. *RNA*, 24(2), 173-182. <https://doi.org/10.1261/RNA.064691.117>
- Yang, L., Huang, W., Xiong, F., Xian, Z., Su, D., Ren, M., y Li, Z. (2017). Silencing of SIPL, which encodes a pectate lyase in tomato, confers enhanced fruit firmness, prolonged shelf-life and reduced susceptibility to grey mould. *Plant Biotechnology Journal*, 15(12), 1544-1555. <https://doi.org/10.1111/PBI.12737>
- Yang, S. F., y Hoffman, N. E. (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual review of plant physiology*, 35(1), 155-189.
- Zdarska, M., Cuyacot, A. R., Tarr, P. T., Yamoune, A., Szmikowska, A., Hrdinová, V., Gelová, Z., Meyerowitz, E. M., y Hejátko, J. (2019). ETR1 Integrates Response to Ethylene and Cytokinins into a Single Multistep Phosphorelay Pathway to Control Root Growth. *Molecular Plant*, 12(10), 1338-1352. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.05.012>
- Zhang, C., Huang, W., Liang, X., He, X., Tian, X., Chen, L., y Wang, Q. (2022). Slight crack identification of cottonseed using air-coupled ultrasound with sound to image encoding. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.956636>
- Zhang, F., Wang, L., Qi, B., Zhao, B., Ko, E. E., Riggan, N. D., Chin, K., y Qiao, H. (2017). EIN2 mediates direct regulation of histone acetylation in the ethylene response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(38), 10274-10279. https://doi.org/10.1073/PNAS.1707937114/SUPPL_FILE/PNAS.201707937SI.PDF
- Zhong, S., Lin, Z., y Grierson, D. (2008). Tomato ethylene receptor–CTR interactions: visualization of NEVER-RIPE interactions with multiple CTRs at the endoplasmic reticulum. *Journal of Experimental Botany*, 59(4), 965-972. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERN021>

