



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

Centro de ciencias básicas  
Doctorado en ciencias biológicas

TESIS

Estudio y análisis de genes de maduración en *Psidium guajava* L.

PRESENTA

Mario Alejandro Mejía Mendoza para optar por el grado de Doctor en  
Ciencias Biológicas

TUTOR

Dr. José Francisco Morales Domínguez

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORAL

Dra. Cristina Garcidueñas Piña  
Dr. Gilberto Alejandro Ocampo Acosta  
Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa

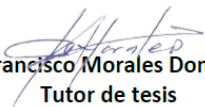
Aguascalientes, México, Junio de 2022

**Jorge Martin Alférez Chávez**  
**DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS**  
**P R E S E N T E**

Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado del estudiante **MARIO ALEJANDRO MEJIA MENDOZA** con ID [131653](#) quien realizó la tesis titulada: **ESTUDIO Y ANÁLISIS DE GENES DE MADURACIÓN EN *PSIDIUM GUAJAVA* L.** un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla, así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"Se Lumen Proferre"**  
**Aguascalientes, Ags., a 1 de abril de 2022.**



**José Francisco Morales Domínguez**  
**Tutor de tesis**

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.  
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.  
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

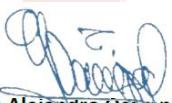
Código: DO-SEE-FO-16  
Actualización: 00  
Emisión: 17/05/19

**Jorge Martin Alf3rez Ch3vez**  
**DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS B3SICAS**  
**P R E S E N T E**

Por medio del presente como **Miembros del Comit3 Tutorial** designado del estudiante **MARIO ALEJANDRO MEJIA MENDOZA** con ID [131653](#) quien realiz3 la tesis titulada: **ESTUDIO Y AN3LISIS DE GENES DE MADURACI3N EN *PSIDIUM GUAJAVA* L.** un trabajo propio, innovador, relevante e in3dito y con fundamento en el Art3culo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versi3n final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que 3l pueda proceder a imprimirla, as3 como continuar con el procedimiento administrativo para la obtenci3n del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideraci3n y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"Se Lumen Proferre"**  
**Aguascalientes, Ags., a 1 de abril de 2022.**



**Gilberto Alejandro Ocampo Acosta**  
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretar3a T3cnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.  
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gesti3n de Calidad.  
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

C3digo: DO-SEE-FO-16  
Actualizaci3n: 00  
Emisi3n: 17/05/19

**Jorge Martin Alf3rez Ch3vez**  
**DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS B3SICAS**  
**P R E S E N T E**

Por medio del presente como **Miembros del Comit3 Tutorial** designado del estudiante **MARIO ALEJANDRO MEJIA MENDOZA** con ID [131653](#) quien realiz3 la tesis titulada: **ESTUDIO Y AN3LISIS DE GENES DE MADURACI3N EN *PSIDIUM GUAJAVA* L.** un trabajo propio, innovador, relevante e in3dito y con fundamento en el Art3culo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versi3n final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que 3l pueda proceder a imprimirla, as3 como continuar con el procedimiento administrativo para la obtenci3n del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideraci3n y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"Se Lumen Proferre"**  
**Aguascalientes, Ags., a 1 de abril de 2022.**



**Cristina Garcidueñas Piña**  
**Asesor de tesis**

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretar3a T3cnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.  
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gesti3n de Calidad.  
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.


C3digo: DO-SEE-FO-16  
Actualizaci3n: 00  
Emisi3n: 17/05/19

**Jorge Martin Alférez Chávez**  
**DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS**  
**P R E S E N T E**

Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado del estudiante **MARIO ALEJANDRO MEJIA MENDOZA** con ID [131653](#) quien realizó la tesis titulada: **ESTUDIO Y ANÁLISIS DE GENES DE MADURACIÓN EN *PSIDIUM GUAJAVA* L.** un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que él pueda proceder a imprimirla, así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"Se Lumen Proferre"**  
**Aguascalientes, Ags., a 1 de abril de 2022.**



**Blanca Estela Barrera Figueroa**  
**Co-Tutor de tesis**

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.  
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.  
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-16  
Actualización: 00  
Emisión: 17/05/19



DICTAMEN DE LIBERACION ACADEMICA PARA INICIAR LOS TRAMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 01-jun-22

NOMBRE: MARIO ALEJANDRO MEJÍA MENDOZA ID: 131653
PROGRAMA: DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS LGAC (del posgrado): BIOTECNOLOGÍA Y BIOQUÍMICA VEGETAL Y ANIMAL
TIPO DE TRABAJO: ( X ) Tesis ( ) Trabajo práctico
TÍTULO: Estudio y análisis de genes de maduración en Psidium guajava L.
IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):

CONTRIBUYE A LA OBTENCIÓN D EUN PRODUCTO MADURO CON SUFICIENTE TIEMPO D EANAQUEL

INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

- SI El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
NO Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

El egresado cumple con lo siguiente:

- SI Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
SI Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
NO Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI Coincide con el título y objetivo registrado
SI Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI Tiene el CVU del Conacyt actualizado
SI Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados:

- NA Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
SI El estudiante es el primer autor
SI El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
SI En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
NA Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
SI La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

Si SI
No

FIRMAS

Elaboró: \* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADESCRIPCION: DRA. ILIANA ERNESTINA MEDINA RAMÍREZ
NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO: DRA. ALMA LILIAN GUERRERO BARRERA
Revisó: NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO: DRA. HAYDÉE MARTÍNEZ RUVALCABA
Autorizó: NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO: M. en C. JORGE MARTÍN ALÍE REZ CHÁVEZ

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

RESEARCH

Open Access



# Identification in silico and expression analysis of a $\beta$ -1-4-endoglucanase and $\beta$ -galactosidase genes related to ripening in guava fruit

Mario A. Mejía-Mendoza<sup>1</sup>, Cristina Garcidueñas-Piña<sup>1</sup>, José S. Padilla-Ramírez<sup>2</sup>, Ruth E. Soria-Guerra<sup>3</sup> and José Francisco Morales-Domínguez<sup>1\*</sup>

**Abstract**

**Background:** Guava fruit softening is a crucial process during ripening and this process involves a number of enzymes that modifies the cell wall. Two of the enzymes that regulate this process are (a) the  $\beta$ -1, 4-endoglucanase 17 (BEG) which hydrolyze  $\beta$ -1, 4 bonds from cellulose and hemicellulose, and (b)  $\beta$ -galactosidase (BGA) that hydrolyzes pectin chains. Bioinformatics and expression analysis information on these genes is limited in guava fruit.

**Results:** A fragment of a  $\beta$ -1, 4-endoglucanase 17 (*PgE17*), and another of a  $\beta$ -galactosidase (*PgGa1*) were identified. These sequences have a similarity of more than 85% with those reported in the NCBI database. In the guava genome, one homologous sequence was found for *PgE17* in Chr 4 and two homologous to *PgGa1*: one in Chr 3 and the other one in Chr 6. Putative protein PgE17 contains part of the glyco\_hydro\_9 domain. Putative protein PgGa1 has a part of the glyco\_hydro\_35 domain. Phylogenetic analysis of *PgE17* and *PgGa1* revealed that both are highly conserved inside the *Myrtaceae* family. In silico expression analysis showed that both *PgE17* and *PgGa1* work in a coordinated way with other cell wall modifier enzymes. Expression of these genes was found in all the guava samples analyzed. However, the highest expression was found in the fruit in the breaking and ripe states.

**Conclusions:** A  $\beta$ -1, 4-endoglucanase 17, and  $\beta$ -galactosidase 1 sequences were identified. *PgE17* and *PgGa1* are expressed in all the plant tissues, and fruit ripening states. Although, the highest expression was on breaker and ripe states.

**Keywords:** *Psidium guajava*, Cell wall, Expression analysis, Bioinformatic analysis, Cell elongation, Fruit softening

**Background**

The guava plant (*Psidium guajava* L.) belongs to the *Myrtaceae* family, and it grows on tropical and sub-tropical areas around the globe. Guava fruit has important nutritional properties like the high content of C vitamin of approximately 80–100 mg per gram of fruit [1]. Also,

it is rich in tannins, tri-terpenes, flavonoids, saponins, lecithin, potassium, and soluble fiber [2]. In México, the guava fruit is one of the most important crops, and the most cultivated cv is the "media china"; which is characterized by its pale pink pulp color, intense sweet flavor, and significant commercial value due to its high demand on food and medicinal products [1]. Recent studies shows that ripening related enzymes and mechanical stresses during post-harvest period alters the cell wall (CW) structure damaging the fruit [3].

\*Correspondence: [francisco.morales@edu.uas.mx](mailto:francisco.morales@edu.uas.mx)  
<sup>1</sup>Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA), Av. Universidad, #940, Ciudad Universitaria, C.P. 20100, Aguascalientes, Aguascalientes, México  
 Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2021. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## Agradecimientos

El presente trabajo fue posible gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo otorgado para realizar mis estudios en el Doctorado en Ciencias Biológicas.

A mi tutor de tesis, el Dr. José Francisco Morales Domínguez, que gracias a su guía, paciencia, apoyo y motivación se logró el inicio y conclusión de este trabajo.

De igual forma se agradece a mi comité tutorial, el Dr. Gilberto Alejandro Ocampo Acosta, la Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa y la Dra. Cristina Garcidueñas Piña, por siempre leer los avances y asesorarme con observaciones pertinentes y alentadoras.

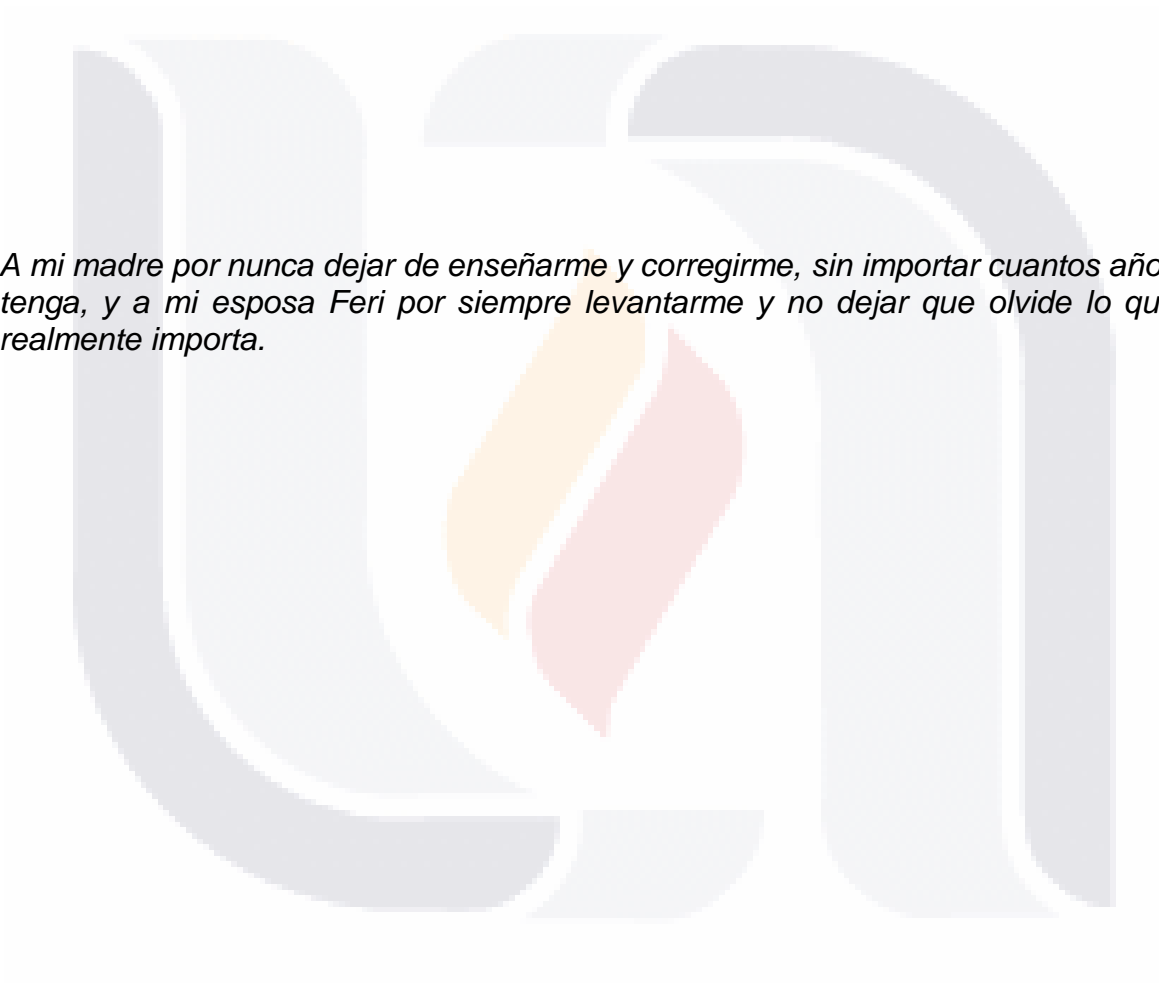
Al Dr. José Saúl Padilla Ramírez por todo el apoyo brindado en estos tres años con el material vegetal necesario para la realización de este proyecto, y a todos los profesores que se dieron a la tarea de animar y promover el cariño a la investigación, sin ellos no hubiera podido aprender y desarrollar las habilidades de un investigador, así como creer en mí mismo para concluir esta tesis.

A mi madre que siempre estuvo detrás de mí dando su apoyo incondicional y a su deliciosa comida que siempre me inspiró a seguir trabajando los domingos.

A Feri, mi amada esposa, mi motor para continuar y no desistir hasta el fin, sin ella, simplemente esto no estaría escrito.



## Dedicatoria



*A mi madre por nunca dejar de enseñarme y corregirme, sin importar cuantos años tenga, y a mi esposa Feri por siempre levantarme y no dejar que olvide lo que realmente importa.*

**Índice general**

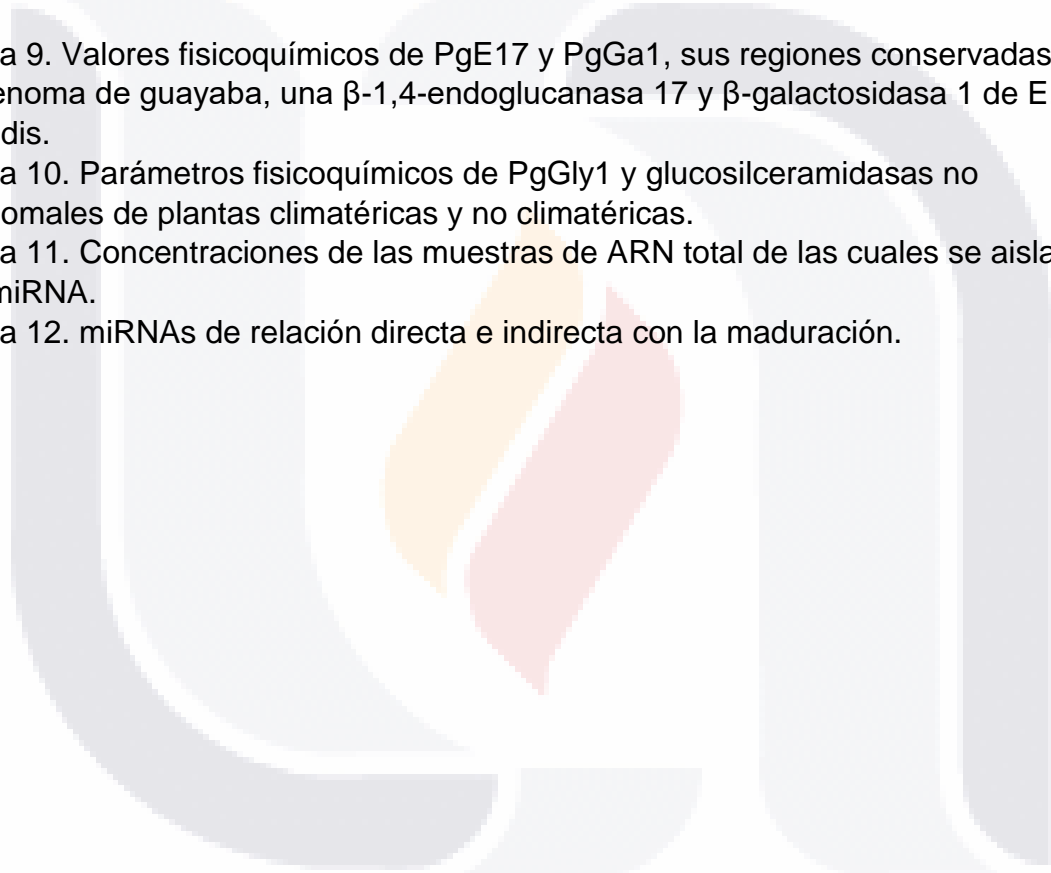
I. INTRODUCCIÓN	12
II. ANTECEDENTES	15
2.1 Origen y distribución de la guayaba	15
2.2 Importancia de la guayaba en México	15
2.3 La guayaba en Aguascalientes	17
2.4 Descripción botánica	17
2.5 Maduración de frutos	18
2.6 Regulación de la maduración	22
2.7 Antecedentes de análisis de expresión de genes de maduración	24
2.8 Metabolismo de lípidos en plantas	26
2.9 miRNAs	28
2.9.1 miRNAs y silenciamiento de genes	29
III. JUSTIFICACIÓN	31
IV. HIPÓTESIS	31
V. OBJETIVOS	32
5.1 Objetivo general	32
5.2 Objetivos específicos	32
VI. METODOLOGÍA	33
6.1 Recolección de material vegetal	33
6.2 Extracción de ARN total	33
6.3 Diseño de oligonucleótidos degenerados para genes de interés	34
6.4 RT-PCR de las muestras de ARN	35
6.5 Purificación de productos de RT-PCR	36
6.6 Clonación de los fragmentos de los genes de interés	36
6.6.1 Ligación	36
6.6.2 Células competentes	36
6.6.3 Transformación de células competentes	37
6.6.4 Extracción de plásmidos por el método de Miniprep Birnboim Dolly	37
6.7 Secuenciación y análisis bioinformático de productos de RT-PCR	38
6.8 Análisis de expresión mediante qRT-PCR de los genes de interés	39
6.9 Construcción de bibliotecas de miRNAs	40
6.9.1 Cuantificación y verificación de la integridad de las muestras	40

6.9.2 Aislamiento de miRNAs a partir de muestras de ARN total	40
6.9.3 Precipitación de miRNAs	41
6.9.4 Ligación del adaptador 3' Linker1	41
6.9.5 Ligación del adaptador 5'	42
6.9.6 Síntesis de ADNc	43
6.9.7 Asignación de índices para las librerías de miRNA	44
6.9.8 Electroforesis de PCR de librerías	45
6.9.9 Digestión de las librerías con EcoR1	45
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
7.1 Extracción de ARN de guayaba	46
7.2 Cuantificación de ARN	47
7.3 RT-PCR de los genes de interés	48
7.4 Secuenciación de productos de RT-PCR	50
7.5 Análisis bioinformático de los genes de interés	50
7.5.1 Análisis de similitud nucleotídico y aminoacídico de los genes de interés	51
7.5.2 Análisis de similitud de PgE17 y PgGa1 y genomas de guayaba y <i>E. grandis</i> .	53
7.5.3 Análisis fisicoquímico de las proteínas putativas	56
7.5.4 Identificación de dominios conservados en los genes de interés	60
7.6 Análisis filogenético de los genes de interés	62
7.7 Análisis de co-expresión <i>in sillico</i> de los genes de interés	64
7.8 Análisis de expresión qRT-PCR de genes de interés	69
7.9 Modelado 3D de PgGly1	73
7.10 Construcción de librerías de miRNAs	74
7.10.1 Cuantificación de ARN para librerías	74
7.10.2 Aislamiento de miRNAs	75
7.10.3 Electroforesis y asilamiento del producto de RT-PCR de las librerías	76
7.10.4 Digestión de las librerías con <i>EcoR1</i>	77
7.10.5 Identificación, distribución y tamaño de miRNAs encontrados en guayaba	77
7.10.6 Análisis filogenético de los miRNAs de guayaba	79
7.10.7 Identificación de miRNAs expresados en estadio maduro y rayado	80
7.10.8 Identificación de miRNAs relacionados al proceso de maduración	87
VIII. CONCLUSIÓN	89
IX. REFERENCIAS	90



**Índice de tablas**

Tabla 1. Producción nacional de la guayaba.	16
Tabla 2. Características de los oligonucleótidos diseñados para PCR	35
Tabla 3. Oligonucleótidos para qRTPCR	39
Tabla 4. Secuencias de los índices Illumina.	44
Tabla 5. Cuantificación y parámetros de calidad de ARN obtenido.	47
Tabla 6. Tamaño, nombre y gen al que pertenecen los fragmentos obtenidos.	50
Tabla 7. Secuencias similares a PgE17 encontradas en el genoma de E. grandis	54
Tabla 8. Secuencias similares a PgGa1 encontradas en el genoma de E. grandis	55
Tabla 9. Valores fisicoquímicos de PgE17 y PgGa1, sus regiones conservadas en el genoma de guayaba, una $\beta$ -1,4-endoglucanasa 17 y $\beta$ -galactosidasa 1 de E. grandis.	58
Tabla 10. Parámetros fisicoquímicos de PgGly1 y glucosilceramidases no lisosomales de plantas climatéricas y no climatéricas.	59
Tabla 11. Concentraciones de las muestras de ARN total de las cuales se aislaron los miRNA.	75
Tabla 12. miRNAs de relación directa e indirecta con la maduración.	88



**Índice de figuras**

Figura 1. Tipos de esfingolípidos.	26
Figura 2. Material vegetal recolectado.	33
Figura 3. Ligación del adaptador 3' Linker1.	42
Figura 4. Ligación del adaptador 5'.	43
Figura 5. Síntesis de ADNc de la librería de miRNA.	43
Figura 6. RT-PCR e inserción de índices a las librerías de miRNA.	45
Figura 7. Muestras de ARN de diferentes tejidos de la guayaba.	46



## ACRÓNIMOS

1-MCP: 1-metilciclopropano

30GH: glucosil hidrolasa 30

116GH: glucosil hidrolasa 116

ABA: ácido abscísico

ACC: 1-ácido carboxílico-1-aminociclo propano

ACCo: ACC oxidasa

ADNc: ácido desoxirribonucleico (ADN) complementario

AGO1: proteína argonauta-1

ARFs: factores de respuesta a auxinas

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ARNs: ARN pequeños

ASRs: familia de proteínas inducidas por ABA, maduración y estrés

ATP: adenosín trifosfato

AVG: aminoetoxiniglicina

BLASTn: del inglés Basic Local Alignment Search Tool, herramienta básica de búsqueda de alineación local de nucleótidos

BLASTp: del inglés Basic Local Alignment Search Tool, herramienta básica de búsqueda de alineación local de nucleótidos

CCSD1: Chaperona Cu/Zn superóxido dismutasa-1

CSD1 y CSD2: Cu/Zn superóxido dismutasa 1 y 2

CoA: coenzima A

CODEHOP: del inglés COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer, programa de cebador de oligonucleótidos híbridos degenerados de consenso

CTAB: del inglés Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, bromuro de hexadeciltrimetilamonio

DDT: diclorodifeniltricloroetano

DEPC: agua tratada con dietilpirocarbonato

dNTP's: deoxinucleótido trifosfatos

DUF608: en inglés, Domain of Unknown Function sitio catalítico del dominio C.terminal

EcoR1: enzima de restricción de *Escherichia coli*

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EROS: especies reactivas de oxígeno

ETR1: receptor de etileno 1

ExpPASy: del inglés Expert Protein Analysis System, sistema expert de análisis de proteínas

Factores de transcripción GRAS: GIBBERELLIN-INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR OF GA1-3 (RGA)AND SCARECROW (SCR)

GB1: glucocerebrosidase

GB2:  $\beta$ -glucosidasa

GCR: glucosil glucosilceramidasa

GH9: familia 9 de las glucosilhidrolasas

GH35: familia glucosil hidrolasas 35

GH116: familia glucosil hidrolasas 116

GIPCs: glucosil inositolfosforilcereamidas

GRAVY: índice de hidropaticidad

HD-ZipIII: homeodominio-Leu-Zinc III

INIFAP: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

LB: medio Luria Bertani

LBC: cadenas base largas de lípidos

LCB-C4: hidroxilasa de bases de cadenas largas

LCPL: cadenas largas de lípidos polares

MALDI TOF-MS: del inglés Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry

Miniprep Birboim: método de extracción de ADN plasmídico

miRNA: micro-RNA

MOPS: del inglés 4-Morpholinepropanesulfonic acid, 3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid

MPg: miRNAs encontrados en estadio maduro



NBS-LRR: dominio de sitio de unión a receptores ricos en leucina

NCBI: del inglés National Center for Biotechnology Information, Centro Nacional de Información Biotecnológica

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

pH: potencial de hidrógeno

pl: punto isoeléctrico

PPO: polifenol oxidasa

PVP: polivinilpirrolidona

RA5: adaptador RNA 5'

RAN1: proteína respondedora de antagonista 1

RPg: miRNAs encontrados en estadio rayado

RT-PCR: transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa

S1P: esfingosina-1-fosfato

SAM: S-Adenosín metionina

SAM: meristemos apicales en tallo

STRING: del inglés Protein-Protein Interaction Networks Functional Enrichment Analysis, plataforma análisis de enriquecimiento funcional de redes de interacción proteína-proteína

TAE: buffer tris-acetato-EDTA

TBE: buffer tris-borato-EDTA

TBLASTn: Protein to Nucleotide BLAST

TCP: factores de transcripción

EOSINTEBRANCHED1/CYCLOIDEA/PROLIFERATING CELL FACT

Técnica RACE: la amplificación rápida de extremos de ADNc

TEMED: tetrametiletilendiamina

TMV: virus del mosaico del tabaco

Tris-HCl: tris(hidroximetil)aminometano

UDP-galactosa: uridina difosfato galactosa

UDP-glucosa: uridina difosfato glucosa

UNIPROT: del inglés de universal protein, es un repositorio central de datos gratuito sobre proteínas

q-RTPCR: del inglés reverse transcription-polymerase chain reaction, transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

XET: xiloglucan endotransglucosilasa

XHT: xiloglucan hidrolasa

XTH/XET: xiloglucan endotransglucosilasa/hidrolasa



## RESUMEN

La guayaba (*Psidium guajava* L.) es de los frutales más importantes económica y socialmente en México. Sin embargo, la sobre maduración y mal manejo postcosecha causan graves pérdidas económicas para los productores. La maduración del fruto depende de la respiración y producción de etileno que es regulada por enzimas que modifican sus características organolépticas. Algunas de estas enzimas modifican la pared celular ablandando el fruto y son reguladas por sistemas endógenos como los microRNA (miRNA) que actúan a nivel postranscripcional. En este trabajo se identificó y analizó la expresión de 3 fragmentos de los genes  $\beta$ -1,4-endoglucanasa 17 (*PgE17*),  $\beta$ -galactosidasa 1 (*PgGa1*) y glucosilceramidasa no lisosomal (*PgGly1*) en guayaba. La secuencia putativa de la proteína *PgE17* tiene una similitud del 98 % con una secuencia homóloga en el cromosoma 4 del genoma de guayaba, además de contener parte del dominio Glyco\_hydro\_9. La secuencia aminoacídica putativa de *PgGa1* tiene una similitud del 98.2 % con una secuencia del cromosoma 10 de guayaba y además, contiene parte del dominio Glyco\_hydro\_35. Por último, la secuencia putativa de la proteína *PgGly1* obtuvo una similitud de 92 % con una glucosilceramidasa no lisosomal de *Eucalyptus grandis*, además de contener el motivo YMRPLAIWAMQWAL. El análisis filogenético agrupó las 3 secuencias dentro de la familia *Myrtaceae*. La expresión de los 3 genes fue en todos los tejidos, siendo la más alta de *PgE17* y *PgGa1* en los estadios rayado y maduro, y la más alta de *PgGly1* en hoja, tallo y estadio sobre maduro.

En el análisis de miRNA se identificaron 29 familias expresadas durante los estadios rayado y maduro, de las cuales 27 se expresaron en el fruto maduro y 17 en el rayado. De estas familias, las denominadas 159, 160, 166, 171, 319 y 535 mostraron relación directa con la maduración, involucradas en la biosíntesis de etileno o en la modificación de pared celular, y las denominadas 169, 395, 398, 528 y 2120 tuvieron relación indirecta participando como factores de crecimiento o enzimas secundarias.

## ABSTRACT

Guava (*Psidium guajava* L.) is one of the most economically and socially important cultivars in Mexico, nevertheless, over ripening and bad post-harvest management causes monetary losses for the producers. Guava fruit ripening process depends on its ethylene breathing and production levels, which are regulated by enzymes that modifies the organoleptic properties of the fruit. Some of these enzymes modifies the cell wall causing the softening of the fruit and are regulated by endogenous systems such as the microRNAs (miRNA) which acts at a posttranscriptional level. In this work, three fragments belonging to  $\beta$ -1-4-endoglucanase 17 (*PgE17*),  $\beta$ -galactosidase 1 (*PgGa1*) and non-lysosomal glucosylceramidase (*PgGly1*) genes and its expression levels were identified and measured in guava. Putative protein sequence *PgE17* has a 98 % of similitude with a sequence in the 4<sup>th</sup> chromosome of guava genome, also contains part of the Glyco\_hydro\_9 domain. Aminoacidic putative sequence *PgGa1* has a 98.2 % of similitude with a sequence found inside the 10th chromosome of guava genome, part of the Glyco\_hydro\_35 domain was also found inside the sequence. At last, putative sequence of the protein *PgGly1* has a 92 % similitude with a non-lysosomal glucosylceramidase of *Eucalyptus grandis*, and contains the YMRPLAIWAMQWAL motif. Phylogenetic analysis grouped the 3 fragments inside the *Myrtaceae* family. Expression of the 3 genes were found in all tissues, being the highest in the breaker and ripe states for *PgGa1* and *PgE17* and leaves, stem and over ripe state the highest for *PgGly1*.

In the miRNA analysis a total of 29 different families were identified. In the ripe state the expression of 27 of these families were observed, and only 17 in the breaker state. Families 159, 160, 166, 171, 319 and 535 showed a directly relationship with the ripening process (ethylene biosynthesis and cell wall modification), and families 169, 395, 398, 528 and 2120 showed to be indirectly related (growing factors and secondary enzymes).

## I. INTRODUCCIÓN

En México, la guayaba es una fruta que se ha cultivado por más de un siglo, lo que le confiere una importancia económica, social y regional. Este fruto ha tenido un potencial productivo alto en el mercado a largo plazo, haciéndolo un cultivo rentable y adecuado al tipo de agronomía que se maneja en México. El fruto del guayabo cuenta con una alta demanda a nivel internacional, debido a la gran cantidad de productos de alto valor nutrimental que se derivan de ellas; que van desde los dulces hasta las frutas en conserva. En Aguascalientes, la mayor parte de la producción de este fruto se concentran en el municipio de Calvillo, ocupando el segundo lugar de producción a nivel nacional, sólo después de Michoacán. Esto genera divisas y empleos a miles de productores. La calidad del sabor, olor y color de la guayaba que se produce en Aguascalientes es reconocida a nivel mundial, por lo que se han establecido estándares rigurosos para mantener la calidad de exportación. En especial se debe cuidar el fruto durante todas sus etapas de maduración, en el manejo postcosecha y de transporte. Actualmente se siguen desarrollando técnicas y metodologías para evitar daños de tipo mecánico y asegurar que la vida de anaquel del fruto sea larga y llegue en las mejores condiciones posibles desde el árbol a la mesa del consumidor. El estudio biológico-molecular de la maduración del fruto es esencial para entender los mecanismos de este proceso en todas sus etapas, y con esto lograr el desarrollo de nuevas técnicas que permitan mejorar la calidad del fruto e incluso tener impacto en los costos de producción y exportación. La maduración de un fruto climatérico requiere de una serie de reacciones bioquímicas reguladas por el etileno. El etileno es biosintetizado en el ciclo de Yang, a partir de metionina se genera S-Adenosín metionina (SAM) que es transformada a 1-ácido carboxílico-1-aminociclo propano (ACC), el cual es oxidado a etileno por acción de la enzima ACC oxidasa (Binder, 2020). Además, la producción de etileno está controlada por una serie de enzimas importantes, tanto promotoras como inhibidoras como las poligalacturonasas (Vera et al., 2015) que actúan en la degradación de carbohidratos complejos a azúcar sencillos en la pared celular y en

el mesocarpio del fruto, lo que modifica la firmeza, sabor y la generación de compuestos orgánicos volátiles.

Durante la maduración del fruto, existen cambios físicos, que se caracterizan por el cambio de color, incremento de sabor, dulzura y ablandamiento del fruto (Orathai et al., 2015). El ablandamiento del fruto está directamente relacionado con la modificación de la lámina primaria de la pared celular, donde se encuentra las microfibrillas de celulosa embebidas en una red de hemicelulosa y pectina. Estos cambios son regulados por diferentes enzimas que actúan en conjunto durante la maduración, como las  $\beta$ -1,4-endoglucanasas y las xiloglucanasas.

Se sabe que existe la necesidad e interés por mejorar tanto la calidad del fruto para aumentar la vida de anaquel (Fruticultores 2010, PEGUAM, 2010). El conocimiento de los procesos bioquímicos y moleculares que participan en la maduración, como los involucrados en la modificación de la pared celular, facilitará su manipulación para mejorar las características del fruto.

Por lo anterior, en este trabajo se identificó y analizó la expresión de los fragmentos de tres genes relacionados con el proceso de maduración de la guayaba:  $\beta$ -galactosidasa 1 (*PgGa1*),  $\beta$ -1,4-endoglucanasa (*PgE17*) y glucosilceramidasa no lisosomal (*PgGly1*). Mediante análisis bioinformáticos BLASTn y BLASTp se encontraron en los cromosomas 4 y 6 de guayaba secuencias similares a los fragmentos de *PgE17* y *PgGa1*, con una similitud del 98 y 98.2 %, respectivamente, y para el fragmento *PgGly1* se encontró una similitud del 92 % con una glucosilceramidasa no lisosomal de *E. grandis*. También se encontró parte de los dominios Glyco\_hydro\_35 y Glyco\_hydro\_9 dentro de las secuencias aminoacídicas putativas de *PgGa1* y *PgE17*, respectivamente. El análisis filogenético agrupó a los 3 fragmentos dentro de la familia *Myrtaceae*. Por otra parte, el análisis de co-expresión de los 3 fragmentos, reveló que actúan de manera conjunta con enzimas relacionadas con la expansión de la pared celular como las xiloglucan endotransglucosilasas y expansinas, y con la generación de compuestos volátiles que modifican el sabor y olor de las frutas en maduración. El análisis de qRT-PCR reveló que aunque los 3 genes se expresaron en todos los tejido analizados, la de

*PgE17* y *PgGa1* fue mayor en los estadios rayado y maduro, y la de *PgGly1* tallo en fruto sobre maduro.

Por último, se identificaron 77 secuencias de miRNA maduro expresados durante los estadios de fruto rayado y maduro, que se clasificaron en 28 familias. En el estadio maduro se observó la expresión de 27 de estas familias, mientras que en el rayado solo 17. Las familias denominadas 159, 160, 166, 171, 319 y 535 mostraron estar directamente relacionados al proceso de maduración (biosíntesis de etileno y modificación de pared celular), mientras que las denominadas 169, 395, 398, 528 y 2120 mostraron una relación indirecta (factores de crecimiento y enzimas secundarias).



## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Origen y distribución de la guayaba

La guayaba tiene su origen en los trópicos de Mesoamérica del viejo mundo, aunque ahora es considerada nativa de México y se extiende por todo Sur América, Europa, África y Asia (Urquía et al., 2021). Evidencia arqueológica reciente, muestra que ha sido usada y conocida ampliamente en Perú antes de que Colombia existiera. Crece en todas las áreas tropicales y subtropicales en el mundo y se adapta perfectamente a cualquier condición climática diferente, pero es preferente del clima seco (Pérez et al., 2008). Esto ha hecho que su distribución haya llegado a más de 60 países con bajas latitudes. Su crecimiento es óptimo a temperaturas de entre 15 y 30 °C, mientras que a bajas temperaturas el desarrollo de su fruto se ve gravemente afectado. La cantidad de agua para la manutención de este cultivo se encuentra entre los 1000 a 2000 mm por año (Fisher y Melgarejo, 2021).

Esta planta en la actualidad se cultiva desde las costas del este de África a la región pacífica, incluida China e India, con variedades que originalmente se introdujeron hace más de 300 años desde América. Generalmente la planta de la guayaba se distribuye de una manera tan fácil por los trópicos debido a que acepta muchos tipos de suelos y sus semillas se esparcen con gran facilidad. Además, el árbol de guayaba tiene una gran resistencia, y es considerado entre los más fuertes entre los frutales tropicales ya que sobrepasa en capacidad de productividad y adaptabilidad a otras especies (Baby y Priya, 2011).

### 2.2 Importancia de la guayaba en México

En México y en el mundo, la guayaba es un fruto de gran valor económico y social debido a su alto aporte nutricional, a que es la base de múltiples productos de tipo medicinal y alimenticios (Padilla et al., 2007). La variedad mayormente cultivada es la media china, la cual se caracteriza por su intenso sabor dulce y pulpa rosa (Padilla et al., 2014). La guayaba es considerada una fruta estacional, siendo los meses de



octubre a enero los de mayor consumo y demanda; básicamente para preparar platillos o bebidas navideñas como el ponche. Durante el resto del año, el consumo es principalmente como fruta fresca y es relativamente menor al del invierno, sin embargo, durante todo el año se consume en forma de dulces, ates, mermeladas, jaleas, licores, entre otros. En el mercado nacional, como fruta fresca, la guayaba tiene poca demanda debido a su corta vida de anaquel, menos de 10 días a temperatura ambiente y de 15 días en refrigeración, en comparación con la de otros frutos como la manzana o la naranja (PEGUAM, 2010).

En México, en particular en el municipio de Calvillo en el estado de Aguascalientes, esta fruta se ha cultivado durante siglos, y actualmente cuenta con una producción de 49,697.10 toneladas totales (SIAP, 2020). Otros estados de la república también cuentan con una producción importante de este fruto, como Michoacán con 172,729.94 toneladas (SIAP, 2020), Zacatecas con 32,252.48 toneladas, entre otros (Tabla 1). Estos tres estados encabezan los primeros lugares de producción, dejando a México en el cuarto lugar en exportación a nivel mundial (SIAP, 2020). Sin embargo, su alto valor comercial internacional se ve disminuido debido a la fragilidad del fruto ante golpes, magulladuras y a su sobre maduración durante el manejo postcosecha, lo que dificulta su transporte y exportación, generando grandes pérdidas económicas a los productores y exportadores (Martínez-González et al., 2017). La guayaba tiene relevancia limitada para la economía a nivel nacional. Aun así, la producción de la fruta tiene bastante importancia social en México (PEGUAM, 2010).

**Tabla 1. Producción nacional de la guayaba.**

Entidad	Superficie (ha)			Producción (ton)
	Sembrada	Cosechada	Siniestrada	
Aguascalientes	3,330.90	3,330.90	0	49,697.10
Baja California Sur	18.5	16.5	0	83.4
Colima	15.75	15.75	0	185.54
Chiapas	67	62	0	328.6
Durango	227.57	192.55	0	438.7
Guanajuato	122.1	106	0	868.66

Guerrero	219.08	212.75	0	2,142.18
Hidalgo	53.2	52	0	350.45
Jalisco	334.47	329.47	0	3,588.13
México	844.5	838.5	0	9,714.52
Michoacán	12,625.60	12,154.00	0	172,729.94
Morelos	13.5	13	0	95.48
Nayarit	35	35	0	281.07
Puebla	53.5	52	0	498.93
Querétaro	77	75	0	272.36
Sinaloa	3	3	0	16.8
Tabasco	18	18	0	215.28
Veracruz	8	8	0	43.4
Yucatán	16	16	0	240
Zacatecas	1,950.00	1,944.00	0	32,252.48
	<b>20,032.67</b>	<b>19,474.42</b>	<b>0</b>	<b>274,043.02</b>

Fuente: SIAP, 2020, ton= tonelada, ha= hectárea

### 2.3 La guayaba en Aguascalientes

En el municipio de Calvillo, Ags. se cultiva esta planta desde hace más de un siglo, y se estima que existen más de 4,500 productores, pequeños propietarios o ejidatarios, que generan empleos rurales y una derrama económica en la región (Fruticultores, 2010). La principal variedad cultivada en Calvillo es la media china, su producción abarca el 41.94 % de la superficie total sembrada con frutales y representa el 64.12 % del valor de la producción frutícola de la entidad (PEGUAM, 2010; SIAP, 2020). Con esta importancia regional en mano, se logra destacar que el cultivo de esta fruta se hace rentable y adecuado a las condiciones agronómicas de la zona y que cuenta con un potencial productivo y de mercado a mediano y largo plazo (PEGUAM, 2010).

### 2.4 Descripción botánica

La planta de la guayaba pertenece a la familia *Myrtaceae*, es un árbol o semi-arbusto perennifolio, de 3 a 20 m de altura con una copa irregular y un diámetro de 60 cm, con tronco generalmente torcido y muy ramificado, con ramas gruesas, ascendentes y retorcidas, y cubiertas en ambos lados de hojas (Baby y Priya, 2011).. El árbol tiene una corteza delgada, suave y color cobre que cubre una capa

verdosa, y que contienen una considerable cantidad de taninos (de 11 a 27 %) (Kamath et al., 2008).

Los frutos de la guayaba son globosos y carnosos, de color crema, amarillento o rosado, de olor fragante y sabor que va de dulce a agridulce, con pulpa color amarillo o rosa y con numerosas semillas (Padilla et al., 2007). Son alimento de la fauna nativa que dispersan las semillas y facilitan su propagación. Se considera fruto climatérico, lo que significa que su maduración está dada por sus niveles de respiración y producción de etileno (Padilla-Ramírez et al., 2010). Estos frutos tienen gran valor nutrimental por su alto contenido de vitamina A y C, que va desde 80 a 100 mg por gramo de fruto (Padilla-Ramírez et al., 2010). También son ricos en taninos, tri-terpenos, flavonoides, saponinas, lecitina, potasio y fibra soluble (Padilla et al., 2014). Tienen un bajo porcentaje de grasas (menor a 1 %) y proteínas (0.88 %), y contiene una cantidad de agua de aproximadamente el 85 % del fruto (Pérez et al., 2008). En estudios recientes, en los frutos de la guayaba se ha observado actividad antiinflamatoria, anti hiperglucémica (Camarena-Tello et al., 2018) y antihipertensiva, debido a su alto contenido en compuestos flavonóicos, fenólicos y antioxidantes (Ayub et al., 2010). Además, algunas variedades de pulpa rosa han demostrado que disminuyen el daño inflamatorio y oxidativo causado por algunos tipos de diabetes (Li et al., 2015).

Las flores son verdes por fuera, con un olor dulcemente perfumado, actino mórficas, en el interior tienen un color blanco y cuentan de 4 a 5 pétalos, se encuentran de hasta 3 flores por hojas axilares y tienen anteras amarillas (Baby y Priya, 2011).

Las hojas son decusadas simples; laminadas de 3 a 13.5 cm de largo, oblanceoladas, oblongas o elípticas; poseen un color verde brillante a verde pardusco; abundantes puntos glandulosos transparentes en el exterior, se rompen al estrujarse, son ricas en flavonoides, particularmente en quercetina, el cual ha demostrado tener efectos anti bacteriales y antidiarreicos (Kammath et al., 2008).

## 2.5 Maduración de frutos

La maduración de un fruto se produce por una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos, que ocurren en la etapa final del desarrollo del fruto, y que lo hacen ser más atractivo para su consumo. Aunque estos cambios varían entre las especies, es común que ocurra la modificación de la estructura y textura de la pared celular, que disminuya su turgencia, que aumente su jugosidad, que se dé la conversión de almidones a azúcares y la biosíntesis de pigmentos (Maduwanthi y Marapana, 2017). Estos cambios son considerados eventos genéticamente programados, que son llevados a cabo de manera conjunta por enzimas que actúan durante los diferentes estadios de maduración (Wu et al., 2016). El ablandamiento del fruto es uno de los cambios más importantes a tomar en cuenta, ya que es una de las principales características que determinan la calidad y vida post cosecha del producto (Maduwanthi y Marapana, 2017).

La cosecha de la guayaba debe llevarse a cabo cuando tenga cierto grado de madurez, ya que de esto depende su vida de anaquel y su comercialización. En regiones de clima tropical, la floración dura de 120 a 180 días dependiendo de la variedad y de las condiciones agroecológicas del cultivo, y la guayaba puede estar en condiciones de cosecha en todo el año. La cosecha se realiza teniendo en cuenta características organolépticas, como firmeza, color y tamaño (Parra, 2014).

Al ser un fruto de tipo climatérico, su proceso de maduración se basa en los niveles respiratorios y de producción de etileno, responsable de cambios en el color, la textura y el sabor, que indican variaciones en la composición química. Los niveles respiratorios de la guayaba pueden alcanzar un valor que va de 20 a 80 mL de CO<sub>2</sub> kg/h y la producción de etileno de 5 µL/h (Mellidou et al., 2012). El etileno es la principal hormona auto-catalítica en frutos climatéricos, es la responsable de la señalización y síntesis de las demás enzimas relacionadas con la maduración (Binder, 2020). El proceso de maduración está dado por una serie de cambios físicos, químicos y bioquímicos en el fruto que se dan mediante la síntesis de muchas enzimas y transcripción de genes (Wu et al., 2016). La mayor parte de estas enzimas trabajan en conjunto, de manera coordinada, para degradar y modificar carbohidratos complejos en monosacáridos simples en diferentes partes del fruto, como la pulpa y la pared celular (Franková y Fry, 2013), incrementando el sabor

dulce y la producción de compuestos volátiles orgánicos característicos del fruto (Rizzo, 2015).

Existen una serie de factores físicos, químicos y bioquímicos que afectan de manera directa a la maduración del fruto de la guayaba. Un factor importante es el clima, ya que, si es tropical, el fruto maduro se obtendrá solamente una vez al año, es decir, es de temporada. Condiciones adecuadas para su producción son clima húmedo, con precipitaciones de 1000 a 2000 mm de lluvia por año, temperaturas medias de 20 a 30 °C y una buena exposición solar (Dolkar et al., 2014). Por otra parte, el factor químico de mayor importancia en la maduración de la guayaba es la producción de etileno, ya que de ésta depende el grado y velocidad de maduración de un fruto climatérico. Se ha comprobado que los tejidos frutales expuestos a grandes concentraciones de etileno producen una serie de cambios que varía entre especies y en el nivel de maduración que se tenga. Por ejemplo, en frutos como la banana, la maduración es inmediatamente inducida, sin embargo, entre más inmadura esté la fruta, mayor concentración de etileno se requerirá (Maduwanthi y Marapana, 2019). En cuanto a los factores bioquímicos, el proceso de maduración requiere la coordinación de enzimas y fitohormonas, que interactúan para dar lugar a cambios fisiológicos y organolépticos como color, textura, firmeza, tamaño y aroma del fruto (Rodríguez et al., 2011).

Como ya se ha mencionado, el etileno es la principal fitohormona que da paso a la maduración del fruto, y es por medio de un sistema enzimático que se sintetiza mediante la conversión de otros metabolitos como el ACC (Binder, 2020). Las reacciones de su metabolismo quedaron establecidas en el año de 1979 en el ciclo de Yang, donde todo el proceso comienza con la adenilación de una metionina que pasa a formar SAM, que posteriormente, con ayuda de la enzima ACC sintasa es transformada a ACC, y que es oxidada a etileno (Binder, 2020). Sin embargo, también existen otras enzimas relacionadas con la producción de etileno, como las que participan en la generación de compuestos volátiles aromáticos y en la degradación de la pared celular, por la ruptura de carbohidratos complejos a azúcares simples, para el ablandamiento del fruto. La pared celular primaria está constituida por microfibrillas de celulosa embebidas en una red de polisacáridos, en

su mayoría residuos de pectinas y hemicelulosa con enlaces  $\beta$ -1,4, formada principalmente de xiloglucanos, que forman enlaces de hidrógeno con las microfibrillas de celulosa (Salazar y Gamboa, 2013). Algunas de las principales enzimas modificadoras de la pared celular son las xiloglucan endotransglucosilasa/hidrolasa (XTH/XET),  $\beta$ -galactosidasas, pectinaesterasas, y  $\beta$ -1,4-endoglucanasas, que actúan de manera conjunta y durante los diferentes estadios de maduración. Algunas de estas son autorreguladoras y se activan en presencia del etileno (Vera et al., 2015). La XTH/XET pertenece a la familia 16 de las glucosil hidrolasas, que hidroliza la hemicelulosa presente en la pared celular (Opazo et al., 2010). Esta enzima tiene dos roles diferentes, el primero es la de una transglucosilasa (XET) que se induce al tener una baja concentración de oligosacáridos de xiloglucanos, y cuya acción es romper una cadena de xiloglucanos para transferirlos a otra cadena, reestructurando la pared celular. Su segundo rol es la despolimerización de estos mismos residuos de xiloglucanos, promoviendo un rápido ablandamiento de la pared celular (Miedes et al., 2011).

Las pectinaesterasas son otras enzimas responsables del ablandamiento del fruto y la elongación de la pared celular, que actúan durante los estadios rayado y maduro del fruto. Estas solubilizan residuos de pectinas por medio de la remoción de grupos metilo de las cadenas de polímeros de ácido galacturónico (poligalacturónidos), lo que causa su despolimerización. Por la acción de la enzima poligalacturonasa, posteriormente, pueden ocurrir dos diferentes procesos relacionados con el ablandamiento y firmeza de la pared celular, el primero es que los residuos galacturónicos con enlace  $\beta$ -1,4 y carga negativa, son hidrolizados por enzimas  $\beta$ -1,4-endogalacturonasas, lo que favorece la hidratación de la pared celular y favorece el ablandamiento. El segundo proceso es la interacción entre los residuos galacturónicos (por lo menos 9 residuos) que con ayuda de iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) promueven la formación de estructuras Egg-Box, las cuales aumentan la rigidez de la pared celular (Cabrera et al., 2008). Estudios anteriores han demostrado que, la actividad de las pectinaesterasas se incrementa conforme los niveles de respiración y producción de etileno (Anowar et al., 2014). Las  $\beta$ -galactosidasas trabajan en conjunto con las poligalacturonasas, disolviendo y despolimerizando las pectinas

generando pectinas solubles en agua. Sin embargo, su actividad decrece significativamente durante estadios más avanzados de maduración en frutos como el persimón y el mango. La  $\beta$ -galactosidasa acelera su actividad en frutos con daño por frío o en aquellos en los que se sometieron a atmósferas controladas (Huijuan Yang et al., 2018), además, los niveles se incrementan proporcionalmente conforme aumentan los niveles de ablandamiento en fruto (Akihiro et al., 2014). Las  $\beta$ -galactosidasas pueden encontrarse en alguna de sus tres isoformas (I, II y III), dependiendo del tejido o del grado de maduración. La isoforma I es la predominante, y participa en la ramificación de cadenas de pectinas y degradación específica de p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosidos y p-nitrofenil- $\alpha$ -L-galactopiranosidos. La isoforma II actúa sobre una amplia variedad de residuos de polisacáridos como la  $\beta$ -D-galactosil-(1,6)-D-galactósidos,  $\beta$ -D-galactosil-(1,6)-D-manosa y  $\beta$ -D-galactosil-(1,4)-L-arabinosa. Por último, la isoforma III es específica para  $\beta$ -D-1-4-galactosil trisacáridos y polisacáridos (Akihiro et al., 2014). Por último, las  $\beta$ -1,4-endoglucanasas son celulasas pertenecientes a la familia 9 de las glucosil hidrolasas, que degradan cadenas de celulosa, de hemicelulosa y de otros polisacáridos que tengan residuos 1,4- $\beta$ -glucosa en sus cadenas, como los xiloglucanos, por lo que se especula que trabaja en conjunto con las enzimas XET/XTH (Wei et al., 2010). Las  $\beta$ -1,4-endoglucanasas actúa durante la etapa tardía de la maduración cuando los enlaces más fuertes de pectinas y la mayor parte de la hemicelulosa ya ha sido hidrolizada. Además de estar relacionadas con la modificación de la pared celular en fruto, se ha observado que están implicadas en el desarrollo y crecimiento normal de hojas, tallo y raíz, así como en el desarrollo de las anteras (Buchanan et al., 2012). Estas enzimas han sido estudiadas en diferentes frutos climatéricos, como, por ejemplo, tomate (Jiang et al., 2019), mango (Yashoda et al., 2006) y fresa (Opazo et al., 2010). Sin embargo, en guayaba, los estudios dedicados a estos genes en particular son escasos, limitados y no concluyentes (Reyes et al., 2013; Abu-Bakr et al., 2003; Disket et al., 2017; Eliane et al., 2005).

## 2.6 Regulación de la maduración

La regulación de la maduración en los frutos climatéricos puede ser de tipo físico, químico (hormonal) o genético, y pueden ser modificados de manera natural o bien artificial. Uno de los factores físicos más influyentes en la maduración de un fruto es la temperatura a la cual está expuesta la planta. El rango ideal está entre 6 a 30 °C, por lo que a temperaturas por debajo o por encima de estas se inhibe la maduración del fruto. Los productores y exportadores aprovechan esto y con cámaras refrigeradas llevan a cabo la conservación y extensión de vida de anaquel del producto. Otro factor que influye en la maduración es la composición de la atmósfera, ya que entre mayor sea la cantidad de oxígeno mayor es la estimulación de la maduración, y por el contrario, a mayor concentración de CO<sub>2</sub> se inhibe el proceso. La presión atmosférica también afecta, al disminuir se produce una inhibición natural del proceso (Fischer y Melgarejo, 2021). La luz también es ha sido relacionada con la maduración del fruto (Cruz et al., 2018).

En cuanto a regulación química, el etileno es la principal fitohormona relacionada con el proceso de maduración. La producción de etileno puede ser regulada por las auxinas, que favorecen la generación de SAM, precursor de la ACC y del etileno. La adición de minoetoxiniglicina (AVG) durante la maduración bloquea la transformación de SAM a ACC. Por otra parte, la adición de 1-metilciclopropano (1-MCP) compite por los receptores de etileno en las membranas de la célula del fruto, bloqueando de manera natural la acción de etileno (Eliane et al., 2005). La producción de etileno ha podido ser regulada negativamente mediante mutaciones dirigidas y líneas transgénicas de ARN en anti sentido en frutos de tomate y manzana (Martínez-González et al., 2017). Los genes relacionados con la maduración pueden ser regulados de manera natural por sistemas endógenos, como con los miRNA que actúan de manera postranscripcional. Estudios en tabaco (Fangfang et al., 2015) y tomate (Chao et al., 2015) han demostrado que este tipo de regulación genética sucede durante diferentes estadios de maduración y en diferentes condiciones de estrés a los cuales se somete el fruto. La vigilancia de los factores que modulan la producción de etileno es muy importante para poder tener control de la velocidad de maduración (Reyes et al., 2013).



## 2.7 Antecedentes de análisis de expresión de genes de maduración

A lo largo del tiempo se han desarrollado técnicas de biología molecular que permiten el aislamiento de secuencias codificantes de genes relacionados con la maduración de los frutos. Por medio de la extracción de ARN y análisis bioinformáticos, Reyes et al. (2013) logró obtener varias secuencias codificantes de expansinas (*PgPG1*, *PgEXP2* y *PgEXP3*) y de ACC oxidasa (*PgACO1*) de guayaba. Esta secuencia tiene una similitud por encima del 80 % con otras enzimas ACC oxidasa (ACCo), y por lo menos dos de ocho regiones se encuentran altamente conservadas (Reyes et al., 2013). Además, mostraron que el nivel máximo de expresión de estas secuencias se presentó en el estadio rayado, para luego disminuir en los estadios maduro y sobre maduro (Reyes et al., 2013). También mencionan que por medio de la expresión de varios genes involucrados en la maduración de la guayaba se puede adelantar o atrasar su maduración.

En otro trabajo, Miedes et al. (2010) aislaron el gen de *SIXTH1*, que pertenece a la familia de las XTH/XET, en tomates transgénicos. Sus resultados muestran que la expresión de *SIXTH1* fue mayor en las zonas apicales de hipo cotiledones que en las basales, demostrando que hay una clara relación en cuanto a la extensibilidad y elongación celular y la expresión de este gen (Miedes et al., 2010). Además, observaron que los genes XTH producen varios tipos de proteína XET soluble, con actividad variable, dependiendo del lugar (basal o apical). Como conclusión, las enzimas XTH/XET juegan un rol muy importante en el ablandamiento y elongamiento de la pared celular en plantas (Miedes et al., 2010).

Por otra parte, Opazo et al. (2010) caracterizaron dos ADNc codificantes para XTH y midieron sus niveles de expresión mediante q-RTPCR en fresa. El análisis de tiempo real en flores, raíz, hoja y en 4 estadios de maduración del fruto mostró que ambos genes se expresan más durante los estadios de verde grande y rayado, y que en hoja el nivel de expresión es casi el doble que en los demás órganos (Opazo et al., 2010). Además comprobaron que la cantidad de enzima XTH es constante en flores, raíz y hojas, mientras que en fruto aumenta conforme el estado de maduración avanza (Opazo et al., 2010).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Buchanan et al. (2012) realizaron la filogenia de 25 genes ortólogos pertenecientes a la familia de las  $\beta$ -1,4-endoglucanasas en una especie seleccionada de pastos. Estos concluyeron que están relacionados con la modificación y degradación de la pared celular. Se menciona que los genes encontrados tienen más del 90 % de similitud con algunos en maíz, sorgo y arroz. Las enzimas de cada clade mostraron similitudes en sus sitios catalíticos, estructura y función. Sus resultados muestran incluso que la posición, número y longitud de los intrones varían dentro de los mismos pastos, con excepción del primer intrón encontrado (intrón 1), el cual se encuentra totalmente conservado, en longitud y posición, por lo que representan un marcador molecular confiable para esta familia de genes. También demostraron que la familia de genes de  $\beta$ -1,4-endoglucanasa se encuentra repartida en todos los cromosomas de *Arabidopsis thaliana* y maíz. La q-RT-PCR que realizaron mostró que por lo menos uno de los genes caracterizados se expresa mínimo en una parte de la planta, siendo la hoja, semilla y las flores donde más se da la expresión de esta familia de genes.

En cuanto a  $\beta$ -galactosidasa, Akihiro et al. (2014), aislaron sus 3 isoformas y midieron su actividad en cuanto a la degradación de azúcares de la pared celular, así como los tiempos y sustratos que cada una requerían, llegando a la conclusión de que esta enzima, actúa en los estadios maduro y sobre maduro, debido a que durante el proceso de maduración de un fruto se dan dos pasos principales, el primero en donde los polisacáridos de mayor peso molecular son degradados por enzimas como la poligalacturonasa, y el segundo paso en donde actúan las galactosidasas, cuando las moléculas parcialmente digeridas son completamente degradadas en azúcares simples, lo que causa una completa debilitación de la unión entre paredes celulares. Sus resultados también muestran que las 3 isoformas de esta enzima degradan en general el mismo tipo de sustrato, sin embargo, cada una de ellas tiene un sustrato en especial que las otras dos no pueden reducir, para el caso de la isoforma 1 es el *p*-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranósido, para la isoforma 2 se incluye el  $\beta$ -D-Galactosa y por último la isoforma 3 es capaz de degradar  $\beta$ -1-4-galactosil tri y polisacáridos. Este mismo experimento y aislamiento de enzima fue repetido por Zainon et al. (1995) en mango, obteniendo los mismos resultados en

cuanto a degradación de sustrato y niveles de actividad catalítica durante diversos tiempos.

## 2.8 Metabolismo de lípidos en plantas

Dentro de la membrana plasmática de las células eucariontes, los esfingolípidos son la segunda clase más abundante de lípidos y son considerados como una red bioactiva. Los esfingolípidos están formados principalmente por esfingosina que al unirse a un ácido graso por enlace amida en su grupo amino forman ceramidas (Coant et al., 2020). A partir de las ceramidas, se pueden formar esfingomielinas, esfingosinas, esfingosinas 1-fosfato y los cerebrósidos o glucoceramidas si tienen unida una glucosa; estos últimos tienen unido en su grupo alcohol un azúcar que proviene de la UDP-Glucosa o UDP-galactosa (Figura 1) (Gault et al., 2010).

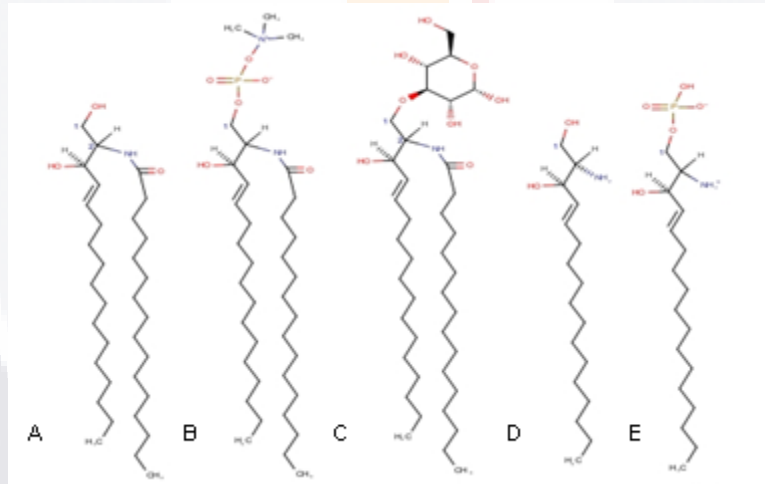


Figura 1. Tipos de esfingolípidos. A) Ceramida, B) Esfingomielina, compuesta por una ceramida y un grupo fosfocolina, C) Glucosilceramida, conformada por una ceramida y una glucosa, D) Esfingosina, formada por un grupo amino y un ácido graso, E) Esfingosina-1-fosfato, compuesta por una esfingosina y un grupo fosfato. Figura realizada con el software ChemAxon.

En plantas la característica principal de los esfingolípidos es su alto contenido de cadenas largas tri hidroxiladas, las cuales son sintetizadas a partir de la hidroxilasa LCB-C4 (Chen et al., 2008), de estos esfingolípidos los más predominantes son las

glucosil inositolfosforilceramidas (GIPCs) y las glucosilceramidas (GCR) que se encuentran en las membranas de las plantas, de estas sus cadenas largas de ácidos grasos son isómeros cis o trans de los 4-8-esfingodienina, 4-hidroxi-8-esfingonina y 8-esfingonina (Naphatsamon et al., 2018; Melser et al., 2010). El rol de los esfingolípidos y glucosilceramidas en plantas ha sido relacionado con la tolerancia al frío y al congelamiento (Moellering et al., 2010), sin embargo, en estudios más recientes se han determinado más funciones que incluyen, la programación de la muerte celular (Saucedo-García et al., 2011) la señalización celular para la apertura y cierre de las células guarda (Guo et al., 2012; Ali et al., 2018), la contribución de propiedades físicas y fisiológicas a la membrana celular como tolerancia a micotoxinas y diversos patógenos (Peer et al., 2010) el movimiento (tráfico) y modificación de lípidos de membrana (Markham et al., 2013), además de que algunas ceramidas son precursoras de cerca de 300 glucoesfingolípidos diferentes (Leipelt et al., 2001). Los esfingolípidos y glucoceramidas también tienen un rol importante en el desarrollo y maduración del fruto en donde la extensión celular se ve afectada por los cambios en los lípidos de las membranas vacuolares, además se ha relacionado la degradación de esfingolípidos, glucosilceramidas, y el aumento de lípidos de tipo polar a los estadios tempranos y tardíos de la maduración del fruto (Corbacho et al., 2018; Parra-Lobato et al., 2017). También se les ha relacionado con procesos de elongación celular, y modificación de los lípidos de membrana en vacuolas y células durante el proceso de maduración (Chen et al., 2018; Corbacho et al., 2018). El catabolismo de glucoceramidas es intra lisosomal en donde se hace la remoción de los residuos de azúcar de los carbonos terminales, con esto se obtiene glucosa libre y ceramidas, esta acción la llevan a cabo en conjunto dos enzimas glucosilceramidasa, con diferentes estructuras y de diferentes familias, la glucocerebrosidasa (GB1) miembro de la familia glucosil hidrolasa 30 (30GH) y la  $\beta$ -glucosidasa (GB2) miembro de la familia glucosil hidrolasa 116 (116GH) (Fredj et al., 2018). La familia 116GH se divide en 3 subfamilias: la primera contiene una  $\beta$ -glucosidasa (GB2), la segunda una  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa perteneciente a *Sulfolobus sulfataricus* (SSO3039) y en la última subfamilia varias  $\beta$ -xilosidasas y una  $\beta$ -glucosidasa de

*Sulfolobus sulfataricus* (SSO1353), estas tres subfamilias son funcionalmente diferentes (Ferrara et al., 2014). La estructura en aminoácidos de los miembros 1 y 3 de esta familia han sido bien estudiados en animales y contienen dos dominios: el primero se encuentra hacia el N-terminal que es de 318 residuos aminoacídicos (Glyco\_hydr\_116N) y está conformado por dos hojas  $\beta$  en formación de sándwich, sus sitios catalíticos aún son desconocidos para GB2 y las anotaciones de su función se limitan a la acción de catálisis de glucosilceramidas (Boot et al., 2007; Martin et al., 2013) y el segundo dominio está en el C-terminal con 360 residuos de aminoácidos (DUF608) y forma una estructura de solenoide ( $\alpha$ - $\alpha$ -6) con función catalítica en los residuos de ácido glutámico (E441) entre la primera y segunda hélice  $\alpha$ , y aspartato (D593) entre la quinta y sexta hélice  $\alpha$ , en donde también contiene el sitio estructural de unión al ion  $\text{Ca}^{2+}$ , su función consiste en la hidrólisis de uniones de poli o monosacáridos de ácidos grasos y formación de glucosa libre (Cobucci-Ponzano et al., 2010; Fredj et al., 2018).

## 2.9 miRNAs

Los miRNA son elementos no codificantes y fundamentales que actúan de manera específica regulando la expresión de genes, estos se encuentran en el genoma de todas las células eucariontes (Bavelloni et al., 2017); en su mayoría son de 18 a 22 nucleótidos que se generan a partir de regiones en forma de bucle provenientes de precursores de transcritos endógenos, estos actúan pairándose con las secuencias de los genes que codifican para una proteína y así realizar una represión en su expresión (Zhang et al., 2018). Más en específico, estas regiones en forma de bucle se conocen como pre-miRNA (Sun, 2012), las cuales posteriormente se convierten en un complejo dúplex de ARN por la acción de una endoribonucleasa III (Dicer-like1); el miRNA maduro se une a una proteína argonauta (AGO1), la cual a su vez forma parte de un complejo proteico de silenciamiento de genes inducido por complementariedad de ARN, que causa la degradación de un ARN mensajero (ARNm) o bien la represión transcripcional (Li et al., 2015). En plantas este mecanismo de silenciamiento ha demostrado que las secuencias de miRNA tienen

una alta complementariedad con su gen objetivo (Tsuzuki et al., 2016), sin embargo, en algunos casos no es completa e incluso pueden llegar a tener hasta 5 diferencias entre el miRNA y el gen objetivo y aun así tener actividad catalítica sobre el gen, esto es demostrado en los experimentos de Schwab et al. (2005), en donde probaron la actividad del miRNA 159, sobre 4 objetivos complementarios y sorprendentemente en uno de los casos con 5 diferencias entre objetivo y miRNA se vio afectado su nivel de expresión, con lo que demostraron que aunque no sea un objetivo específico y conservado evolutivamente entre especies, se da la regulación, lo que nos dice que en conjunto con el cambio evolutivo de ARNm, el miRNA cambia a la par (Xin et al., 2015). Estos hallazgos resaltan el hecho de que miRNA maduros así como las secuencias de sus genes objetivos están altamente relacionadas y conservadas entre diferentes especies de plantas, esto se ha logrado mediante la secuenciación de ARN, herramienta con la cual se pueden caracterizar e identificar los ARN pequeños (ARNs) expresados en una planta bajo un estrés específico (Axtell y Bartel, 2005); esto confirmado por varios artículos en donde se ha demostrado que bajo diferentes tipos de estrés como el hídrico (Ferdous et al., 2015), estímulos a la maduración (Meng et al., 2016) o deficiencia de minerales (Zeng et al., 2010), la cantidad y tipos de miRNA que se expresan varían.

### 2.9.1 miRNAs y silenciamiento de genes

En años recientes se han puesto en la mira los miRNA y el interés por ellos es debido a su habilidad para regular la expresión génica postranscripcional mediante la degradación del gen objetivo (Millar et al., 2019). Se han hecho grandes esfuerzos para la identificación y caracterización de los genes de miRNA, lo que incluye la generación de bibliotecas de ADNc o ARNs, sin embargo, existe la limitante de que los miRNA se expresan muy poco o nulamente si no es bajo condiciones o en un tipo de célula en específico, cosa que podría llegar a ser difícil en algunos casos (Sun, 2012), es debido a este tipo de obstáculos que el entendimiento de la función biológica de los miRNA, requiere también el conocimiento de los ARNm objetivos, para lo cual la bioinformática nos ayuda a predecir los objetivos putativos

basándonos en la secuencia de miRNA, así como la forma de actuar de ese miRNA específico (Zhang et al., 2018). En la actualidad no existen registros de estudios que se hayan realizado sobre miRNA o ARNs en guayaba, por lo que estos mismos permanecen siendo un misterio al no estar caracterizados o identificados.



### III. JUSTIFICACIÓN

El alto valor comercial de la guayaba reside en la gran variedad de subproductos medicinales y alimenticios como las jaleas, conservas y confitería. Sin embargo, el daño mecánico producido durante el manejo postcosecha y la sobre maduración del fruto crea un problema para su transporte y exportación, generando grandes pérdidas económicas a los productores y exportadores. Es por eso que es importante generar conocimiento de los genes involucrados en la modificación de la pared celular durante los diferentes estadios del proceso de maduración. Por lo anterior, este estudio tiene como propósito identificar, analizar de manera biológica, bioinformática y medir la expresión de los genes de  $\beta$ -galactosidasa 1 (*PgGa1*),  $\beta$ -1,4-endoglucanasa 17 (*PgE17*) y una glucosilceramidasa no lisosomal (*PgGly1*) en hoja, tallo, raíz y 4 estadios de maduración del fruto. Además de hacer una identificación y caracterización de los miRNA expresados durante los estadios rayado y maduro del fruto de la guayaba y así contar con herramientas y técnicas moleculares que puedan ayudar a resolver el problema de sobre maduración postcosecha de la guayaba y en un futuro controlar el proceso de maduración.

### IV. HIPÓTESIS

Los genes relacionados con el proceso de maduración de frutos climatéricos, como la *PgE17*, *PgGa1* y *PgGly1* se encuentran en guayaba.

El análisis y conocimiento de los miRNAs existentes en guayaba, permitirá conocer el proceso de regulación de expresión de los genes producidos en una etapa específica de maduración del fruto.

Algunos de los miRNAs encontrados en guayaba son homólogos a las secuencias de genes de maduración en guayaba, por lo que son capaces de regular la actividad de estos.



## V. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Analizar la expresión de los genes *PgE17*, *PgGa1* y *PgGly1*, relacionados con el proceso de maduración en guayaba. Además de realizar la identificación y caracterización de los miRNA expresados en los estadios rayado y maduro de la guayaba.

### 5.2 Objetivos específicos

- Identificar los genes relacionados con la maduración *PgE17*, *PgGa1* y *PgGly1* al en el genoma de *P. guajava* L.
- Analizar los niveles de expresión mediante q-RTPCR de los genes objetivo en los estadios de maduración verde, rayado, maduro y sobre maduro; además de las hojas, el tallo y raíz.
- Comprobar la existencia de miRNAs en fruto en estadio rayado y maduro, reguladores de los genes de interés o bien de genes relacionados con el proceso de maduración.

## VI. METODOLOGÍA

### 6.1 Recolección de material vegetal

Durante todo el año 2018, se recolectó material vegetal de un árbol de *P. guajava* del tipo media china variedad Calvillo S-XXI, localizado en el campo experimental Cañones INIFAP en el municipio de Jalpa, Zacatecas (latitud 21°44'43.6"N; longitud 102°58'02.0"W). Las muestras recolectadas fueron de hoja, tallo, raíz y del fruto de cuatro estadios de maduración: verde, rayado, maduro y sobre maduro (Figura 2).



Figura 2. Material vegetal recolectado. a) Hoja joven y verde, b) tallo joven y verde, c) raíz, d) fruto verde de aproximadamente 25 días después de la floración, e) fruto rayado de aproximadamente 3 meses y medio después de la floración, f) fruto maduro 5 meses después de la floración, g) fruto sobre maduro 6 meses después de la floración.

### 6.2 Extracción de ARN total

Todas las muestras utilizadas (hoja, tallo, raíz y fruto en todos sus estadios de maduración) siguieron la misma metodología para la extracción de ácidos nucleicos. La extracción fue siguiendo el método de CTAB de Doyle y Doyle (1987), con modificaciones. El material vegetal se pulverizó con nitrógeno líquido en mortero y se le adicionó inmediatamente 700  $\mu$ L buffer de lisis (CTAB 3 %, PVP 2 %, EDTA

pH 8.0 25 mM, Tris-HCl pH 8.0 100 mM, NaCl 2 M) precalentado a 65 °C, la solución se mezcló vigorosamente en vórtex y se incubó a 65 °C durante 5 min con agitación constante. Posteriormente, se añadió 1 volumen de cloroformo–alcohol isoamílico 49:1, se agitó vigorosamente durante 20 s y se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min. Se recuperó la fase acuosa en un microtubo nuevo, se añadió 1 volumen de fenol–cloroformo 1:1, se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min, se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo y se añadieron 2 volúmenes de etanol absoluto y 0.3 volúmenes de acetato de sodio 3 M, se mezcló y se incubó a -20 °C durante toda la noche. Se centrifugó por 15 min a 13,000 rpm, se decantó todo el sobrenadante y se lavó la pastilla de ARN con 1 mL de etanol al 80 %, se agitó vigorosamente, se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min, se decantó el etanol, se dejó secar y se resuspendió en 30 µL de agua DEPC y se guardó a -20 °C hasta su uso. Se comprobó la integridad y calidad del ARN mediante una electroforesis en geles de agarosa al 1 % teñidos con bromuro de etidio. Las muestras se cuantificaron utilizando un NanoDrop 2000 de ThermoFisher®.

### 6.3 Diseño de oligonucleótidos degenerados para genes de interés

Se diseñaron oligonucleótidos con el programa CODEHOP J (<https://virology.uvic.ca/virology-ca-tools/j-codehop/>). Se realizó un análisis de similitud con las herramientas TBLASTn, BLASTn y BLASTp (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 2019) para seleccionar los organismos que se utilizarían para el diseño de los oligonucleótidos. Para los tres genes se tomó como referencia *Eucalyptus grandis*; para el gen de *PgGa1* se tomaron las secuencias de *Solanum lycopersicum* (NM\_001247536), *Lycopersicum esculentum* (AF023847), *Nicotiana tabacum* (KF267437); para *PgE17*, las especies de *S. lycopersicum* (NM\_001247953), *Capsicum annuum* (XM\_016710307), *Populus trichocarpa* (HQ331264); y para *PgGly1*, las especies de *Vitis vinífera* (XP\_002278061.1), *S. lycopersicum* (XP\_004234960.1), *Glycine max* (XP\_003526711.1), *Musa acuminata* (XP\_009382521.1). Con excepción de los oligonucleótidos para  $\beta$ -1,4-endoglucanasa, la secuencia de los otros fue modificada para conseguir una

temperatura de alineamiento más conveniente. Las características de los oligonucleótidos diseñados se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2. Características de los oligonucleótidos diseñados para PCR**

Gen	Oligonucleótidos	Secuencia 5'-3'	Longitud nt
<b>Glucosilceramidasa no lisosomal</b> <i>PgGly1</i>	GlyF	CCACATCAAGTACTtyaayggngg	24
	GlyR	AAGGAGCCTTGGTccartcngtytt	25
<b>β-galactosidasa 1</b> <i>PgGa1</i>	GalaF	CGGCACCTTCgayggncargg	21
	GalaR	TCTTCACGGTCACrttytgnacncc	25
<b>β-1,4-endoglucanasa 17</b> <i>PgE17</i>	GlucF	GACCCTCCATGactycaagg	19
	GlucR	GTCCAAAAGAGtggcyctaga	20

#### 6.4 RT-PCR de las muestras de ARN

Las muestras de ARN total fueron tratadas con 0.5 µL de DNAsa del kit RT- RNA Quick Access de PROMEGA®. La retro transcripción fue realizada con el kit SuperScript® III One-Step RT-PCR with Platinum® Taq de ThermoFisher®. El ADNc obtenido se cuantificó en un NanoDrop 2000 de ThermoFisher® y posteriormente se usó para amplificar los genes de interés en un termociclador Palm-Cycler® (Corbett Research). El programa utilizado en el termociclador para la PCR inicia con una desnaturalización a 95 °C durante 10 min, seguido de otra desnaturalización a 95 °C durante 1 min, alineamiento a 56 °C (*PgGly1*), 51 °C (*PgGa1*) y 54.5 °C (*PgE17*) durante 40 s y 72 °C de extensión durante 90 s, esto repetido por 35 ciclos y por último una extensión final a 72 °C por 10 min. Los fragmentos obtenidos fueron verificados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz ultravioleta.

## 6.5 Purificación de productos de RT-PCR

La purificación de los productos de PCR se realizó con ayuda del Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, siguiendo la metodología del kit. El de *PgGly1* se purificó directamente del producto de PCR, mientras que los de *PgGa1* y *PgE17*, debido a la aparición de múltiples bandas, se cortó la banda del tamaño esperado directamente del gel de agarosa. Se determinó la concentración de los fragmentos purificados con un NanoDrop 2000 ThermoFisher® y se verificó el tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. La concentración de los productos de PCR se ajustó a 35 ng/μL.

## 6.6 Clonación de los fragmentos de los genes de interés

### 6.6.1 Ligación

Los fragmentos obtenidos mediante RT-PCR se ligaron al vector pGEM-T Easy Vector Systems de Promega, siguiendo el protocolo indicado por el productor.

### 6.6.2 Células competentes

La preparación de células competentes la transformación y la extracción de plásmido se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en el manual de Maniatis et al. (1982). Se cultivó *Escherichia coli* cepa DH5-α en medio LB sólido y se incubó a 37 °C durante toda la noche, se tomó una colonia aislada y se sembró en 4 mL de LB líquido y se dejó incubando en agitación constante a 37 °C durante toda la noche. De este cultivo se tomó una alícuota de 0.1 mL y se sembró en 5 mL de medio LB nuevo para incubar durante aproximadamente 3 horas a 37 °C. El cultivo en microtubos de 1.5 mL en alícuotas de 1 mL, se enfrió en hielo durante 10 min, se centrifugó a 12,000 rpm durante 2 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla muy suavemente en 1 mL de CaCl<sub>2</sub> frío y estéril, se incubó en hielo durante 10 min y se centrifugó a 12,000 rpm durante 2 min. Se eliminó el

sobrenadante y la pastilla se resuspendió muy suavemente en 30  $\mu$ L de  $\text{CaCl}_2$ . Estas células fueron inmediatamente utilizadas para la transformación.

### 6.6.3 Transformación de células competentes

A los 30  $\mu$ L de células competentes se les agregó 5  $\mu$ L de producto de ligación y se mezcló suavemente mediante pipeteo, se incubó durante 20 min en hielo, seguido de una segunda incubación a 42 °C durante 90 s, inmediatamente el tubo se transfirió a hielo y se dejó reposar por 5 min para lograr generar el shock térmico requerido para la transformación. Seguido de esto, se añadieron 0.2 mL de medio LB líquido y se dejó incubar durante 45 min a 37 °C. Una vez pasado este tiempo, la mezcla se esparció con ayuda de perlas de vidrio en cajas de Petri con medio LB sólido con 50 mg/L de ampicilina, permitiendo que todo el líquido se absorbiera. Las cajas se invirtieron y se dejaron incubar a 37 °C toda la noche.

### 6.6.4 Extracción de plásmidos por el método de Miniprep Birnboim Dolly

Se tomó una de las colonias transformadas, se inoculó en medio líquido LB con 50 mg/L de ampicilina, y se incubó durante toda la noche a 37 °C. De este cultivo se tomó 1.5 mL en un microtubo, se centrifugó a 12,000 rpm por 2 min y se eliminó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 0.1 mL de solución birnboim I para dejar incubando en hielo durante 5 min. A continuación, se le añadió 0.2 mL de solución birnboim II (preparada en el momento), se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, después se le agregó 0.15 mL de solución birnboim III y se incubó en hielo por 5 min. Posterior a esto, la mezcla se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min, el sobrenadante se pasó a otro microtubo, se le añadió 0.2 mL de fenol-cloroformo 1:1 y se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min. La fase acuosa se pasó a otro microtubo, se le añadió 0.2 mL de cloroformo-álcool isoamílico 49:1 y se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, se le agregó un volumen de isopropanol, se incubó en hielo por 5 min y se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min para la obtención de una pastilla de plásmido. La pastilla

fue lavada con etanol al 75 % durante 5 min, se centrifugó a 8,000 rpm y por último se resuspendió en 35  $\mu$ L de agua destilada y estéril.

## 6.7 Secuenciación y análisis bioinformático de productos de RT-PCR

Los fragmentos obtenidos se secuenciaron en MacroGen USA (Maryland, Estados Unidos) con el equipo ABI 3730xl DNA Sequencer de la marca ThermoFisher®. Las secuencias resultantes fueron sometidas a un análisis de similitud utilizando la herramienta TBLASTn, BLASTn y BLASTp (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 2019) y BLAST de la plataforma Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/blast-search>). Todas las secuencias, fueron comparadas con el genoma de *E. grandis* (número de accesión: GCA\_016545825.1) y contra el ensamblaje de genoma de *P. guajava*, guava\_V11.23 (número de accesión al ensamblaje: GCA\_016432845.1). La traducción virtual de las proteínas putativas fue realizada con la herramienta Translate de la plataforma ExPASy (Expert Protein Analysis System) (<https://web.expasy.org/translate/>). El punto isoeléctrico, índice de estabilidad, índice alifático y escala de valor GRAVY fueron calculadas con la herramienta ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>). Para los alineamientos múltiples se utilizó el programa CLUSTAL  $\Omega$  (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>), en donde se introdujeron secuencias pertenecientes a plantas con y sin frutos climatéricos. La búsqueda y comparación de dominios y motivos conservados se realizó en la base de datos pFAM (<https://pfam.xfam.org/>), la plataforma de clasificación de ontología de genes PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>) y la base de datos UNIPROT (<https://www.uniprot.org/>). El análisis de co-expresión se realizó en la plataforma STRING (<https://string-db.org/>) utilizando a *E. grandis* como proteína de referencia. Los análisis de filogenia fueron hechos con el software PAUP4 con el método de distancia evolutiva de ADN/ARN con las distancias p no corregidas, mínimos cuadrados no ponderados, longitudes negativas de las ramas en cero, sustituciones para el estimado de la cuenta de ramas, precisión de 5 decimales para resultados y un Bootstrap de 100.

### 6.8 Análisis de expresión mediante qRT-PCR de los genes de interés

La expresión en tiempo real de los fragmentos se hizo con oligonucleótidos diseñados a partir de los fragmentos secuenciados (Tabla 3).

**Tabla 3. Oligonucleótidos para qRTPCR**

Gen	Oligonucleó-tidos	Secuencia 5´-3´	Producto pb
<b><i>PgGly1</i></b>	GlyF	GAGAGAAGTTTGGTCAGGAG TT	105
	GlyR	CATGCAGCTTCATATATTCCA C	
<b><i>PgGa1</i></b>	GalaF	AAAGGTTACGCAGAAGATAG	108
	GalaR	CTGGTCCAAATTCGTTCTCTAT	
<b><i>PgE17</i></b>	GlucóF	GGTACGGTCGTGCTGGTC	108
	GlucóR	GGCGAAGATCCAGTGCTC	

*PgGly1* El análisis de expresión de *PgE17*, *PgGa1* y *PgGly1* se llevó a cabo en raíz, tallo, hoja y 4 estadios diferentes de maduración (verde, rayado, maduro y sobre maduro). Se tomó el gen 25 S de la sub unidad ribosomal de la hoja de tabaco como gen de normalización de datos, y el estadio verde como referencia para la cuantificación relativa de la expresión, porque es el punto en el que estos genes comienzan a mostrar su expresión. Las amplificaciones fueron realizadas en placas de 96 pozos en un termociclador StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando el kit de qPCR Radiant™ GreenLo-ROX (Alkali Scientific). En cada reacción se agregaron 10 µL de Radiant™ GreenLo-ROX 2X mix de qPCR, 200 ng de ADNc, 100 nM de oligonucleótidos forward y reverse y se ajustó a un volumen de 20 µL, utilizando agua libre de nucleasas. El programa utilizado para la reacción consiste en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min, seguida de 40 ciclos de una desnaturalización a 95 °C por 5 s y una fase de alineamiento y



extensión a 52 °C durante 30 s. La información obtenida se analizó utilizando el software StepOne™ Real-Time PCR System Software (Applied Biosystems), el análisis estadístico fue hecho en el paquete estadístico de Excel. Los cambios en la expresión relativa de los genes fueron calculados utilizando el modelo de  $\Delta\Delta Ct$ .

## 6.9 Construcción de bibliotecas de miRNAs

### 6.9.1 Cuantificación y verificación de la integridad de las muestras

Se extrajo ARN de 12 muestras de guayaba en estadio rayado y 12 muestras en estadio maduro, utilizando la metodología de extracción mencionada en el punto 6.1.2. Las muestras se cuantificaron en un Nanodrop 2000, y se analizaron electroforéticamente en un gel desnaturante de agarosa al 15 % y formaldehído al 18 % en buffer MOPS. Se preparó una mezcla de 4  $\mu$ L de muestra de ARN total con 1  $\mu$ L de buffer de carga, se calentó durante 5 min a 65 °C, se incubó en hielo por 2 min, y se cargó en el gel. El gel se sometió a electroforesis y se tiñó con bromuro de etidio para comprobar la integridad y calidad del ARN. Se juntaron muestras del mismo estadio de maduración para obtener 3 mezclas (triplicado), con aproximadamente 12 mg de ARN cada uno en 30  $\mu$ L.

### 6.9.2 Aislamiento de miRNAs a partir de muestras de ARN total

Las mezclas anteriormente mencionadas fueron sometidas a electroforesis en un gel desnaturante de poliacrilamida al 15 %. Cada muestra se mezcló con un volumen de buffer de carga, para tener 60  $\mu$ L de mezcla, y cargar el total en cada pozo. Las muestras se corrieron durante 7 horas a 140 volts. Como marcador de peso molecular se utilizó un mix de oligonucleótidos (5.8S [17 nt], 166 directo [20 nt] y 159 directo [27 nt]) a 100 mM, del cual se cargaron 50  $\mu$ L en el primer y último pozo del gel. El gel se tiñó en bromuro de etidio durante 7 min y se visualizó con luz UV. Se cortó el gel de poliacrilamida para el aislamiento de los miRNAs, tomando el área entre las bandas correspondientes a 20 y 27 pares de base del marcador de peso molecular. Los cortes se repartieron en 6 microtubos, a cada uno se les agregó

700  $\mu\text{L}$  de agua DEPC estéril y se dejaron eluir durante toda la noche a 5 °C. Las muestras fueron filtradas con ayuda de una jeringa de 5 mL conectada a un filtro estéril para eliminar la poliacrilamida, y recuperar el ARN purificado. Cada muestra se colectó en un tubo nuevo de 1.5 mL y se aforó a 500  $\mu\text{L}$  con agua destilada estéril.

### 6.9.3 Precipitación de miRNAs

A cada tubo se le agregó 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M, y 3  $\mu\text{L}$  de glicógeno puro. La mezcla se agitó vigorosamente en vórtex durante 15 s, inmediatamente se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto puro (grado molecular) y se incubó a -80 °C durante 2 horas. Posteriormente, se centrifugó a 12,000 rpm durante 20 min a 4 °C, se decantó el sobrenadante y la pastilla fue lavada con 1 mL de etanol al 80 % y centrifugada a 12,000 rpm durante 5 min. Finalizado se resuspendió la pastilla en 10  $\mu\text{L}$  de agua estéril DEPC.

### 6.9.4 Ligación del adaptador 3' Linker1

Se utilizó el adaptador 3' Universal miRNA Cloning Linker de New England BioLabs® de secuencia 5' rAppCTGTAGGCACCATCAAT-NH<sub>2</sub> 3', la cual contiene un grupo amino (NH<sub>3</sub>) en su extremo 3' que previene la ligación consigo mismo, además, tiene una adenilación activa en su extremo 5' que la ARN ligasa reconoce y ayuda a la ligación covalente con el OH del extremo 3' del miRNA, sin la necesidad de ATP (Figura 3).

Para cada reacción de ligación se utilizaron 0.4  $\mu\text{L}$  de Universal Linker1 Buffer 10X, 0.6  $\mu\text{L}$  de DTT 10 mM, 1  $\mu\text{L}$  de adaptador Linker1 a 1 mM, 1  $\mu\text{L}$  de T4 ARN Ligasa 1 y 7  $\mu\text{L}$  de muestra de miRNA, obteniendo un total de 10  $\mu\text{L}$  de producto ligado, posteriormente la ligación se incubó a 28 °C durante 1 hora.

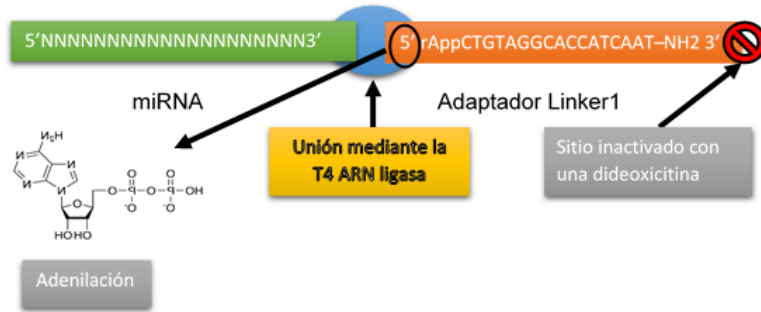


Figura 3. Ligación del adaptador 3' Linker1. Estructura y plegamiento del extremo 5' del adaptador Linker1 a la secuencia de miRNA en su extremo 3', con la enzima T4 ARN ligasa. El extremo 3' del adaptador está desactivado mediante una dideoxicitina para evitar el plegamiento consigo mismo.

### 6.9.5 Ligación del adaptador 5'

Se utilizó el adaptador RNA 5' Adapter (RA5), de la serie TruSeq Small RNA del grupo Illumina®, de secuencia 5' GUUCAGAGUUCUACAGUCCGACGAUC 3', al cual le falta un grupo fosfato en su extremo 5', lo que lo hace particularmente vulnerable a ligarse consigo mismo en su propio extremo 3' (Figura 4). La reacción se realizó utilizando 0.4 µL de RA5 Buffer 10X, 0.6 µL de DDT al 10 mM, 1 µL de adaptador RA5, 1 µL de ATP, 1 µL de ARN Ligasa y los 10 µL de producto ligación 3' previamente obtenidos, después se incubó durante 1 hora a 28 °C, terminando con un total de 14 µL.

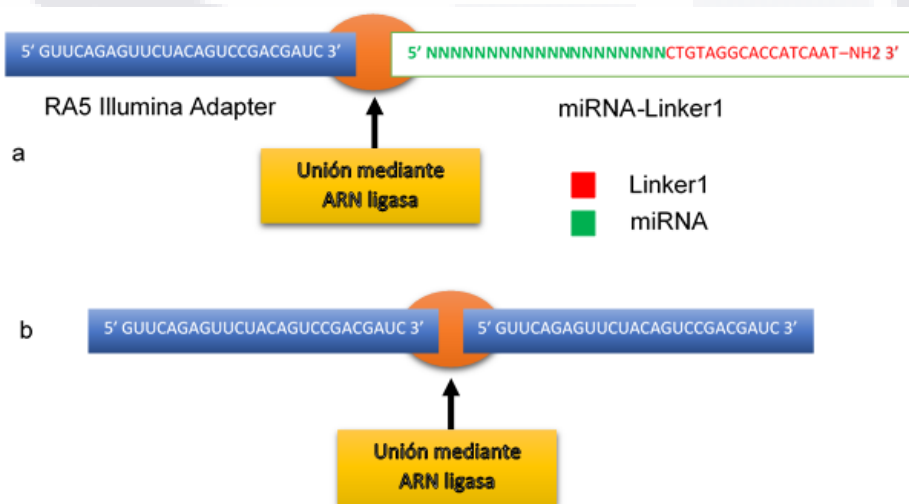


Figura 4. Ligación del adaptador 5'. a) Unión deseada entre la primera ligación y el RA5 en el extremo 5'. b) Producto vacío o no deseado, en donde dos adaptadores RA5, se pliegan en sus extremos 3' y 5'.

### 6.9.6 Síntesis de ADNc

Se utilizó el kit Máxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT de ThermoScientific®, con el oligonucleótido BRIDGE RT, diseñado con la secuencia complementaria a la del adaptador Linker1, así como la secuencia de reconocimiento que los sistemas Illumina utilizan para secuenciar (Figura 5). La reacción se hizo añadiendo 6.8 µL del producto previamente ligado y 4.2 µL del oligonucleótido BRIDGE RT, la mezcla se incubó a 65 °C durante 5 min seguida de una incubación inmediata en hielo. Por otro lado, se preparó la reacción complementaria utilizando 4 µL de First Strand Buffer 10X, 2 µL de DTT al 10 mM y 1 µL de dNTP's al 10 mM. Una vez terminado el tiempo de la primera reacción, se mezclaron ambas y se incubaron a 42 °C durante 5 min. Se obtuvieron en total 18 µL de reacción, a los cuales posteriormente se agregaron 2 µL de Maxima Enzyme Mix, (RNase Out, Enzima RT), se incubaron a 50 °C durante 30 min seguido de 85 °C por 5 min y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

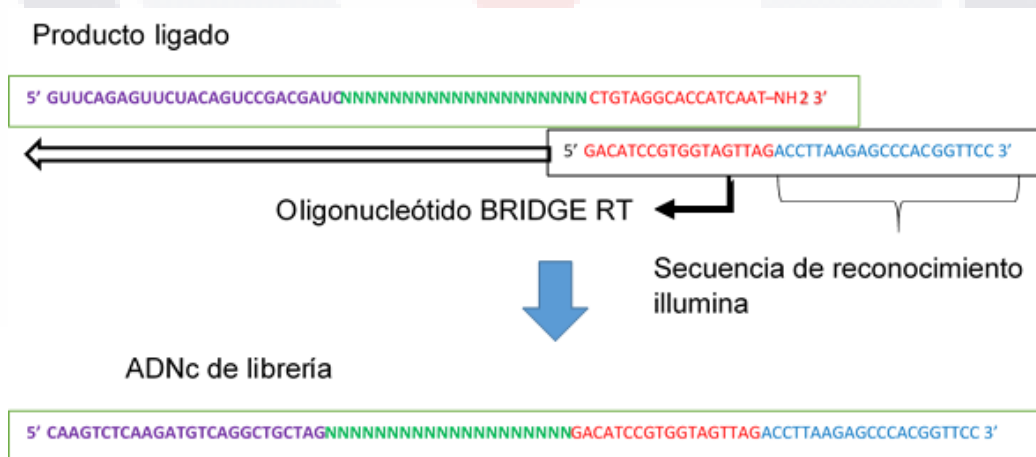


Figura 5. Síntesis de ADNc de la librería de miRNA. Estructura del oligonucleótido BRIDGE RT y síntesis de ADN complementario (ADNc) de los productos ligados anteriormente.



durante 30 s, seguido de 15 ciclos de una desnaturalización a 98 °C por 15 s, alineamiento a 60 °C durante 30 s, y una fase de extensión de 15 s a 72 °C, finalizando con una extensión final de 72 °C por 5 min.

Figura 6. RT-PCR e inserción de índices a las librerías de miRNA. a) ADNc complementario obtenido. b) Oligonucleótido con adaptadores illumina 5' y oligonucleótido adaptador illumina 3' que incluye la secuencia índice para cada librería. c) Construcción completa de librería de miRNA.

#### 6.9.8 Electroforesis de PCR de librerías

Los productos de PCR se corrieron en una electroforesis de gel de poliacrilamida al 6 % a 140 volts, durante 3 horas y media. En cada pozo se cargaron 60 µL de muestra, compuesta de 30 µL de producto de PCR y 30 µL de buffer de carga 5X. Al terminar, el gel se tiñó con bromuro de etidio durante 7 min y se visualizó con luz UV. Posteriormente, se recuperó la banda mediante un corte correspondiente a la zona entre los 150 y 165 pares de base. La banda cortada se pasó a un microtubo de 1.5 mL y se realizó una precipitación del material genético, como el mencionado en el paso 6.9.3.

#### 6.9.9 Digestión de las librerías con EcoR1

La digestión de las librerías se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo de *EcoR1* de Promega en tubos de 200 µL. Para cada reacción se utilizaron 0.5 µL de enzima *EcoR1*, para después incubarla a 37 °C durante 30 min, e inactivarla a 65 °C durante 10 min. Al finalizar la digestión los productos se corrieron en un gel de poliacrilamida al 6 % a 120 volts, durante 45 min, posteriormente se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron las bandas con un fotodocumentador.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Extracción de ARN de guayaba

Se obtuvo ARN de tallo, hoja y de los estadios de maduración verde, rayado, maduro y sobre maduro. La integridad del material genético fue verificada mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1 % (Figura 7).

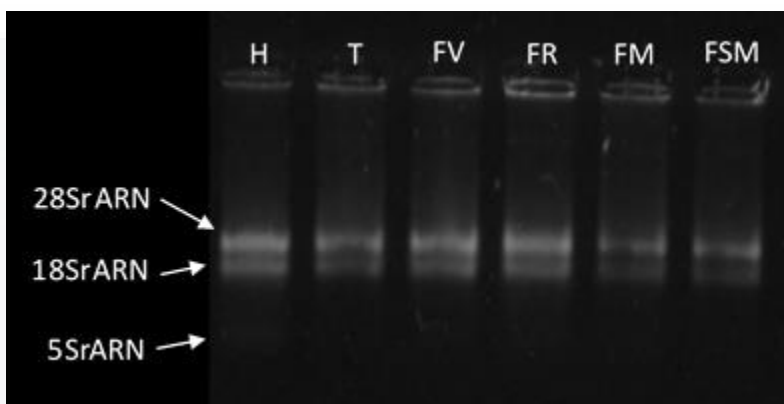


Figura 7. Muestras de ARN de diferentes tejidos de la guayaba. H) Hoja, T) Tallo, FV) Fruto verde, FR) Fruto rayado, FM) Fruto maduro, FSM) Fruto sobre maduro.

De acuerdo con la intensidad de las bandas, las muestras de hoja, fruto verde, y fruto rayado, fue donde mayor cantidad de ARN se obtuvo. Resultados similares fueron obtenidos por Carpinetti et al. (2021) y Gudenschwager et al. (2012) quienes al extraer ARN total de los frutos de la guayaba, aguacate, durazno y uva utilizando el método CTAB, obtuvieron bandas bien definidas y grandes cantidades de ARN mensajero y ARN de las subunidades ribosomales 28S y 18S. Además, mencionan que es uno de los protocolos más eficientes y que da mayor cuidado a la integridad del ARN, además de evitar contaminación por carbohidratos y compuestos fenólicos, metabolitos encontrados en altas cantidades en el fruto de la guayaba (Padilla et al., 2014).

## 7.2 Cuantificación de ARN

La pureza y cantidad del material genético fue medida utilizando espectrofotómetro Colibrí® (Tabla 5).

**Tabla 5. Cuantificación y parámetros de calidad de ARN obtenido.**

Muestra	Concentración (µg/mL)	A230/260	A280/260
Hoja	163.85	2.04	1.86
Tallo	73.52	1.32	1.71
Fruto verde	127.61	2.01	2.09
Fruto rayado	91.97	1.61	1.78
Fruto maduro	82.22	0.7	1.68
Fruto sobre maduro	75.43	0.25	1.74

Las muestras de ARN de hoja, fruto verde y fruto rayado obtuvieron la mayor concentración concordando con lo visto en el gel antes mencionado. Las muestras que tienen un valor de A230/260 menor a 1.8, indica la presencia de contaminantes como carbohidratos y fenoles, sustancias que se encuentran en altas concentraciones en la guayaba. Los valores mayores a 1.8 y menores a 2.1 de la relación A280/260 indican que la muestra está libre de contaminantes de tipo carbohidrato y proteico (Maniatis et al., 1982). Hallazgos parecidos fueron reportados por Carpinetti et al. (2021) y Gudenschwager et al. (2012) quienes demostraron que utilizando el método de CTAB, se obtienen cantidades de ARN total de entre 190 a 690 ng/µL, cantidades incluso más pequeñas que las obtenidas con nuestro protocolo. Además, en sus resultados también se observan valores de absorbancia de 1.8 a 2.2 para el rango de A260/280 y de 1.4 a 2.3 para A230/260 concordantes con nuestros resultados. Estos últimos valores, ellos los describen como óptimos para cualquier muestra de ARN que quiera ser utilizada para síntesis de ADNc o bien RT-PCR directa. Para la síntesis de ADNc se realizaron diluciones a las muestras hasta obtener una concentración final de 10 µg/mL de ARN.



### 7.3 RT-PCR de los genes de interés

Todas las pruebas de RT-PCR fueron realizadas utilizando 3  $\mu$ L del ADNc correspondiente a las muestras y con una concentración final de 150 ng/ $\mu$ L. Cada par de oligonucleótidos fue probado en todos los tejidos incluidos aquellos que la literatura menciona son específicos para la expresión de dicho gen o bien en donde han encontrado una mayor expresión.

La RT-PCR de *PgGly1* resulto en un producto de 550 pb observado en todos los órganos de la planta y estadios de maduración del fruto, siendo las bandas más grandes las de tallo, hoja y estadios de maduración rayado y maduro. La banda de menor intensidad es la de raíz y estadio sobre maduro (Figura 8). Estos hallazgos demuestran que el gen de interés se expresa en todos los tejidos. Lo que va de acuerdo con lo mencionado por Corbacho et al. (2018) y Parra-Lobato et al. (2017) quienes demostraron que es durante estos estadios de maduración del fruto y órganos de la planta donde mayor expresión de las glucosilceramidasa se observa.

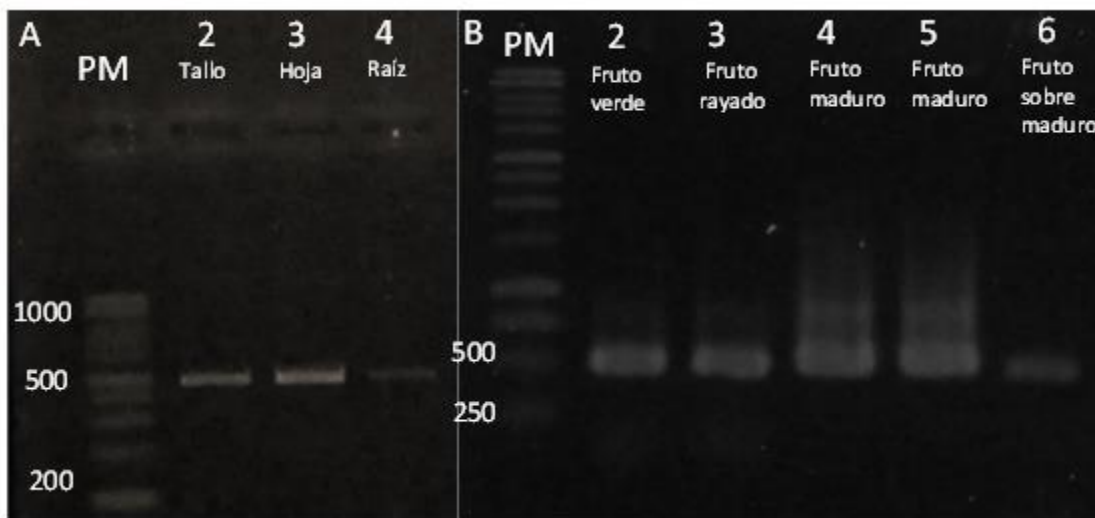


Figura 8. RT-PCR del gen *PgGly1*. A) Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2-4: órganos de la planta, tallo, hoja y raíz. B) Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2-6: estadios de maduración del fruto verde, rayado, maduro y sobremaduro con un producto de RT-PCR de aproximadamente 550 pb.

Los resultados de la RT-PCR del gen *PgE17* muestran una sola banda de aproximadamente 350 pb de tamaño en todos los tejidos, confirmando la expresión de este gen en todas las muestras (Figura 9). Las bandas más notorias y grandes se encontraron en tallo y en los estadios de maduración rayado, maduro y sobremaduro, mientras que la banda más tenue fue en raíz. Esto concuerda con lo encontrado por Miedes et al. (2011) y Jara et al. (2019) quienes obtuvieron niveles de expresión similares en los mismos estadios y mencionan que la expresión de este gen se da de manera proporcional desde las primeras etapas de maduración.

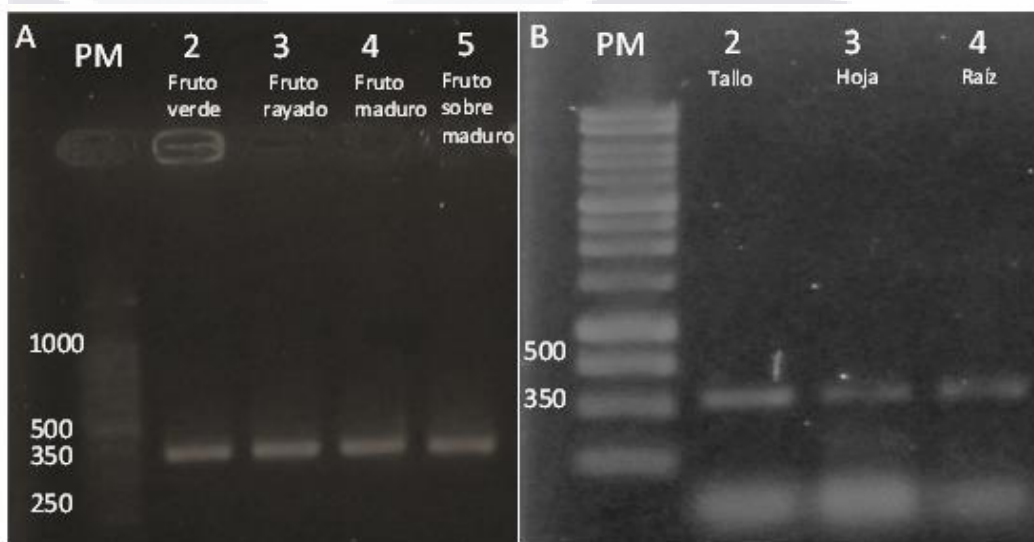


Figura 9. RT-PCR del gen *PgE17*. A) Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2-5: estadios de maduración del fruto verde, rayado, maduro y sobremaduro con un producto de RT-PCR de aproximadamente 350 pb. B) Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2-4: órganos de la planta, tallo, hoja y raíz con un producto de RT-PCR de aproximadamente 350 pb.

Para el gen de *PgGa1* la RT-PCR se obtuvo una sola banda de aproximadamente de 550 pb en todos los estadios de maduración y órganos, las bandas más nítidas y gruesas fueron las de hoja y estadio sobre maduro, las bandas más tenues y poco visibles fueron las de raíz y estadio maduro (Figura 10). Resultados similares habían sido descritos por Huijuan et al. (2018), quien menciona que la actividad enzimática de las  $\beta$ -galactosidasas incrementa de acuerdo con el ablandamiento del fruto, proceso que tiene su pico en dicho estadio.

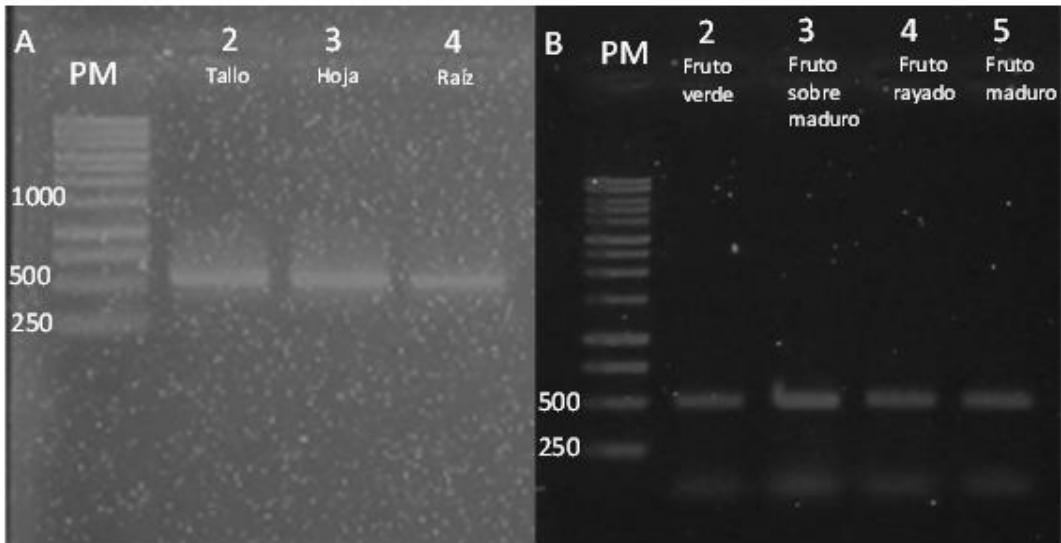


Figura 10. RT-PCR del gen *PgGa1* en ADNc de fruto maduro. Carril 1: marcador de peso molecular, carriles 2 a 4: producto de RT-PCR de un tamaño de 500 pares de base aproximadamente.

#### 7.4 Secuenciación de productos de RT-PCR

Se enviaron los productos de RT-PCR *PgE17*, *PgGa1* y *PgGly1* previamente purificados como se explica en los apartados 6.4 y 6.5 de la metodología, al servicio de secuenciación de Macro Gene USA, los fragmentos resultantes y sus tamaños se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6. Tamaño, nombre y gen al que pertenecen los fragmentos obtenidos.**

Nombre	Gen	Longitud obtenida (pb)
<i>PgE17</i>	$\beta$ -1,4-endoglucanasa 17	331
<i>PgGa1</i>	$\beta$ -galactosidasa 1	750
<i>PgGly1</i>	Glucosilceramidasa no lisosomal	538

#### 7.5 Análisis bioinformático de los genes de interés

Se realizó un análisis bioinformático que incluyó la búsqueda y alineamiento múltiple con secuencias similares en la base de datos del NCBI, identificación de dominios

conservados entre los fragmentos de interés y sus genes correspondientes pertenecientes a *E. grandis*, comparación de propiedades fisicoquímicas entre los fragmentos de interés y sus genes correspondientes de otras plantas y una búsqueda de similitud entre los fragmentos de interés y los genomas de *E. grandis* y guayaba. Los fragmentos utilizados para dichos análisis se obtuvieron a partir de un consenso entre las secuencias forward y reverse resultantes de la secuenciación.

### 7.5.1 Análisis de similitud nucleotídico y aminoacídico de los genes de interés

Se obtuvo una secuencia de 331 pb para PgE17, la traducción de la proteína putativa dio como resultado un fragmento de 109 aa. Los análisis de similitud BLASTn y BLASTp mostraron un 91 % de similitud con la secuencia de  $\beta$ -1,4-endoglucanasa 17 de *E. grandis* y en un porcentaje menor (85 – 90 %) en otras plantas de la familia *Myrtaceae* (Figura 11). El análisis también reveló que PgE17 es parte de una región muy conservada en la familia de las proteínas  $\beta$ -1,4-endoglucanasas llamado motivo PLN02266, que se encuentra dentro del dominio Glyco\_Hydro\_9 característico de la familia 9 de las glucosilhidrolasas (GH9) y encontrado en todas las  $\beta$ -1,4-endoglucanasas conocidas. La familia GH9 es conocida por que todos sus integrantes modifican la composición de la pared celular de las plantas de forma directa o indirecta (Jara et al., 2019). Por otra parte, se encontró que la secuencia aminoacídica de PgE17 contiene un gran número de aa hidrofóbicos continuos que le ayudan a dar forma a su estructura tridimensional, lo cual es una característica entre las enzimas  $\beta$ -1,4-endoglucanasas (Davies y Henrissat, 1995).

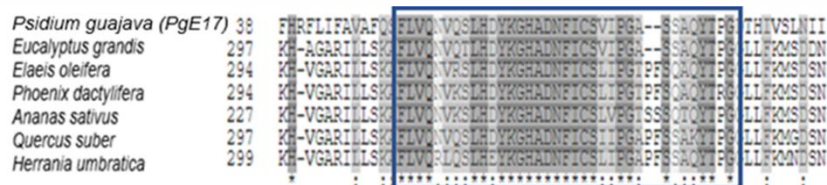


Figura 11. Alineamiento múltiple de PgE17 y otras secuencias de  $\beta$ -1,4-endoglucanasa 17 de plantas. El recuadro azul muestra el motivo PLN02266.

Para PgGa1, se obtuvo una secuencia de 750 pb de longitud y una secuencia de 249 aa de su traducción virtual. El análisis de similitud BLASTn y BLASTp y alineamiento múltiple con secuencias de  $\beta$ -galactosidasa 1, perteneciente a otras plantas mostró una similitud entre el 90 y 95 % (Figura 12). Los porcentajes de similitud más altos obtenidos fueron de 98 % con *Rhodamnia argentea*, 96.3 % con *Syzygium oleosum* y 96 % con *E. grandis*. Estos resultados eran esperados debido a que todos son miembros de la familia *Myrtaceae*. PgGa1 también contiene el sitio activo putativo GGPIILSQUIENEF (Figura 10, cuadro color negro) localizado después de la péptido señal, y es característico de la familia glucosil hidrolasas 35 (GH35) a la cual pertenecen todas las  $\beta$ -galactosidasas y que está dentro de la región N-terminal (Zinin et al., 2002) y actúa modificando los residuos de p-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosidos y  $\beta$ -1,4-D-galactanos de la pared celular (Carey et al., 1995; Braga et al., 2018).

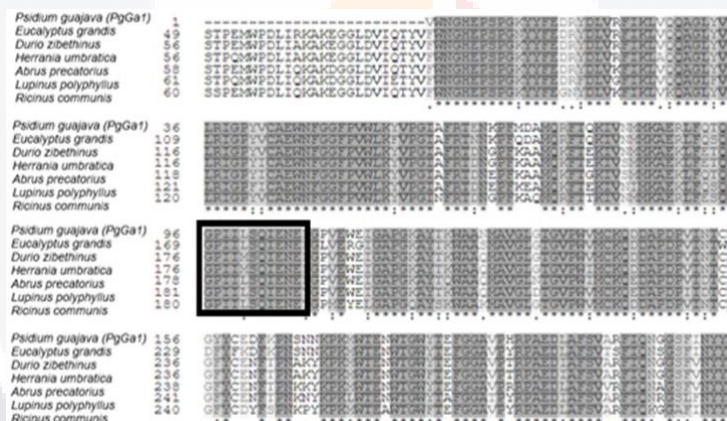


Figura 12. Alineamiento múltiple de PgGa1 y otras secuencias de  $\beta$ -galactosidasa 1 de plantas. El cuadro color negro muestra el sitio activo conservado GGPIILSQUIENEF.

Para PgGly1 se obtuvo una secuencia de 538 pb de largo y una proteína putativa de 179 aa. El análisis BLASTn reveló similitud arriba del 92 % con múltiples secuencias de glucosilceramidasa no lisosomales pertenecientes a *E. grandis*, *Phoenix dactylifera*, *R. argentea* y *S. oleosum*. Estos resultados concuerdan con los encontrados en las secuencias anteriores, ya que todos estos organismos pertenecen a la familia *Myrtaceae*. Esto indica que sus secuencias nucleotídicas están altamente conservadas entre especies. Por otra parte, la secuencia

aminoacídica de PgGly1 obtuvo un 94 % de similitud comparadas con secuencias de glucosilceramidasa no lisosomales de otras plantas (Figura 13). Además, dentro de la proteína putativa PgGly1 se encontró la región YMRPLAIWAMQWAL característica de la familia glucosil hidrolasas 116 (GH116) (Figura 13, recuadro color azul). Esta secuencia se localiza en la región C-Terminal de las glucosilceramidasa no lisosomales y también se encuentra en todas las demás secuencias de proteínas similares en plantas incluidas en el alineamiento múltiple. Resultados similares fueron descritos por Cobucci-Ponzano, et al. (2010) y Dai G, et al. (2020); quienes al alinear secuencias aminoacídicas de glucosilceramidasa no lisosomales de hongos, plantas y bacterias, observaron que las regiones terminales C, N, sitios activos y catalíticos estaban muy conservados dentro y entre especies. Además, otros autores concuerdan con que las enzimas de la familia GH116 son altamente similares entre especies (Charoenwattanasatien et al., 2016; Ferrara et al., 2014; Fredj, et al., 2018).

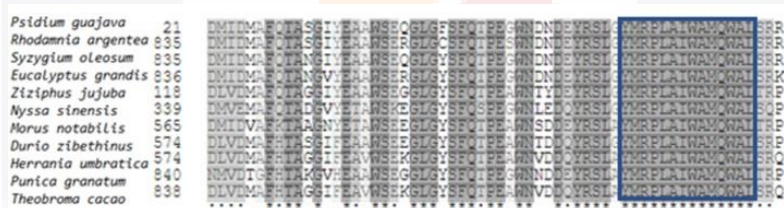


Figura 13. Alineamiento múltiple aminoacídico entre PgGly1 y otras glucosilceramidasa no lisosomales. El recuadro azul muestra el motivo YMRPLAIWAMQWAL, característico de la familia GH116.

#### 7.5.2 Análisis de similitud de PgE17 y PgGa1 y genomas de guayaba y *E. grandis*.

El análisis de similitud BLASTn de PgE17 y el genoma de *E. grandis* mostró similitud en secuencias dentro de los cromosomas 2, 4 y 8. Dichas secuencias fueron traducidas a aminoácidos y se realizó un alineamiento contra la proteína putativa de PgE17 revelando que es 89 % similar a la encontrada dentro del cromosoma 8 (Figura 14), mientras que la similitud encontrada en los cromosomas 2 y 4 fueron de 51 % y 35 % respectivamente (Tabla 7).

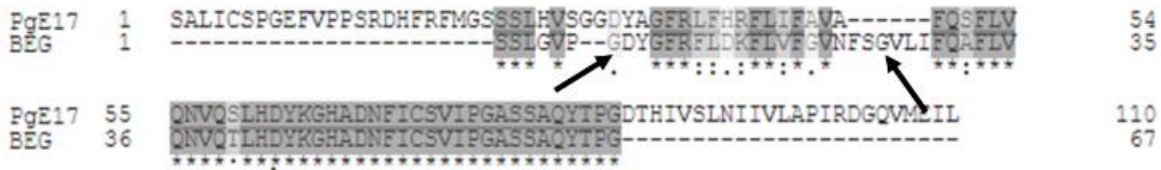


Figura 14. Alineamiento de secuencias aminoacídicas entre PgE17 y la secuencia encontrada en el cromosoma 8 de *E. grandis*. Las flechas negras indican huecos en la secuencia.

**Tabla 7. Secuencias similares a PgE17 encontradas en el genoma de *E. grandis***

Cromosoma	Posición (nt)	Gen	% Similitud con PgE17
8	12681226-12684786	$\beta$ -1,4-endoglucanasa 1	89.0
4	30218926-30221748	$\beta$ -1,4-endoglucanasa	51.6
2	48242919-48248035	$\beta$ -1,4-endoglucanasa 4	35.4

El análisis de similitud BLASTn de PgE17 y el genoma de guayaba (Feng et al., 2021) reveló similitud del 98.2 % con una secuencia encontrada en el cromosoma 4 entre los nucleótidos 9,959,984 y 9,960,316 (Figura 15). Este descubrimiento indicaría que se trata del mismo gen y con ello podemos afirmar que el gen de  $\beta$ -1,4-endoglucanasa 17 de la guayaba se encuentra en el cuarto cromosoma.

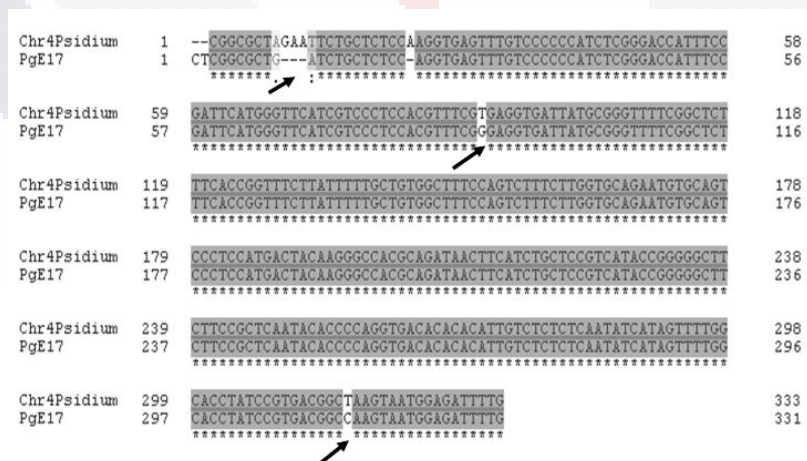


Figura 15. Alineamiento nucleotídico de PgE17 y el cromosoma 4 del genoma de la guayaba. Las flechas negras indican los huecos y diferencias entre ambas secuencias.

El análisis de similitud de PgGa1 contra el genoma de *E. grandis* mostró que existen secuencias similares en los cromosomas 1, 3, 4, 6, 7 y 9 con un porcentaje de similitud entre 71 y 92 % (Tabla 8). Sin embargo, una secuencia encontrada en el cromosoma 10 obtuvo el mayor porcentaje de similitud con 98.2 %, lo que podría indicar que esta secuencia pertenece a la misma proteína ( $\beta$ -galactosidasa 1) con la misma función. Dicha secuencia fue traducida a aminoácidos y se alineó con PgGa1 (Figura 16).



Figura 16. Alineamiento de secuencias aminoacídicas entre PgGa1 y la secuencia encontrada en el cromosoma 10 de *E. grandis*. Las flechas negras indican huecos en la secuencia.

**Tabla 8. Secuencias similares a PgGa1 encontradas en el genoma de *E. grandis***

Cromosoma	Posición (nt)	Gen	% Similitud con PgGa1
10	34195225-34202265	$\beta$ -galactosidasa 1	98.2
9	33617356-33621921	$\beta$ -galactosidasa 11	88.2
7	32601186-32606779	$\beta$ -galactosidasa 5	92.4
6	43199799-4320781	$\beta$ -galactosidasa 1	85.9
4	12963708-12970304	1,3- $\beta$ -galactosidasa	72.8
3	74986360-74991922	$\beta$ -galactosidasa 1	85.1
1	27539469-27543506	$\beta$ -galactosidasa 15	71.2

Por otra parte, el análisis de similitud BLASTn de PgGa1 y el genoma de la guayaba (Feng et al., 2021), reveló una secuencia idéntica en el cromosoma 6 y otra similar en el cromosoma 3. La secuencia encontrada en el cromosoma 6 tiene una



homología con PgGa1 del nucleótido 31 al 641 y está localizada entre los nucleótidos 38,076,354 y 38,077,943 (Figura 17), el análisis también mostró que este fragmento contiene 6 secuencias intrónicas de 979 pb de longitud juntas. Con el descubrimiento de esta secuencia homóloga podemos asegurar que se trata del mismo gen ( $\beta$ -galactosidasa 1) y que está en el cromosoma 6 del genoma de la guayaba.

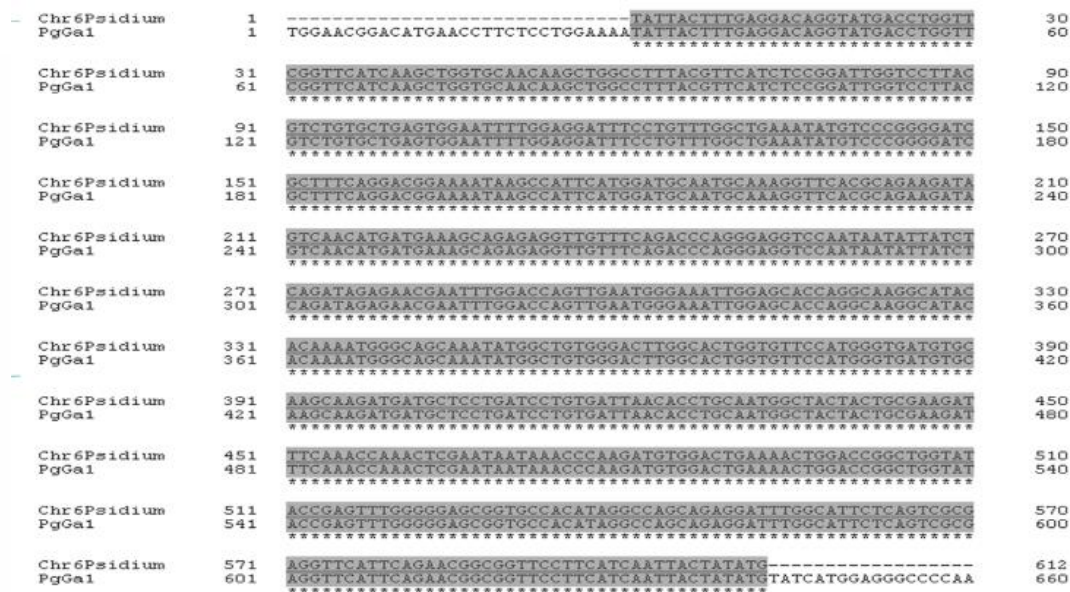


Figura 17. Alineamiento nucleotídico de PgGa1 y el cromosoma 6 del genoma de la guayaba.

La secuencia del cromosoma 3 de guayaba se encuentra entre los nucleótidos 7,575,108 y 7,575,192 y obtuvo un 83.53 % de similitud con la región que comprende del nucleótido 367 al 451 de PgGa1, esto podría indicar que se trata de un gen diferente, pero, perteneciente a la familia GH35 (Feng et al., 2021).

### 7.5.3 Análisis fisicoquímico de las proteínas putativas

Para el análisis de las propiedades fisicoquímicas de las proteínas putativas PgE17, PgGa1 y PgGly1 (Tabla 9) se tomaron en cuenta los parámetros de índice de inestabilidad, que mide qué tan estable es una proteína bajo condiciones *in vivo* e *in vitro*, clasificándola como inestable con un valor debajo de 40 puntos. El punto

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

isoeléctrico (pI), que indica el valor de pH en el que una proteína no tiene carga. El índice alifático que muestra la termoestabilidad de las proteínas, midiendo el volumen relativo ocupado por las cadenas alifáticas laterales de aminoácidos como la alanina, valina, leucina e isoleucina; un valor alto indica un rango de temperaturas más amplio en el cual la proteína es estable. Y por último el valor GRAVY que clasifica las proteínas como hidrófobas o hidrofílicas; un valor negativo significaría hidrofilia y positiva hidrofobicidad (Gasteiger et al., 2005).

PgE17 obtuvo un valor de 40.15 puntos en su índice de estabilidad por lo que se considera que es una proteína putativa estable. Su pI fue de 6.25 lo que la clasifica como una proteína putativa de naturaleza ácida considerando un valor neutral de 7, por el contrario, la proteína completa de *E. grandis* resultó básica. El índice alifático de PgE17 fue de 96.57 puntos, siendo más alto que el de la proteína completa (74.52) de *E. grandis* indicando que PgE17 es más termoestable. El valor GRAVY de PgE17 fue de 0.344, lo que lo clasifica como una proteína hidrofóbica, como casi todas las proteínas membranosas, aunque, este no es el caso de PgE17. Las diferencias encontradas entre PgE17 y la proteína completa de  $\beta$ -1,4-endoglucanasa 17 de *E. grandis* son debidas probablemente al pequeño tamaño de PgE17 y a que probablemente no se traten de la misma proteína. Esto sería correcto considerando que las diferencias aminoacídicas, es algo común para los integrantes de esta familia de proteínas (Tanthanuch et al., 2008).

Por último, la  $\beta$ -1,4-endoglucanasa 17 del cromosoma 4 del genoma de guayaba tiene un pI teórico de 6.28, índice alifático de 94.55, índice de inestabilidad de 37.89 que la clasifica como una proteína estable y un valor GRAVY de 0.274, que al contrario que la  $\beta$ -1,4-endoglucanasa 17 de *E. grandis*, tiene valores muy cercanos a los de PgE17, reforzando la idea de que se trata de la misma proteína.

El análisis fisicoquímico de PgGa1 y la  $\beta$ -galactosidasa 1 de *E. grandis* mostró que PgGa1 es de naturaleza ácida con un pI teórico de 5.54, a diferencia de la  $\beta$ -galactosidasa 1 de *E. grandis* que al obtener un valor de 8.32 se clasifica como básica. El índice de estabilidad de PgGa1 fue de 38.72, valor que se acerca mucho al de la  $\beta$ -galactosidasa 1 de *E. grandis* (39.67); el índice alifático para PgGa1 es de 63.16, lo que muestra que es termoestable aun con un valor lejano al de la  $\beta$ -

galactosidasa 1 de *E. grandis* (77.52). El valor negativo GRAVY obtenido (-0.476) clasifica a PgGa1 como una proteína hidrofílica de las cuales la mayoría son proteínas de tipo globular, lo que concuerda con la función que desarrolla en la pared celular, además de estar muy cercano al valor de la  $\beta$ -galactosidasa 1 de *E. grandis* (-0.344). La semejanza entre los valores obtenidos por estas dos secuencias podría indicar que son proteínas homologas en diferentes organismos, lo que soporta la idea de que las proteínas miembros de la familia GH35 están altamente conservadas dentro y entre especies (Tanthanuch et al., 2008). Además de ir de acuerdo con los resultados obtenidos para los análisis de filogenia y similitud. Por otra parte, las diferencias entre los valores de índice alifático y pl se atribuyen a la diferencia de tamaños que existe entre proteínas. Finalmente, la secuencia aminoacídica del cromosoma 6 del genoma de guayaba obtuvo un pl teórico de 6.18, índice alifático de 65.49, el índice de inestabilidad de 31.20 clasificándola como estable y un valor GRAVY de -0.298. La diferencia con los valores de PgGa1 es significativa y probablemente debido a la desigualdad de tamaño entre las secuencias.

**Tabla 9. Valores fisicoquímicos de PgE17 y PgGa1, sus regiones conservadas en el genoma de guayaba, una  $\beta$ -1,4-endoglucanasa 17 y  $\beta$ -galactosidasa 1 de *E. grandis*.**

Proteína	pl teórico	GRAVY	Índice alifático	Índice de inestabilidad	Longitud (aa)
$\beta$ -1,4-endoglucanasa 17 de <i>E. grandis</i>	8.98	-0.282	74.52	40.68	507
Cromosoma 4 de <i>P. guajava</i>	6.28	0.274	94.55	37.89	101
PgE17	6.25	0.344	96.57	40.15	108
$\beta$ -galactosidasa 1 de <i>E. grandis</i>	8.32	-0.248	77.52	39.67	722
Cromosoma 6 de <i>P. guajava</i>	6.18	-0.298	65.49	31.20	204
PgGa1	5.54	-0.476	63.16	38.72	248

Para PgGly1 el análisis de las propiedades fisicoquímicas (Tabla 10) mostró que contiene las principales características de las enzimas glucosilceramidasa no lisosomales, pero también algunas diferencias. Los resultados muestran que la región C-terminal de PgGly1 contiene un 9 % de residuos E y un 2.2 % de residuos de N, mientras que la misma región de la glucosilceramidasa no lisosomal de *E. grandis* obtuvo un 9 % de residuos de E y 2.6 % de residuos de N. Estos resultados concuerdan con los parámetros establecidos por Cobucci-Ponzano et al. (2010), quien menciona que la mayoría de las glucosilceramidasa no lisosomales en plantas, contienen un porcentaje de entre 8 a 9 % de residuos de E y un 2.6 % de residuos de N en su región C-terminal, y esto se considera una principal característica de las enzimas glucosilceramidasa no lisosomales pertenecientes a la familia GH116. Otra característica similar con las glucosilceramidasa no lisosomales que se observó con PgGly1, fueron los pI, ya que para nuestra secuencia se obtuvo un pI teórico de 5.04, el cual es razonablemente parecido a los descritos por Escuder-Rodríguez et al. (2018) quien al utilizar diferentes temperaturas para medir el pI de glucosilceramidasa no lisosomales, demostró que sus valores van de 5 a 6.

**Tabla 10. Parámetros fisicoquímicos de PgGly1 y glucosilceramidasa no lisosomales de plantas climatéricas y no climatéricas.**

Especies	pI	GRAVY	E y N %
<i>Psidium guajava</i> (PgGly1)	5.04	-0.440	E: 9 N: 2.2
<i>Citrus sinensis</i>	5.06	-0.303	E: 9.2 N: 3.9
<i>Cucumis sativus</i>	5.06	-0.322	E: 7.7 N: 1.3
<i>Eucalyptus grandis</i>	5.08	-0.369	E: 9 N: 2.6
<i>Musa acuminata</i>	5.07	-0.281	E: 9 N: 3.8
<i>Prunus persica</i>	5.07	-0.320	E: 7.7 N: 1
<i>Solanum lycopersicum</i>	5.04	-0.309	E: 7.7 N: 1

<i>Vitis vinifera</i>	5.05	-0.370	E: 6.4 N: 1.3
<i>Carica papaya</i>	5.09	-0.265	E: 10.3 N: 2.6
<i>Fragaria vesca</i>	5.08	-0.307	E: 7.7 N: 1
<i>Malus domestica</i>	5.04	-0.282	E: 9 N: 1

7.5.4 Identificación de dominios conservados en los genes de interés

La secuencia aminoacídica putativa de PgE17 contiene parte del dominio conservado Glyco\_hydro\_9 también presente en la  $\beta$ -1,4-endoglucanasa 17 de *E. grandis* y guayaba y que es característico de la familia GH9 (Figura 18).

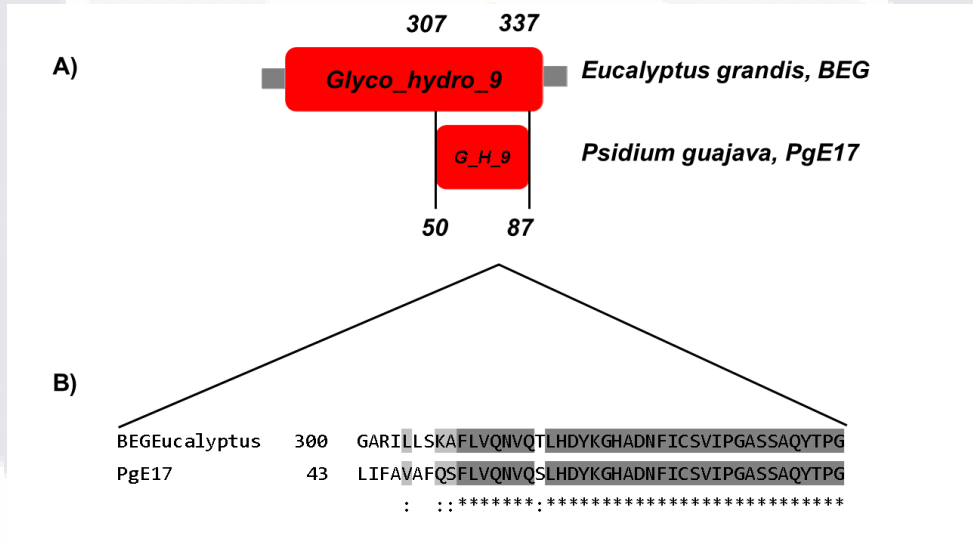


Figura 18. Dominio conservado entre PgE17 y la  $\beta$ -1,4-endoglucanasa 17 de *E. grandis*. A) Dominio conservado Glyco\_Hydro\_9. Los números indican la posición en cada secuencia aminoacídica. B) Alineamiento del motivo conservado PLN02266 dentro del dominio Glyco\_Hydro\_9 y PgE17.

En la secuencia aminoacídica putativa de PgGa1, se encontró el dominio conservado Glyco\_Hydro\_35 que es exclusivo de las  $\beta$ -galactosidasas y enzimas pertenecientes a la familia GH35. Este dominio se caracteriza por cambiar la configuración típica de las  $\beta$ -galactosidasa a una forma  $\beta$ -anomérica, la cual difiere

de la forma por tener libre el residuo Glu461 que interactúa con el carbono anomérico de las D-galactosas (Tanthanuch et al., 2008; Juers et al., 2012), permitiendo que realicen la función de hidrolizar los enlaces entre galactosa y glucosa (Zinin et al., 2002; Juers et al., 2012). Este dominio se localiza entre los residuos 29 y 335 de la  $\beta$ -galactosidasa 1 de *E. grandis* (Figura 19).

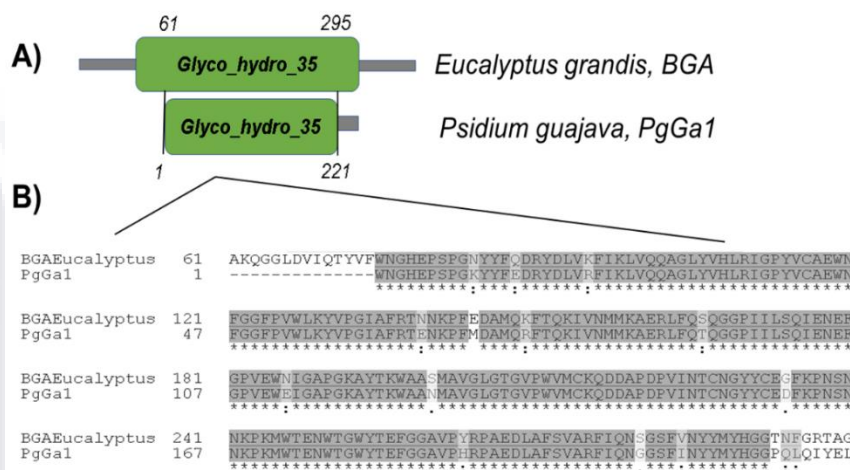


Figura 19. Dominio conservado entre PgGa1 y la  $\beta$ -galactosidasa 1 de *E. grandis*. A) Dominio conservado Glyco\_Hydro\_35 de la familia GH35 en la  $\beta$ -galactosidasa 1 de *E. grandis* y PgGa1, los números indican la posición en aminoácidos de su localización en cada secuencia. B) Alineamiento de las regiones conservadas entre ambas proteínas.

En PgGly1 se encontró una región en las posiciones 1 a 77 de residuos aa, homóloga a la glucosilceramidasa no lisosomal de *E. grandis* en las posiciones 811 a 888 (Figura 20). Esta región pertenece al sitio catalítico del dominio C-terminal conocido como Domain of Unknown Function o DUF608, característico de la familia GH116. El cual le permite hidrolizar residuos de azúcares en esfingolípidos (Fredj et al., 2018). Esta región es conocida por ser rica en residuos de ácido glutámico (E) y asparagina (N), que son clave para su acción catalítica (Cobucci-Ponzano et al., 2010). La similitud de los dominios DUF608 de PgGly1 y la glucosilceramidasa no lisosomal de *E. grandis* podría indicar que su función también podría estar involucrada en el desarrollo del fruto durante la maduración y no solamente en la liberación de residuos de glucosa y ceramida en animales, hongos, plantas y

bacterias (Boot et al., 2007; Breslow y Weissman, 2018; Chen et al., 2009; Markham et al., 2013; Martín et al., 2013; Yildiz et al., 2013).

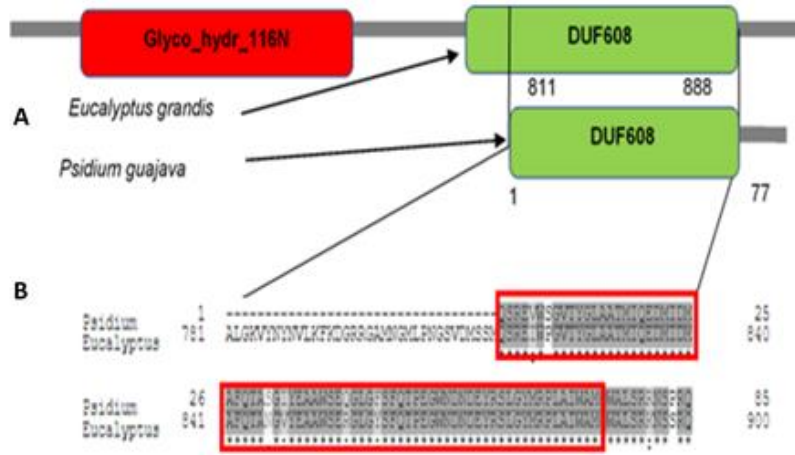


Figura 20. Dominios conservados entre PgGly1 y la glucosilceramidasa no lisosomal de *E. grandis*. A) Dominio conservado DUF608 de la familia GH116 en la glucosilceramidasa no lisosomal de *E. grandis* y PgGly1, los números indican la posición en aminoácidos de su localización en cada secuencia. B) Alineamiento de las regiones conservadas entre ambas proteínas.

### 7.6 Análisis filogenético de los genes de interés

El análisis filogenético de PgE17 mostró la formación de tres clades principales: el A en donde solamente se encuentran miembros de la familia *Myrtaceae*, el B con las familias *Rutaceae* y *Malvaceae* y el C que contiene a las familias *Fabaceae* y *Arecaceae* (Figura 21). PgE17 se encuentra dentro del clade A, ya que la guayaba pertenece a la familia *Myrtaceae*. La división de múltiples familias en los 3 clades demuestra que existen diferencias significativas entre las secuencias de  $\beta$ -1,4-endoglucanasa 17 provenientes de diferentes plantas. La razón detrás de estas diferencias fue descrita previamente por Jara y Castro (2019), quienes establecen que son debidas a la divergencia evolutiva.

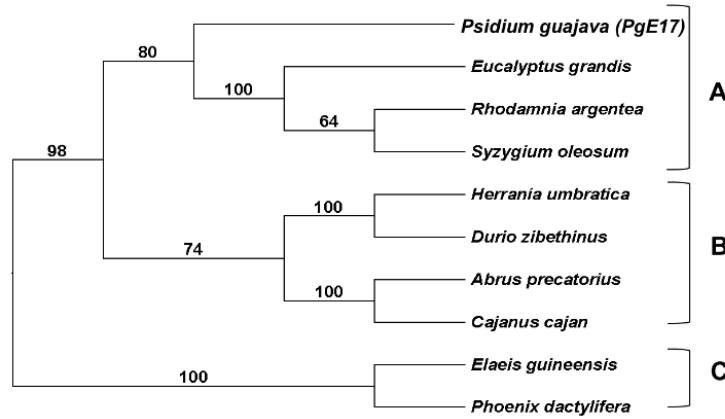


Figura 21. Dendrograma de distancia evolutiva de la proteína putativa PgE17 y otras  $\beta$ -1,4-endoglucanasa 17 de plantas. Se muestran 3 nodos de familias diferentes con un bootstrap de 100. A) Familia *Myrtaceae* donde se incluye PgE17. B) Familias *Rutaceae* y *Malvaceae*. C) Familias *Fabaceae* y *Arecaceae*.

En el análisis filogenético de PgGa1, se observa la formación de dos clades: el A perteneciente a la familia *Myrtaceae* y el B con miembros de la familia *Malvaceae* y *Fabaceae* (Figura 22). La proteína putativa PgGa1 se encuentra dentro del clade A ya que la guayaba pertenece a la familia *Myrtaceae*. La baja diversificación de nodos indica que las secuencias aminoacídicas de  $\beta$ -galactosidasa 1 están altamente conservadas dentro y entre especies. Una filogenia con un número similar de nodos ya había sido descrita por Smith y Gross (2000) y Tanthanuch et al. (2008) anteriormente, quienes mencionan que los genes de  $\beta$ -galactosidasa 1 en plantas, han sufrido un mínimo de cambios evolutivos desde su divergencia de plantas y animales.

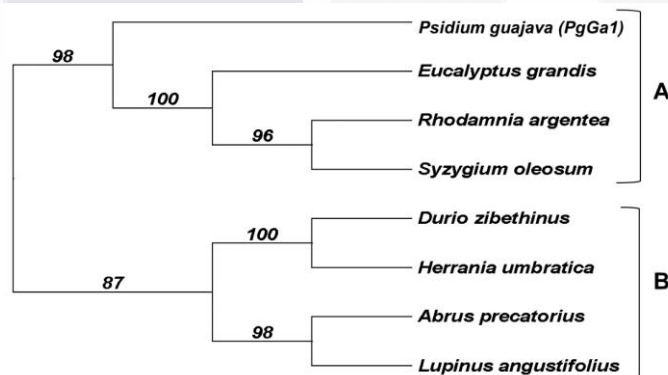




Figura 22. Dendrograma de distancia evolutiva de la proteína putativa PgGa1 y otras  $\beta$ -galactosidasas 1 de plantas. Se observan 2 nodos con un bootstrap de 100: A) familia *Myrtaceae*, B) familias *Malvaceae* y *Fabaceae*

El análisis filogenético de la proteína putativa PgGly1 (Figura 23), muestra dos clades, el A donde se encuentran integrantes de la familia *Myrtaceae* y el B que contiene múltiples miembros de las familias: *Malvaceae*, *Rhamnaceae*, *Nyssaceae*, *Moraceae*, *Bombacaceae* y *Sterculiaceae*. PgGly1 se encuentra en el clade A, debido a que la guayaba pertenece a la familia *Myrtaceae*. Resultados similares fueron encontrados por Cobucci-Ponzano et al. (2010), quienes mostraron en sus filogenias la formación de grupos exclusivos para miembros de la familia *Myrtaceae*, lo que soporta la idea de que la secuencia aminoacídica de las glucosilceramididasas no lisosomales está altamente conservada entre los miembros de esta familia.

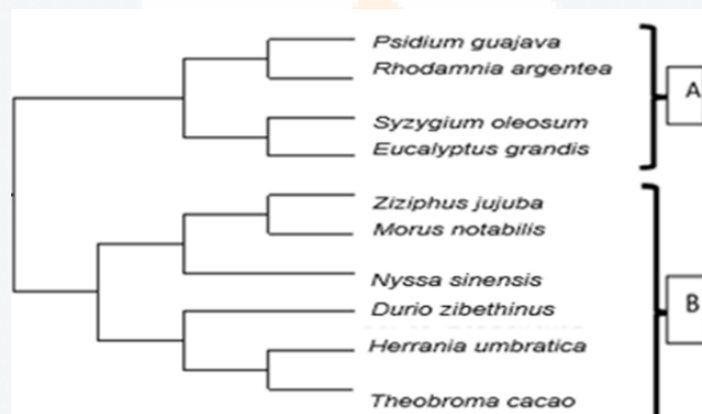


Figura 23. Dendrograma de distancia evolutiva de la proteína putativa PgGly1 y otras glucosilceramididasas no lisosomales de plantas. Se observan 2 nodos con un bootstrap de 100: A) familia *Myrtaceae*, B) familias *Malvaceae*, *Rhamnaceae*, *Nyssaceae*, *Moraceae*, *Bombacaceae* y *Sterculiaceae*.

### 7.7 Análisis de co-expresión *in silico* de los genes de interés

Las secuencias aminoacídicas putativas de los genes de interés fueron usadas como plantillas para la búsqueda de genes similares de plantas en la plataforma STRING, tomando como modelo en los 3 casos los genes de *E. grandis* correspondientes a cada fragmento para el análisis.

El análisis *in silico* de *PgE17* mostró que se co-expresa directamente con proteínas que modifican la pared celular y proteínas relacionadas con rutas metabólicas de síntesis de compuestos aromáticos (Figura 24). Estas proteínas se relacionan con la maduración de la siguiente manera: las expansinas que hidrolizan los puentes de hidrógeno de celulosa y hemicelulosa, causan la expansión de la pared celular (Fukuda, 2014). Sobre las expansinas Reyes et al. (2013) al medir la expresión de dos de ellas (*PgEXP1* y *PgEXP2*) en diversos estadios de maduración del fruto de guayaba, demostró que sus mayores niveles de expresión se encontraban durante los estadios rayado y maduro respectivamente, concluyendo con la importancia de estas enzimas para el desarrollo y maduración del fruto. También se co-expresa con la  $\beta$ -endo-1,4-manosidasa que hidroliza los enlaces  $\beta$ -1,4 internos de las cadenas de manosa de la pared celular, produciendo el ablandamiento característico durante la maduración (Wang et al., 2015). Por otra parte, la pectinaesterasa 38 desramifica las cadenas de homogalacturanos de la pared celular, liberando residuos de celulosa y hemicelulosa, incrementando el ablandamiento del fruto (Cosgrove, 2016). También se co-expresa con la péptido deformilasa que hidroliza los grupos N-formil de las secuencias inmaduras de proteínas cloroplasmáticas en plantas (Hou et al., 2007); un malfuncionamiento de esta enzima causa la acumulación de proteínas mal plegadas y clorosis, lo que resulta en un mal desarrollo y malformación de tejidos, incluido el fruto (Hou et al., 2004). La co-expresión con la de-fosfo-CoA-cinasa es removiendo los grupos fosfato de los grupos de CoA fosforilados para la biosíntesis de la coenzima A, que es esencial para el intercambio gaseoso de las plantas durante la maduración del fruto (Shimosaka y Makarova, 2019). Por último, la co-expresión con el factor de transcripción MYB51-like se relaciona al proceso de maduración debido a que actúa como un transportador de calosa a la pared celular (Bondada et al., 2014). Incremento de las concentraciones de calosa en la pared celular y floema, ha sido observado durante la maduración de la uva (*V. vinifera*) (Bondada et al., 2017). Con respecto a la co-expresión de *PgE17* con enzimas que producen compuestos aromáticos, ha sido observado que la hidroxil-isobutil-CoA hidrolasa toma parte en su síntesis durante la maduración del fruto del durazno (*Prunus persica* cv. Hjingmilu) (Zhou et al., 2018); así como en la

biosíntesis de ácidos grasos (Liang et al., 2014)., que también han sido relacionados con la maduración del fruto de oliva (*Olea europaea* cv. Picual) (Corbacho et al., 2018; Parra-Lobato et al., 2017). El factor ODORANT1 junto al factor de transcripción EOBII regula la producción de compuestos aromáticos en flores y algunos frutos durante la maduración como el tomate (*S. lycopersicum*), fresa (*F. vesca*) y arándano (*Vaccinium corymbosum*) (Colquhoun et al., 2013).

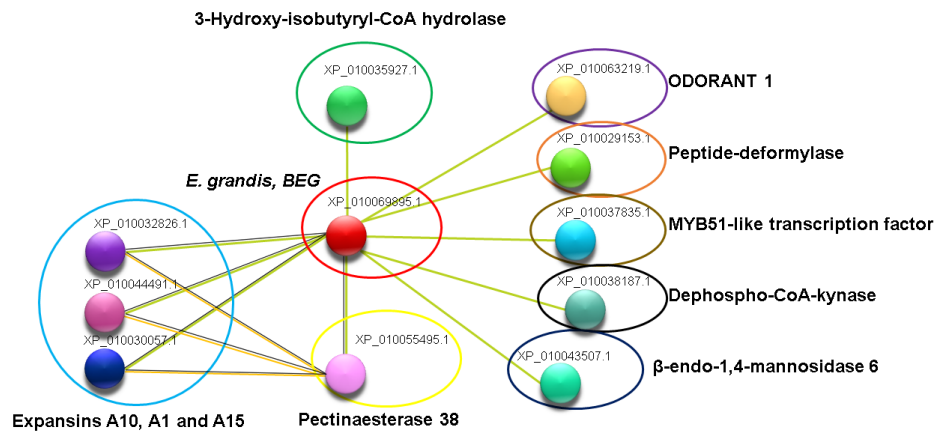


Figura 24. Análisis de co-expresión de la  $\beta$ -1,4-endoglucanasa 17 de *E. grandis* similar a *PgE17*. Círculo azul, expansinas A10 (XP\_010032826.1); A1(XP\_010044491.1) y A15 (XP\_010030057.1). Círculo verde, hidroxí isobutiril-CoA hidrolasa 3 (XP\_010035927.1). Círculo amarillo, pectinaesterasa 38 (XP\_10055495.1). Círculo púrpura, factor ODORANT 1 (XP\_10063219.1), círculo naranja, péptido deformilasa (XP\_100291531). Círculo dorado, factor de transcripción MYB51-like (XP\_10037835.1), círculo negro, defosfo-CoA-cinasa (XP\_10038187.1). Círculo azul marino,  $\beta$ -endo-1,4-manosidasa 6 (XP\_10043507.1). Líneas amarillas representan la relación text mining; líneas púrpuras, relación determinada experimentalmente y líneas negras representan una co-expresión directa entre proteínas.

El análisis de co-expresión de *PgGa1* (Figura 25), muestra una asociación con enzimas relacionadas a la elongación de la pared celular durante la maduración y con otras que están relacionadas indirectamente con este proceso. Dentro de las que están relacionadas a la modificación de la pared celular, se tiene la co-expresión con las enzimas XET/H que inducen la hidrólisis o la adición de cadenas de xiloglucanos a la pared celular, dándole extensibilidad a la célula, este proceso es

necesario para la maduración del fruto (Miedes et al., 2011). Por el lado de las que están relacionadas indirectamente con la maduración, PgGa1 se co-expresa con las proteínas DOMON domain b561, que catalizan el transporte transmembranal de electrones y la regeneración de ascorbato (Ifigenia, 2012). Esto podría relacionarse con el alto contenido de vitamina C que contiene el fruto de guayaba (Padilla et al., 2014). Otra co-expresión se da con los factores de transcripción WRKY y RAP2 han sido observados trabajando en conjunto en procesos de señalización celular y respuesta a estrés biótico y abiótico en el fruto de guayaba (Chen et al., 2017; Phukan et al., 2016). Por último, la co-expresión con la ligasa de ARNt mitocondrial, específicamente la que transporta metionina, se ha observado que se expresa en altos niveles durante la maduración del fruto de palma (*Phoenix dactylifera*) y del tomate (Marondedze et al., 2014). La metionina es el principal precursor del etileno y un componente principal en la maduración de frutos climatéricos (Liu et al., 2015).

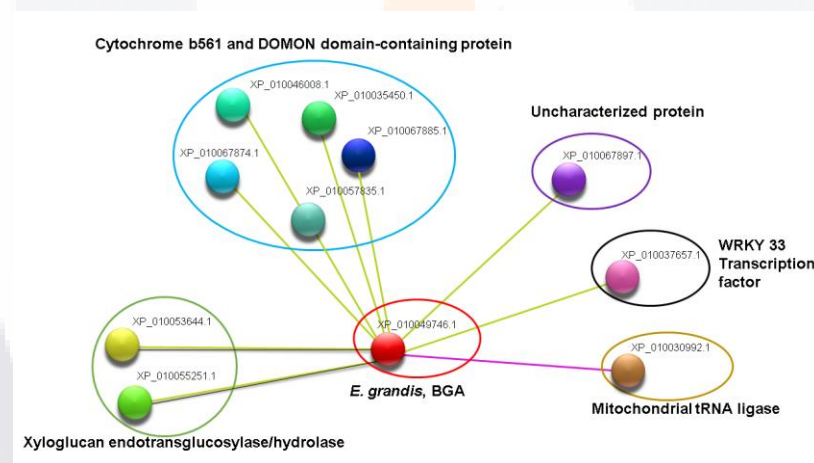


Figura 25. Análisis de co-expresión de la  $\beta$ -galactosidasa 1 de *E. grandis* similar a *PgGa1*. Círculo azul, proteínas DOMON domain b561 (XP\_10046008.1), b561.2 (XP\_10035450.1), b561.3 (XP\_10067885.1), b561.4 (XP\_10067874.1) y b561.5 (XP\_10057835.1). Círculo púrpura, proteína no caracterizada (XP\_10067897.1). Círculo negro, factor de transcripción WRKY 33 (XP\_10037657.1). Círculo dorado, ligasa de ARNt mitocondrial (XP\_10030992.1). Círculo verde, XET/H1 (XP\_10053644.1) y XET/H2 (XP\_10055251.1). Líneas amarillas representan relaciones basadas en text mining, líneas púrpuras, relaciones determinadas experimentalmente y líneas negras, muestran una co-expresión directa entre proteínas.

Los análisis de co-expresión de la proteína putativa PgGly1 (Figura 26) muestran que actúa en conjunto principalmente con proteínas ceramidas-like neutrales, que hidrolizan los enlaces N-acil entre ceramidas, regulando el balance entre residuos libres de ceramidas y esfingosinas necesarias para las respuestas de estreses bióticos y abióticos (Tani et al., 2003). También se co-expresiona con esfingolípido desaturasas y esfingolípido cinasas, que ayudan a la síntesis de compuestos volátiles mediante el ciclo de los alcoholes grasos (Figura 27) (Fredj et al., 2018; Rizzo, 2015). Por último, la co-expresión con las  $\beta$ -galactosidasas, modifican las cadenas de pectina de la pared celular (Huijuan et al., 2018). Estos perfiles de co-expresión podrían indicar una estrecha relación entre la funcionalidad de *PgGly1* con la regulación de ceramidas, esfingosinas y glucosa en la célula y la modificación de la pared celular.

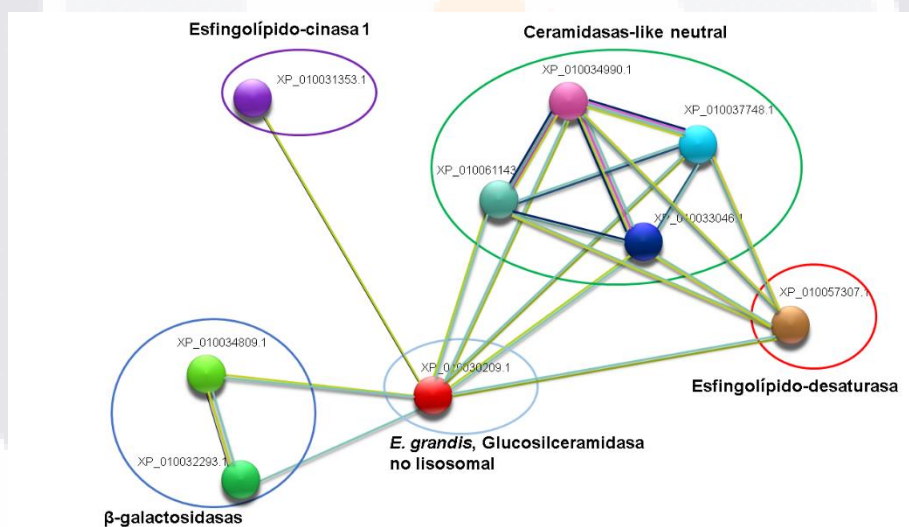


Figura 26. Análisis de co-expresión de la glucosilceramidasa no lisosomal de *E. grandis* similar a *PgGly1*. Círculo azul marino,  $\beta$ -galactosidasas (XP\_10034809.1, XP\_10032293.1). Círculo púrpura, esfingolípido-cinasa 1 (XP\_10031353.1). Círculo verde, ceramidas-like neutral (XP\_10034990.1, XP\_10037748.1, XP\_10061143.1, XP\_10033046.1). Círculo rojo, esfingolípido desaturasa, (XP\_10057307.1). Líneas amarillas representan relaciones basadas en text mining, líneas azules, relaciones bioinformáticas, líneas púrpuras, relaciones determinadas experimentalmente y líneas negras, muestran una co-expresión directa entre proteínas.

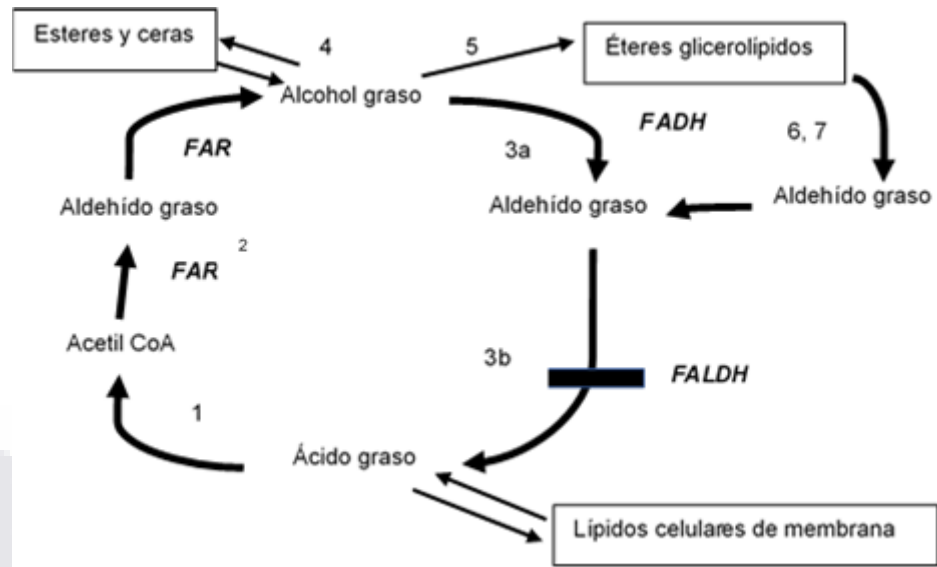


Figura 27. Ciclo de los alcoholes grasos. Las enzimas de cada reacción están marcadas con un número: 1, acil-CoA sintetasa; 2, acil-CoA grasa reductasa (FAR); 3a, alcohol graso deshidrogenasa (FADH); 3b, aldehído graso deshidrogenasa (FALDH); 4, cera sintetasa; 5, alquilo-DHAP-sintetasa; 6, alquilo glicerol monooxigenasa; 7, lisoplasmogénasa.

### 7.8 Análisis de expresión qRT-PCR de genes de interés

El análisis de qRT-PCR de *PgE17* (Figura 28 verde) muestra una expresión del gen en todos los tejidos siendo el mayor en estadio rayado. Los altos niveles de expresión en este estadio son debido a que es durante esta etapa donde el ritmo de crecimiento y desarrollo del fruto es mayor, y es necesaria la ruptura de grandes cantidades de enlaces  $\beta$ -1,4 de hemicelulosa, en donde las enzimas  $\beta$ -1,4-endoglucanasas se involucran (Levy et al., 2002). Resultados similares fueron descritos por Jara et al. (2019), quienes encontraron altos niveles de expresión de  $\beta$ -1,4-endoglucanasas en fresa y tomate en el estadio rayado. Por otra parte, la expresión de *PgE17* en los estadios maduro y sobre maduro fueron entre 15 y 20 veces menores. Esta baja expresión se debe a la acumulación de  $\beta$ -1,4-endoglucanasa durante los estadios anteriores, lo que provoca el agotamiento su propio sustrato (hemicelulosa con enlaces  $\beta$ -1,4) (Levy et al., 2002; Mercado et al., 2010). Estos resultados fueron similares a los encontrados por Mercado et al. (2010)

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

y Jara et al. (2019), quienes al medir los niveles de expresión y actividad enzimática de la  $\beta$ -1,4-endoglucanasa en los frutos de tomate y fresa durante los estadios de rayado, maduro y sobre maduro, observaron que los mayores niveles de expresión y actividad de  $\beta$ -1,4-endoglucanasa eran en estadio rayado y por el contrario los menores en el periodo maduro. La expresión en raíz fue cerca de 45 veces menos que en el estadio rayado, lo que concuerda con Buchanan et al. (2012), quien demostró en sorgo (*Sorghum bicolor*), maíz (*Zea mays*), arroz, (*Oryza sativa*) y algunas especies de pasto (*Brachypodium sp.*), que los niveles de expresión de  $\beta$ -1,4-endoglucanasa en este tejido, depende de la especie y del tipo de raíz, además de que la raíz no necesita de grandes modificaciones a la pared celular. La expresión de *PgE17* en tallo y hojas fue aproximadamente entre 40 y 45 veces más alta que en fruto verde (tejido de referencia). Estos resultados podrían deberse al constante y acelerado ritmo de crecimiento y desarrollo del tallo y hoja, ya que las enzimas  $\beta$ -1,4-endoglucanasa participan en el rearrreglo de estas estructuras (Levy et al., 2002; Mercado et al., 2010; Jara et al., 2019).

Los resultados del análisis qRT-PCR para *PgGa1* (Figura 28 azul) muestran expresión del gen en todos los tejidos, con los mayores niveles de expresión en los estadios rayado y maduro, con valores 55 y 45 veces más que en el estadio verde. Esto debido al ablandamiento característico en estos periodos de maduración, el cual requiere de la desramificación de cadenas de pectinas que dan soporte y firmeza a la pared celular (Cosgrove, 2016). Feng et al. (2021), menciona y clasifica a las  $\beta$ -galactosidasas como una enzima clave para la degradación de la pared celular y argumentan que un gran número de los genes de la familia de las  $\beta$ -galactosidasas incrementan sus niveles de expresión durante los estadios de rayado y maduro. Por otro lado, se ha observado que la actividad enzimática de las  $\beta$ -galactosidasas durante estos estadios genera una liberación constante de residuos de hemicelulosa (Franková y Fry, 2013; Salazar y Gamboa, 2013) lo que se relaciona con la alta expresión de *PgE17* observada en el estadio rayado. Esta teoría es confirmada por Zainon et al. (1995), quienes midieron la actividad de las  $\beta$ -galactosidasas y las  $\beta$ -1,4-endoglucanasas en el fruto del mango, así como la cantidad de sustrato disponible para ambas enzimas (*Mangifera indica* cv.

Harumanis), comprobando que en los estadios rayado y maduro el decremento de cadenas de pectinas era causado por enzimas  $\beta$ -galactosidasas, lo que resultaba en la liberación de cadenas de hemicelulosa, que a su vez eran hidrolizadas mediante la actividad de las  $\beta$ -1,4-endoglucanasas. Por otra parte, la expresión en estadio sobremaduro fue 50 veces menor que la de maduro. Esto es probablemente por la falta de sustrato de la enzima durante este estadio (Salazar y Gamboa, 2013), quedando como la más baja de los estadios de maduración y la segunda más baja de todas las muestras, solamente 2 o 3 veces más arriba que la observada en raíz. La falta de cadenas de pectina durante el último estadio de maduración se debe a la acción de otras enzimas como las pectinaesterasas (Cosgrove, 2016) y poligalacturonasas (Salazar y Gamboa, 2013), que actúan en respuesta a la liberación masiva de residuos de pectina causada por las  $\beta$ -1,4-endoglucanasas. Estos resultados en conjunto indican que la elevada expresión de las  $\beta$ -1,4-endoglucanasas juegan un rol importante en la degradación de la pared celular, proceso que se ha establecido como un contribuyente esencial en el ablandamiento del fruto durante la maduración (Feng et al., 2021). Los niveles de expresión en hoja y tallo fueron entre 20 y 30 veces más bajos que en fruto, pero más altos que en raíz, tejido en el cual la expresión fue nula. Estos resultados sugieren que la pared celular de estos tejidos no necesita modificaciones importantes. Hallazgos similares fueron reportados en manzana (*M. domestica*) (Yang et al., 2018).

En el análisis de expresión qRT-PCR de *PgGly1* (Figura 28 amarillo) se observó expresión en todos los tejidos, siendo la hoja el órgano con los niveles más altos. Esto debido a que las glucosilceramidas son de los esfingolípidos más abundantes en las membranas de las células en las hojas y tallo debido al constante y acelerado ritmo de crecimiento de estos tejidos (Chen et al., 2008). Resultados que muestran niveles de expresión similares de glucosilceramidasa fueron encontrados por Chen et al. (2006), en hojas de *A. thaliana*. Además, Peer et al. (2010) menciona que en las hojas y tallo de *A. thaliana* existe una gran cantidad de residuos de esfingolípidos y esfingosina, ya que estos funcionan como un mecanismo de defensa en contra de ataques bacterianos.



La expresión de *PgGly1* durante los estadios de maduración del fruto fue mayor en rayado y sobre maduro. Estos resultados son similares a los reportados por Corbacho et al. (2018) y Parra-Lobato et al. (2017), quienes reportaron que la actividad de enzimas modificadoras de esfingolípidos (glucosilceramidasa no lisosomal incluida) se incrementa durante dichos estadios en el fruto del olivo. Esto, para incrementar la producción de cadenas base largas de lípidos (LBC), que serán posteriormente usadas para la síntesis de esfingolípidos para nuevas membranas celulares. Por otra parte, Corbacho et al. (2018), demostró, que durante el estadio sobre maduro del fruto de oliva es cuando la concentración de esfingolípidos es mayor y por tanto la actividad de enzimas glucosilceramidasa no lisosomales también. Esta acumulación de esfingolípidos causa en frutos climatéricos un incremento en las cantidades de cadenas largas de lípidos polares (LCPL), que generan compuestos volátiles, modificando el olor y sabor de los frutos durante el proceso de maduración, sobre todo en los últimos estadios (Klee, 2010; Zhu et al., 2018). La síntesis de estos compuestos volátiles es producida por el incremento de residuos libres de ceramida (debido a la actividad de glucosilceramidasa no lisosomales), cuya degradación produce esfingosina-1-fosfato (S1P). Posteriormente, esta molécula es transformada a hexadecenal; un modificador del olor y sabor en frutas (Rizzo, 2015). La baja expresión de *PgGly1* durante el estadio maduro es posiblemente debida a la necesidad de biosíntesis de esfingolípidos necesarios para la formación de membranas vacuolares y externas de las nuevas células (Chen et al., 2009; Corbacho et al., 2018). Estos resultados podrían indicar que se requieren niveles bajos de esfingolípidos durante el proceso de maduración y por lo tanto la actividad de las glucosilceramidasa no lisosomales es clave para que esto suceda. Esto se refuerza con los resultados de Chen et al. (2008), quien mostró en mutantes de *A. thaliana* (*sbh1* y *sbh2*), deficientes en cadenas largas de lípidos trihidroxiladas (debido a la inhibición de actividad de glucosilceramidasa no lisosomales), mostraron problemas relacionados a la elongación celular, así como déficits en el crecimiento y desarrollo de tejidos.

La constante expresión de *PgGly1* en todas las muestras de tejidos, incluidos los estadios de maduración, sugiere que la degradación de esfingolípidos juega un rol

importante en el proceso de desarrollo de la planta y del fruto. Así como en la biosíntesis e incremento de compuestos volátiles, que modifican y aumentan los olores y sabores característicos de la fruta madura.

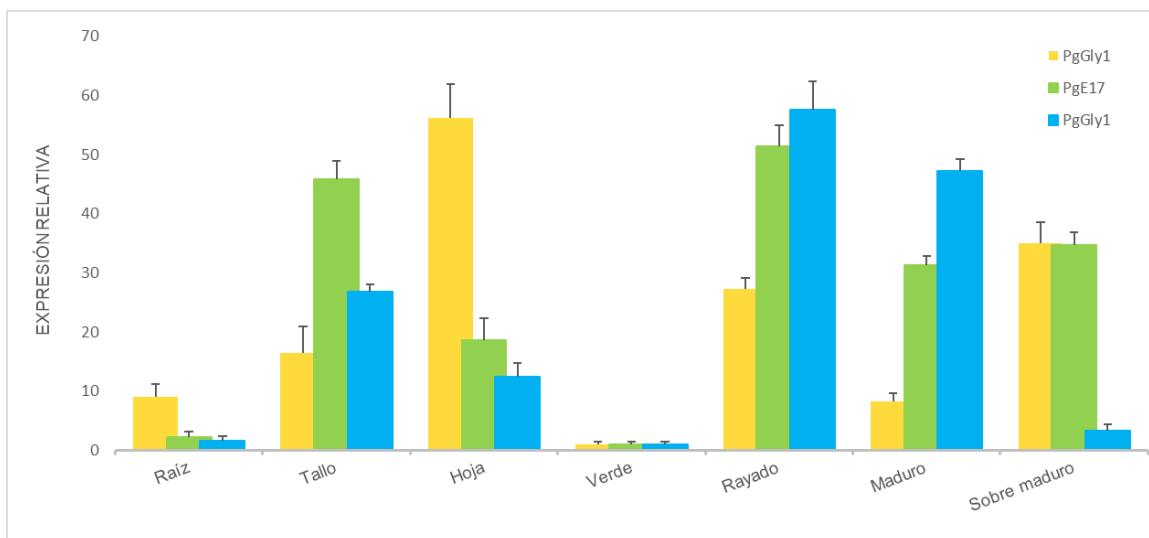


Figura 28. Análisis de expresión qRT-PCR de *PgE17* (verde), *PgGa1* (azul) y *PgGly1* (amarillo). Los niveles de expresión fueron medidos en los tejidos de raíz, hoja y tallo. Además de 4 estadios de maduración (verde, rayado, maduro y sobre maduro). El estadio verde fue usado como referencia para la expresión relativa.

### 7.9 Modelado 3D de PgGly1

Con la secuencia putativa de 179 residuos de aminoácidos de PgGly1, se realizó un modelado hipotético y se comparó con el modelo de la GB2TX (5BVU) perteneciente a una glucosilceramidasa no lisosomal de *Thermoanaerobacterium xylolyticum* (único modelo disponible de una glucosilceramidasa no lisosomal actualmente) obteniendo un 42.5 % de similitud (Figura 29). El modelo hipotético de PgGly1 está conformado de 3 estructuras alfa-hélice, unidas por dos estructuras de hoja beta-plegada (Figura 27A). En la parte del C-terminal, presenta una configuración de hojas  $\beta$  en forma de sándwich con  $\alpha$ -hélices alrededor característica de las glucosilceramidasa no lisosomales (Charoenwattanasatien et al., 2016) (Figura 29B). La parte desde el residuo de ácido glutámico 727 a la valina terminal 801,

pasando el sitio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  y el sitio catalítico ácido/base en el residuo de ácido aspártico D593 característicos también de las glucosilceramidasa no lisosomales, es homóloga a GB2TX (Fredj et al., 2018) (Figura 29C).

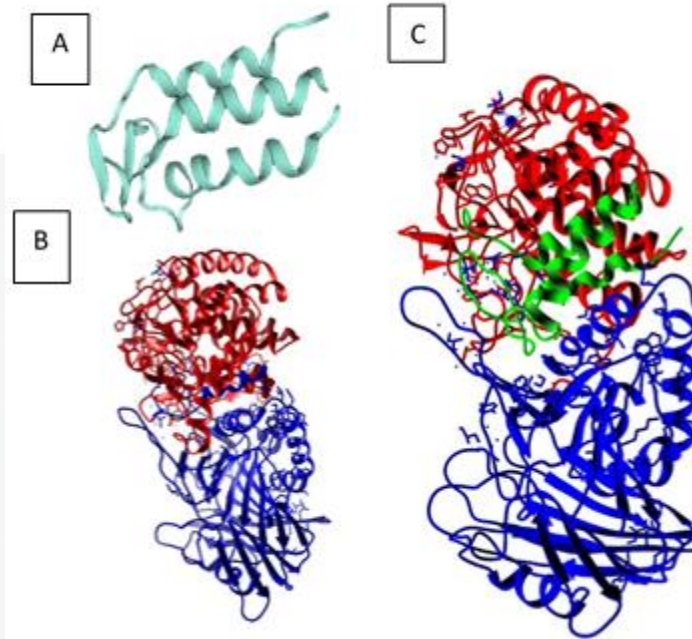


Figura 29. Modelado 3D hipotético de PgGly1. A) Modelado 3D de la secuencia proteica putativa de PgGly1. B) Modelado 3D de la proteína GB2TX perteneciente a *Thermoanaerobacterium xylolyticum* (5BVU), la región en rojo corresponde al dominio catalítico C-Terminal (DUF608) y en azul el dominio N-terminal. C) Empalme de PgGly1 (verde), con GB2TX (azul y rojo).

## 7.10 Construcción de librerías de miRNAs

### 7.10.1 Cuantificación de ARN para librerías

Se realizaron dos mezclas independientes de las muestras de ARN total, una para el estadio rayado y otra para el maduro y a partir de ellas se formaron 3 réplicas para cada estadio de aproximadamente 12 mg/ $\mu\text{L}$  de concentración final cada una

(Tabla 11), posteriormente se cargaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante para separar los distintos tipos de ARN y se realizó una electroforesis.

**Tabla 11. Concentraciones de las muestras de ARN total de las cuales se aislaron los miRNA.**

Muestra	Rayadas R1, R2 y R3		Muestra	Maduras M1, M2 y M3	
R1	3.27 mg	12.7 mg	M1	5.26 mg	11.75 mg
	3.88 mg			2.21 mg	
	3.68 mg			3.21 mg	
	1.84 mg			3.28 mg	
R2	2.62 mg	13.04 mg	M2	6.44 mg	13.1 mg
	3.39 mg			4.17 mg	
	2.92 mg			2.49 mg	
	2.24 mg		M3	7.83 mg	12.51 mg
R3	5.07 mg	11.7 mg		6.36 mg	
	1.87 mg		4.68 mg		
	2.32 mg				
	2.3 mg				
	4.13 mg				

### 7.10.2 Aislamiento de miRNAs

Al terminar la electroforesis, se cortó el gel con ayuda del fotodocumentador, utilizando dos oligonucleótidos de 20 y 27 pb como marcador de peso molecular (Figura 30). Los miRNA no son visibles en el gel debido a su diminuto tamaño y baja concentración.

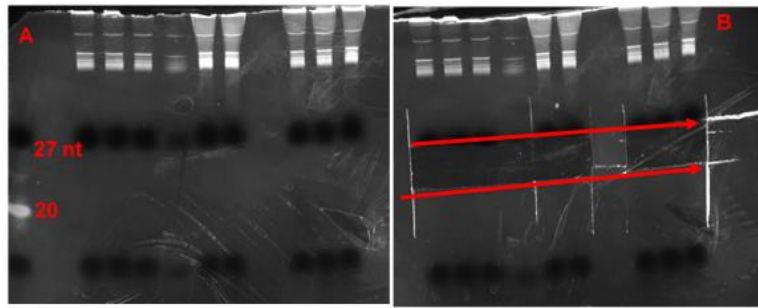


Figura 30. Aislamiento de miRNA a partir de gel de poliacrilamida. A) Gel de poliacrilamida al 15 % desnaturante con las muestras de ARN total (12 mg/μL), los primeros 6 pozos corresponden al fruto rayado, mientras que los últimos 3 al fruto maduro. B) Las líneas rojas muestran el corte en el gel.

### 7.10.3 Electroforesis y aislamiento del producto de RT-PCR de las librerías

Para verificar la correcta amplificación de los productos de RT-PCR obtenidos, se llevó a cabo una electroforesis, en donde se realizó un corte en el gel para aislar las construcciones de miRNAs, tomando en cuenta que la longitud exacta de una librería es de entre 160 y 165 pb (Figura 31).

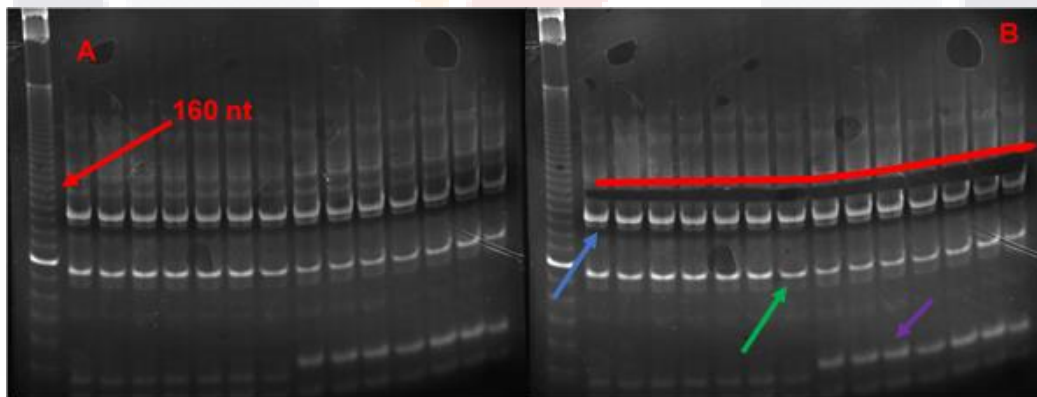


Figura 31. Electroforesis de RT-PCR de librerías de miRNA. A) Gel sin cortar, la flecha roja: banda de 160 nt correspondiente a una librería de miRNA correcta. B) Línea roja: corte para el aislamiento de las librerías, línea azul: producto vacío de adaptadores sin miRNA, línea verde: producto vacío de adaptador 3' y oligonucleótido BRIDGE sin miRNA, línea morada: dímeros de primers.

#### 7.10.4 Digestión de las librerías con *EcoR1*

Se realizó una digestión de las librerías obtenidas con la enzima *EcoR1* (Figura 32), con la finalidad de separar los adaptadores Illumina 5' y 3' (30 pb en conjunto), obtener un producto de 130 -135 pb y comprobar que exista una secuencia de miRNA insertada en la construcción.

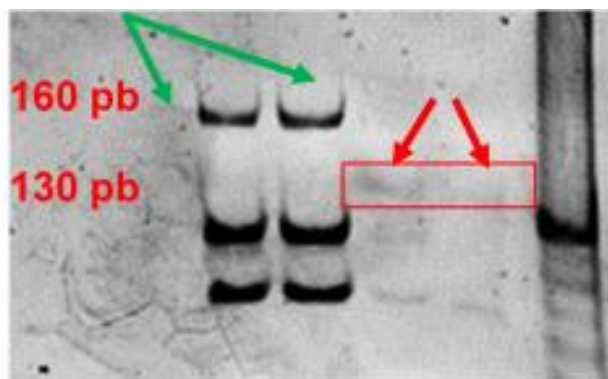
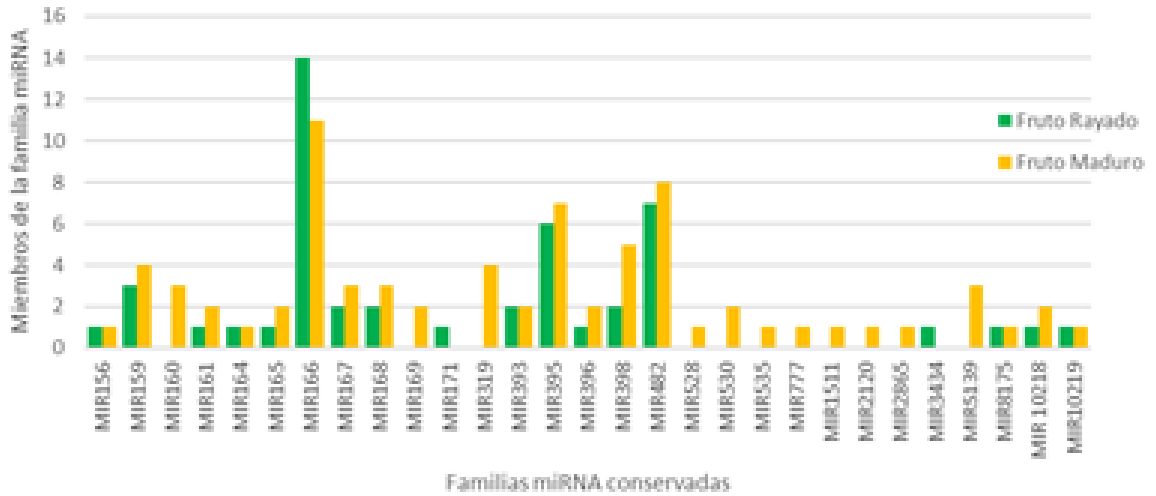


Figura 32. Digestión de las librerías de miRNA. La flecha roja indica el producto digerido de la construcción, (sin adaptadores) con un peso aproximado de 130 pb. La línea verde muestra las construcciones completas sin digerir como controles, con un peso aproximado de 160 pb. La diferencia con el producto digerido es de los 30 pares de base esperados.

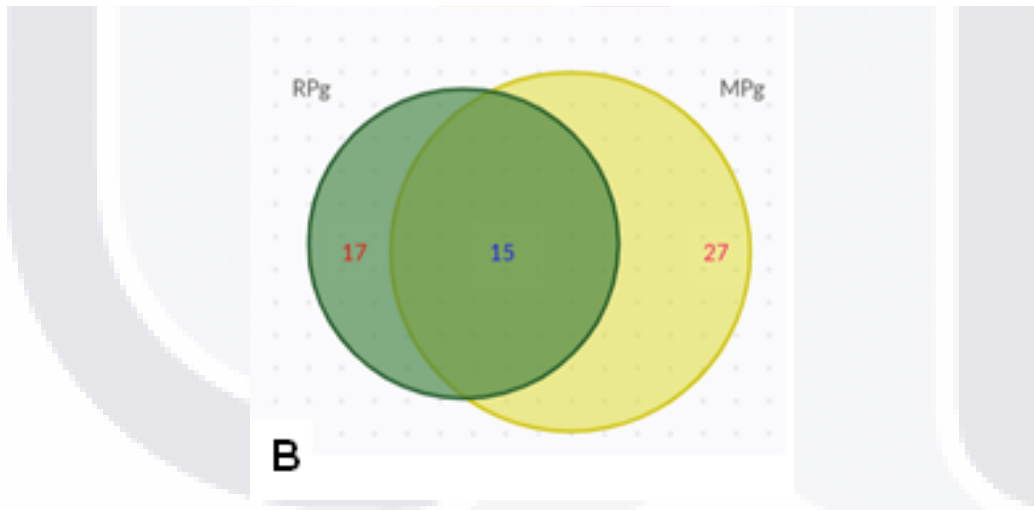
#### 7.10.5 Identificación, distribución y tamaño de miRNAs encontrados en guayaba

La secuenciación de las librerías arrojó un total de 16,729,248 secuencias, a las cuales se les removió el adaptador y fueron filtradas para obtener aquellas de entre 18 y 22 pb, disminuyendo su número a 244,277. Estas secuencias fueron mapeadas contra el genoma de guayaba y la base de datos de la página web miRBase (ver. 22) lo que reveló similitud con 3909 secuencias, de las cuales solamente se tomaron en cuenta los miRNA maduros, resultando en 77 secuencias. Posteriormente se identificaron 29 familias de miRNAs (Figura 33) de las cuales la MIR166 fue la que expresó un mayor número de miembros con 14 en rayado y 9 en maduro. Esta familia consta de 26 miembros y se le atribuyen funciones relacionadas al desarrollo de los meristemos apicales en tallo (SAM) (Li X et al., 2017). Su expresión es la

respuesta principal a estreses salinos y ajustes de crecimiento (Kitazumi et al., 2015). La familia MIR482 fue la segunda con más miembros expresados, con 8 en maduro y 7 en rayado, seguida de la MIR 395 con 7 en maduro y 6 en rayado.



A



B

Figura 33. Distribución de los miRNAs de guayaba. A) Miembros de familias de miRNA expresados en estadio rayado (amarillo) y estadio verde (verde). B) Diagrama de venn, de la distribución de las familias de miRNAs encontrados en estadio rayado (RPg) y maduro (MPg).

El tamaño de los miRNAs encontrados varía entre 18 y 25 nt, siendo el de 21 nt (84 secuencias) el más abundante, seguido de 22 nt (24 secuencias), 20 nt (12

secuencias), del resto se encontró una secuencia de 25 nt, una de 23 nt, una de 19 nt y una de 18 nt (Figura 34), estos tamaños son validados por la mayoría de los trabajos relacionados a miRNAs en plantas (Zhang et al., 2009; Ferdous et al., 2015; Carthew et al., 2009; Axtell y Bartel, 2005).

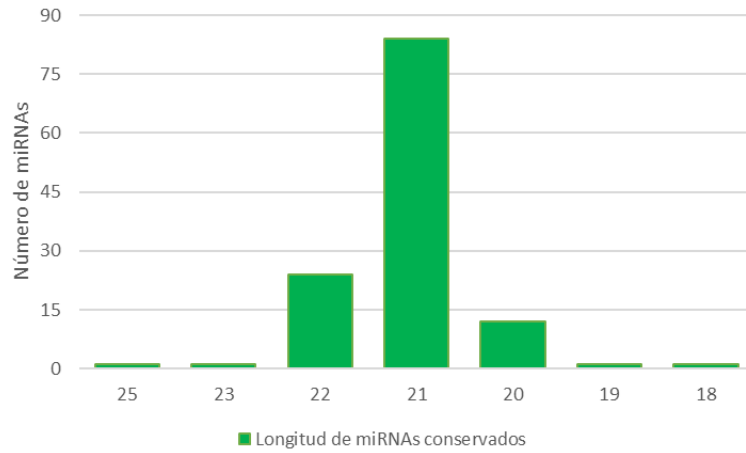
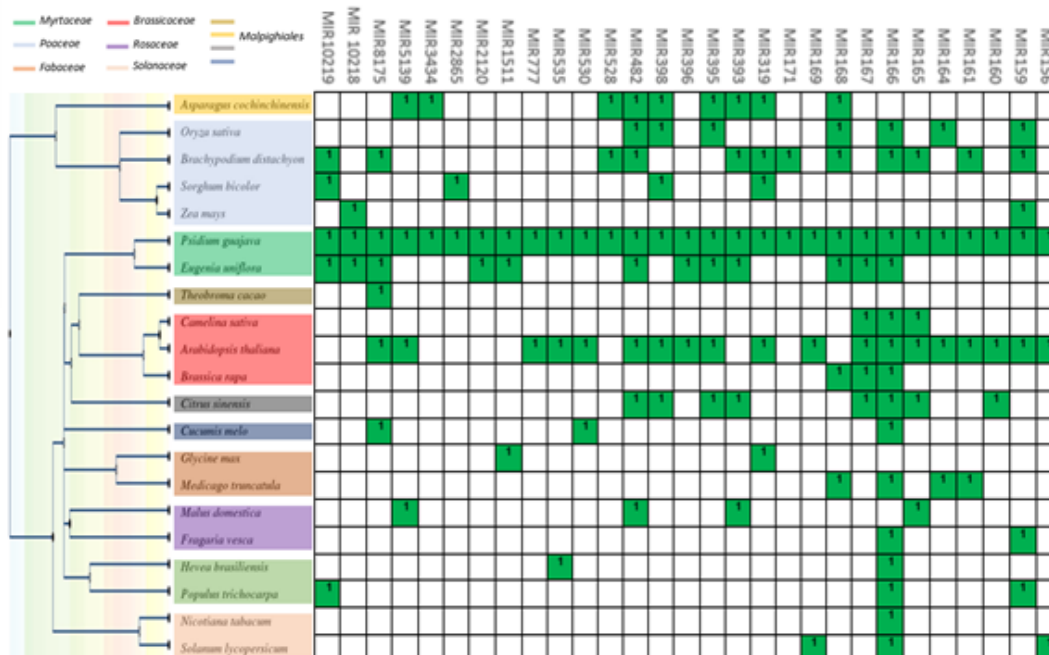


Figura 34. Distribución de los tamaños de miRNAs encontrados en guayaba.

### 7.10.6 Análisis filogenético de los miRNAs de guayaba

El análisis filogenético (Figura 35), reveló que los miRNAs se encuentran altamente conservados en el género de las *Magnoliopsidas*. Además que la familia MIR166 es





la más conservada entre especies, con 14 diferentes plantas, como *A. thaliana*, *Nicotiana tabacum* y *O. sativa*, entre otras (Ding et al., 2018; Jung y Park, 2007; Li F et al., 2015). Las familias MIR168 y MIR482 son las siguientes más conservadas con 7 y 6 organismos en común, respectivamente. También se encontró que la familia *Brassicaceae* obtuvo el mayor número de miRNAs conservados con un total de 20 familias (69 %) donde *A. thaliana* fue el miembro que más conservación presentó. Además, 12 familias de miRNA (41.4 %) están conservadas en las *Myrtaceae*. En las *Poaceae* se encontraron 16 familias conservadas (55 %). Por último, las *Rutaceae* y las *Asparagaceae* (orden *Malpighiales*) se encontraron 8 y 9 familias (31 y 32 %) respectivamente. Curiosamente, solamente 8 familias de miRNAs (20.7 %), (MIR165, MIR166, MIR393, MIR482, MIR8175 y MIR5139), están conservadas en plantas que producen frutos de tipo climatérico (*M. domestica*, *Cucumis melo* y *S. lycopersicum*), estas familias también han sido encontradas en estudios previos de miRNAs expresados en frutos climatéricos durante su maduración (Ma et al., 2020; Bai et al., 2020; Kitazumi et al., 2015).

Figura 35. Relación filogenética de los miRNA encontrados en guayaba con otras plantas. En el panel izquierdo se muestra un dendrograma de 20 especies de plantas de 11 diferentes familias que contienen miRNAs encontrados en guayaba. En el panel derecho se muestra un cuadro de los miRNAs encontrados en cada planta marcados en verde y con un número 1. En la parte de arriba se muestra la familia de miRNA.

#### 7.10.7 Identificación de miRNAs expresados en estadio maduro y rayado

En fruto maduro se encontraron 27 de las 29 familias (Figura 36), entre las que destacan: MIR160, 169, 319, 528, 530, 535, 777, 1511, 2120, 2865 y 5139 por haberse expresado únicamente durante este estadio. La familia MIR 160 regulariza la expresión de factores de respuesta a auxinas (ARFs) los cuales son esenciales para el desarrollo y crecimiento de frutos climatéricos (Yang et al., 2019), esto ha sido confirmado por Hendelman et al. (2012) quienes al inhibir la expresión del miRNA 160 en tomate, provocaron la acumulación del ARF10 (enzima producida mayormente en el pericarpio del fruto durante el estadio maduro) causando la malformación de frutos y mal desarrollo de hojas y raíces. Además, existe evidencia

de que los ARFs regulan de manera directa la expresión de los factores de respuesta a etileno (Trainotti et al., 2007), afectando de manera directa al proceso de maduración. El miRNA 169 se expresa en presencia de altas concentraciones de sal y tiene como objetivo a los factores de transcripción NF-Y (Zhao et al., 2009). En estudios recientes se ha demostrado que la inhibición de factores de transcripción NF-YA y NF-YB aumenta el tiempo de maduración y genera déficit en la coloración del fruto del tomate durante el estadio maduro (Li S et al., 2016). La familia MIR319 regula a los miembros de la familia de factores de transcripción EOSINTEBRANCHED1/CYCLOIDEA/PROLIFERATING CELL FACT (TCP), los cuales juegan un importante rol en el desarrollo y crecimiento de las plantas (Fang et al., 2020). En específico el factor TCP9 ha demostrado tener relación con la firmeza del fruto, producción de antocianinas y ácido abscísico (ABA), en etapas tempranas de la maduración en fresa, en donde también se observó la regulación de manera natural de este gen durante el estadio maduro por el miRNA319 (Xie et al., 2019). El miRNA 528 regula los genes de polifenol oxidasa (PPO), los cuales se han observado inhiben especies reactivas de oxígeno (ROS) que producen oscurecimiento en la cáscara de frutos como la banana (*Musa acuminata*) (Ma et al., 2020), se sabe que la guayaba es rica en polifenoles (Camarena-Tello et al., 2018; Padilla et al., 2014). Existe evidencia de que la familia MIR 530 es altamente expresada durante el estadio maduro de frutos como el plátano y el melón (*C. melo*) (Bi et al., 2015; Bai et al., 2020). Expresión del miRNA 535 ha sido encontrada en el mesocarpio de la piña (*Ananas comosus*) durante el estadio maduro (Yusuf y Kumar, 2011; Yusuf et al., 2015) y su función ha sido relacionada con la producción de ácido ascórbico en nopal (*Opuntia robusta*) (Cedillo-Jiménez et al., 2020), metabolito encontrado en altas cantidades en el fruto de la guayaba (Padilla et al., 2014). Además de regular la expresión de la serina/treonina cinasa HT1, enzima descrita como un inhibidor para la síntesis de etileno en manzana, (Wu et al., 2016; Onik et al., 2018). Antecedentes del miRNA 777 solo han sido encontrados en *A. thaliana* (Rajagopalan et al., 2006), ni el gen objetivo o su función han sido descritos, los resultados en este estudio indican que podría tener una relación directa con el proceso de maduración. Bajos niveles de expresión del miRNA 1511 se han

encontrado en frutos de palma y banana durante el estadio maduro (Bi et al., 2015; Xin et al., 2015), sin embargo, poco se sabe de su acción. Xu et al. (2018) al inducir factores de oscurecimiento en el fruto de lufa (*Luffa cylindrica*), encontraron que el miRNA 1511 se expresaba levemente, sin embargo, fue catalogado como una familia no conservada en ese fruto. La familia MIR 2120 había sido descrita en *O. sativa* como elicitador fúngico (Baldrich et al., 2015). Sin embargo, otros estudios (Huang et al., 2009) muestran su expresión en respuesta a la acumulación de cadmio ( $Cd^{2+}$ ) y zinc ( $Zn^{2+}$ ) en plantas. De ser cierto esto es probable que su gen objetivo pertenezca a la familia de proteínas inducidas por ABA, maduración y estrés (ASRs), pues se ha observado que la exposición al cadmio y zinc induce la producción de estas enzimas que a su vez son reguladas por miRNA (Zhang et al., 2019). Anteriormente se ha descrito que estos residuos metálicos disminuyen la producción de hoja y fruto en plantas de tomate (Hédiji et al., 2015). MIR 2865 es una nueva familia de miRNAs descubierta en arroz y clasificada como elemento regulador en el aborto de gametofitos femeninos (Yang et al., 2017). Su precursor se encuentra en el cromosoma 8 del genoma del arroz y forma el complejo efector con la proteína AGO1 (Wu et al., 2009). Por último, la familia MIR 5139 únicamente ha sido mencionada por Harkess et al. (2017) en el genoma del espárrago (*Asparagus officinalis*), su función o gen objetivo no han sido descritos.

En fruto rayado se encontraron 17 familias (Figura 34), de las cuales MIR171 y MIR3434 fueron exclusivas para este estadio. La familia MIR171 ha sido encontrada anteriormente durante los estadios tempranos de maduración de la fresa y baya de goji (*Lycium barbarum*), (Zeng et al., 2015) y se expresa en presencia de grandes concentraciones de  $CO_2$  (Wang et al., 2020). El miRNA171 tiene como objetivo a los factores de transcripción GRAS (GIBBERELLIN-INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR OF GA1-3 (RGA) AND SCARECROW (SCR)) las cuales tienen múltiples funciones en el desarrollo de raíz, tallo y señalización o represión del ácido giberélico (Hirsch y Oldroyd, 2009). Sin embargo, recientemente también se han descrito como factores de regulación de la maduración involucrados en la biosíntesis del etileno en fresa y tomate, en específico el factor GRAS4 donde su sobreexpresión acelera la maduración (Liu et al., 2021; Chen et al., 2019). El miRNA

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

3434 es el único miembro de la familia MIR3434 y anteriormente solo ha sido encontrado en *A. lyrata*, su función y gen objetivo no han sido descritos (Fahlgren et al., 2010).

La aparición de más familias de miRNAs en estadio maduro podría indicar, que durante este periodo el fruto requiere de una regulación más amplia de su metabolismo, esto es confirmado por Xin et al. (2015), quienes demostraron en fruto de palma que es en estadio maduro donde se da la mayor expresión de miRNAs durante toda la maduración, con un total de 188 miRNAs de 238 familias encontradas.

Las familias con mayor número de miembros expresados en ambos estadios fueron las MIR159, MIR166, MIR395, MIR 398 y MIR 482 (Figura 34). La familia MIR159 es una familia altamente conservada entre plantas, de la que se sabe que su único gen objetivo son los factores de transcripción GAMYB (Millar et al., 2019). Dentro de la familia de genes GAMYB encontramos a MYB33 y MYB101, involucrados en procesos de señalización por acumulación de ABA (Reyes y Chua, 2007), el cual es un metabolito esencial durante la maduración de frutos como la uva (*V. vinifera*) (Sun et al., 2010; Guo et al., 2018), esto indicaría que la regulación de señalización ABA mediante los factores MYB podría interferir con el proceso de maduración. Además, encontramos a los factores MYB65-like los cuales tienen un rol importante en la maduración de los frutos, ya que actúan como transportadores de calosa a la pared celular, modificando la firmeza del fruto (Bondada et al., 2014). Evidencia del incremento de calosa, en floema y pared celular durante la maduración ha sido previamente descrito en uva (Bondada et al., 2017). La familia MIR 166 es una de las más conservadas en plantas, sus funciones son la modulación de múltiples factores de desarrollo anteriormente descritos. Esta familia ha sido encontrada durante todos los estadios de maduración de frutos como la baya goji y la banana (Bi et al., 2015; Zeng et al., 2015). Sin embargo, su rol dentro de la maduración se podría dividir en dos funciones: la primera es su afinidad por las proteínas homeodomain-Leu-Zipper III (HD-ZipIII), cuya función es la de controlar y dar mantenimiento al crecimiento apical de los meristemos, así como el nacimiento de órganos laterales, mediante el control del flujo de auxinas en la planta (Elhiti y

Stasolla, 2009). La regulación negativa de estas proteínas mediante el miRNA166 afectaría el flujo y señalización de auxinas, el cual previamente ha sido descrito como parte esencial en el desarrollo y crecimiento de frutos climatéricos (Trainotti et al., 2007; Yang et al., 2019). La segunda fue descrita por Carbone et al. (2019) en el fruto del olivo, quien menciona que se involucra en el desembalaje y modificación de la pared celular, mediante la inhibición de genes objetivo relacionados a la biosíntesis de residuos de glucoesfingolípidos y galactosa. Se sabe que estos residuos son factores principales en la estructura de la pared celular, y que su modificación o degradación es parte esencial del proceso de ablandamiento, característico de frutos climatéricos (Corbacho et al., 2018; Parra-Lobato et al., 2017; Zhang et al., 2019; Cosgrove, 2016). La familia MIR 395 está altamente conservada en plantas y han sido caracterizados sus 24 miembros en arroz (Guddeti et al., 2005), tiene como gen objetivo las ATP-sulfurilasas y se expresa frente a estrés de grandes cantidades de sulfatos (Gharat y Shaw, 2016), es un componente principal en la red de regulación y asimilación de sulfatos en plantas (Matthewman et al., 2012). La alta expresión del miRNA395 provocaría la inhibición de enzimas reguladoras de azufre, lo que incrementaría su concentración. De ser cierto esto, el azufre en exceso sería utilizado para la biosíntesis de cisteína y metionina, precursores principales del etileno (Binder, 2020), hormona principal durante la maduración de frutos climatéricos como la guayaba y que se presenta en mayor cantidad durante los estadios de rayado y maduro (Trainotti et al., 2007), así como también para asegurar el buen desarrollo del fruto evitando irregularidades osmóticas por exceso o falta de clorofila y pigmentación por déficit (Iqbal et al., 2013). La familia MIR 398 fue descrita en *A. thaliana* como uno de los principales reguladores del estrés oxidativo en plantas (Sunkar et al., 2006). La mayor actividad y expresión del miRNA398 ha sido observada en estadio maduro del arándano (Hou et al., 2017), melón (Bai et al., 2020), olivo (Carbone et al., 2019) y baya Kyoho y baya Fengzao (*V. labrusca*) (Guo et al., 2018), lo que concuerda con nuestros resultados en donde se puede observar una mayor cantidad de miembros de la familia MIR 398 en estadio maduro. Su principal función es la regulación de las superóxido dismutasas 1 y 2 (CSD1 y CSD2), que se encargan de disminuir la

cantidad de agentes reactivos de oxígeno (EROS) como el  $H_2O_2$  y el  $O_2^-$  en plantas y en especial durante la maduración (Jiménez et al., 2002) y una proteína chaperona encargada de entregar los iones de cobre a CSD 1 y 2 (CCSD1) (Bouché, 2010). Tomando en cuenta que la maduración es un proceso oxidativo que requiere de enzimas que cuiden el delicado equilibrio entre los EROS producidos por la respiración (Jiménez et al., 2002), el rol dentro de la maduración del miRNA398 se podría dividir en dos sistemas diferentes: el primero es la regulación de las enzimas CSD1 y 2. Existe abundante evidencia que la actividad de estas dos enzimas disminuye drásticamente a partir del estadio maduro de los frutos de tomate (Kumar et al., 2016), baya Kyoho (Guo et al., 2016) y mango (*Mangifera indica*) (Razzaq et al., 2013), justo cuando la actividad del miRNA 398 es más abundante. La regulación negativa de CSD1 y 2 genera una acumulación de agentes EROS, que provoca la senescencia del fruto. Esta disminución de actividad en CSD1 y 2 había sido atribuida a la acumulación de el  $H_2O_2$  en la mitocondria y el pericarpio del fruto (Jiménez et al., 2002; Kumar et al., 2016), sin embargo, con nuestros resultados podríamos inferir que el miRNA398 también es una causa probable de su regulación, lo que podría indicar su importancia en las etapas finales de la maduración del fruto y la culminación de su ciclo de vida. El segundo sistema radica en la inhibición de la proteína CCSD1 encargada de la entrega del ion cobre a CSD1 y CSD2 (Bouché, 2010). La regulación de esta enzima provocaría un incremento en la concentración del ion cobre en el fruto de estadio maduro, evidencia de esto ha sido encontrada en cereza, manzana (Brown et al., 1996) y níspero (Rop et al., 2011). Los iones de cobre son llevados por la proteína Respondedora de Antagonista 1 (RAN1) hasta el receptor de etileno ETR1, el cual requiere de  $Cu^{2+}$  como cofactor para detectar el etileno, comenzando así la transcripción de genes asociados a la maduración (Rodríguez et al., 1999; Liu et al., 2015; Agarwal et al., 2012). Esta evidencia proporciona un importante rol del miRNA398 durante la senescencia y la generación de enzimas relacionadas a los últimos periodos de maduración del fruto. Por último, la familia MIR 482 tiene como objetivo a la familia de proteínas con dominios de sitio de unión a receptores ricos en leucina (NBS-LRR) las cuales confieren resistencia al ataque de patógenos, en especial al virus

del mosaico del tabaco (TMV) (Zhu et al., 2013; Jiang et al., 2019). La expresión de esta familia durante la maduración de frutos como la naranja dulce (*Citrus sinensis*), (Wu et al., 2016), la fresa (Haile et al., 2019) y la frambuesa negra (*Rubus coreanus*) (Chen et al., 2018), se reporta principalmente durante el estadio rayado de maduración, permitiendo la actividad de las proteínas NBS-LRR en el periodo donde el fruto es más vulnerable al ataque de patógenos (Haile et al., 2019). En *A. thaliana* se ha descrito los genes SMG7 como objetivos del miRNA482, los cuales se encargan de la degradación de ARN viejos o aberrantes (An et al., 2015; Capitao et al., 2018).

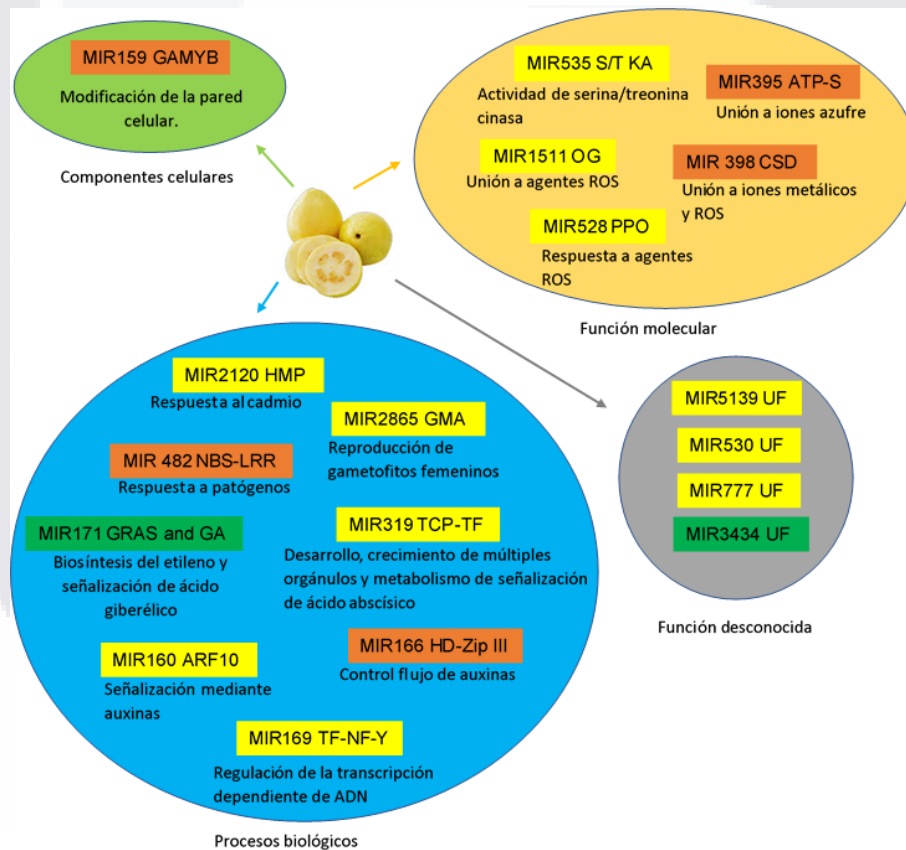


Figura 36. Clasificación ontológica de los genes objetivos de los miRNAs encontrados en guayaba. Fondo amarillo, miRNAs encontrados en fruto maduro. Fondo verde, miRNAs encontrados en fruto rayado. Fondo naranja, miRNAs encontrados en ambos estadios. GAMYB, gibberellic acid dependent MYB, S/T KA, serine/threonine kinase activity, ATP-S, ATP sulfurylase, OG, obscuring genes response, CSD, SUPER OXIDE DISMUTASE, PPO PLYPHENOL OXIDASE, HMP, heavy metal presence, GMA, feminine gametophytes

abortion, NBS-LRR, NUCLEOTIDE BINDING SITE FOR LEUCINE RICH REGIONS, GRAS GIBBERELLIN-INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR OF GAI-3 (RGA) AND SCARECROW (SCR), GA, gibberellin acid, TCP, EOSINTEBRANCHED 1/CYLOIDEA/PROLIFERATIN CELL FACT, ARF, AUXINE RESPONSE FACTORS, HD-ZIP III, HOMODOMAIN LEUCINE ZIPPER III, TF-NF-Y, NUCLEAR FACTOR Y, TRANSCRIPTION FACTOR, UF, Unknown function.

#### 7.10.8 Identificación de miRNAs relacionados al proceso de maduración

Se encontraron miRNAs que podrían tener una relación directa (relacionados a la biosíntesis de etileno, modificación de pared celular o regulación de enzimas esenciales para el proceso de maduración), o indirecta (factores de crecimiento, enzimas secundarias, captación de iones metálicos esenciales) con la maduración (Tabla 12). En los relacionados de manera directa se encontró al miRNA 535, quien regula la expresión de la enzima HT1, la cual inhibe la producción de etileno (Wu et al., 2016; Onik et al., 2018). También el miRNA 171 quien regula al factor de transcripción GRAS4, involucrado en la biosíntesis del etileno (Liu et al., 2021; Chen et al., 2019). El miRNA319 quien regula los factores TCP9, alterando la firmeza del fruto y producción de ABA (Fang et al., 2020). El miRNA159 encargado de regular los factores MYB33, MYB101, que mediante señalizaciones de ABA ayudan al proceso de maduración y a MYB65, el cual modifica la pared celular mediante la adición de residuos de calosa (Guo et al., 2018; Bondada, 2014). El miRNA 166 que regula genes relacionados con la biosíntesis de residuos de glucoesfingolípidos y galactosa, modificando la estructura de la pared celular y la firmeza del fruto (Yang et al., 2019). Por último, se tiene al miRNA 160 quien regula los ARF los cuales se relacionan con el metabolismo de señalización del etileno durante la maduración de fruto climatéricos (Trainotti et al., 2007).



**Tabla 12. miRNAs de relación directa e indirecta con la maduración.**

miRNA	Tipo de relación con la maduración	Gen objetivo	Observaciones sobre su acción
159	Directa	Factor de transcripción MYB33, MYB101 y MYB65	Firmeza del fruto Producción de ABA
160	Directa	ARFs	Señalización de etileno
166	Directa	Proteínas HD-Zip III	Firmeza del fruto
169	Indirecta	NF-YA, NF-YB	Coloración de fruto maduro
171	Directa	Factor de transcripción GRAS4	Biosíntesis de etileno
319	Directa	Factor de transcripción TCP9	Firmeza del fruto Producción de ABA
395	Indirecta	ATP-sulfirilasas	Síntesis de metionina y cisteína
398	Indirecta	CSD1, CSD2 y CCSD1	Producción de iones cobre
528	Indirecta	PPO	Oscurecimiento del fruto
535	Directa	Enzima HT1	Biosíntesis de etileno
2120	Indirecta	Proteínas ASRs	Señalización ABA

Los de relación indirecta son el miRNA 169, que si se sobre expresa, afecta a los frutos en maduración provocando déficit en su coloración debido a la inhibición de factores NF-Y (Li et al., 2016). El miRNA 528 regula PPO que ayudan a prevenir el oscurecimiento enzimático en fruto maduro (Ma et al., 2020). El miRNA 2120, se expresa en presencia de iones  $Cd^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  y su gen objetivo son las ASR participantes en el metabolismo de señalización ABA (Huang et al., 2009). El miRNA 395 regula las ATP-sulfirilasas, dejando libre azufre para su conversión a cisteína y metionina, precursores del etileno (Gharat y Shaw, 2016). El miRNA 398 quien media el estrés oxidativo del fruto durante su maduración, regulando los factores CSD 1 y 2, y también a la proteína chaperona CCSD1, incrementando los iones cobre para su posterior uso en el metabolismo de la señalización de etileno (Agarwal et al., 2012; Sunkar et al., 2006).

## VIII. CONCLUSIÓN

Se identificaron y analizaron bioinformáticamente tres secuencias parciales de genes relacionados con la modificación de la pared celular en guayaba:  $\beta$ -1,4-endoglucanasa (*PgE17*),  $\beta$ -galactosidasa 1 (*PgGa1*) y una glucosilceramidasa no lisosomal (*PgGly1*).

El análisis bioinformático mostró que *PgE17* pertenece a una  $\beta$ -1,4-endoglucanasa 17 que incluye parte del dominio conservado Glyco\_hydro\_9 y el motivo PLN02266. *PgGa1* pertenece a una  $\beta$ -galactosidasa 1 que contiene el dominio Glyco\_hydro\_35 y el sitio activo GGPIILSQIENEF, distintivos de la familia GH35. *PgGly1* corresponde a una glucosil ceramidasa no lisosomal y contiene el dominio catalítico DUF608 de la región C-terminal, característico de la familia GH116.

El análisis filogenético reveló que estos genes están altamente conservados en la familia *Myrtaceae*, además de tener genes homólogos en las especies dentro de esta familia.

El análisis de qRT-PCR mostró la expresión de los 3 genes de interés en todos los tejidos. Además, se observó que la expresión de *PgE17* y *PgGa1* es mayor en los estadios de rayado y maduro. Para *PgGly1* los mayores niveles de expresión fueron en hoja y estadio sobre maduro. Esto indicaría que la función de *PgGly1* es crucial para el metabolismo basal de la planta y que además juega un rol importante en el desarrollo del fruto.

Se identificaron y caracterizaron 29 familias de miRNAs expresados durante los estadios de maduración rayado y maduro de la guayaba, siendo las familias MIR166, MIR482 y MIR395 las que mayor número de miembros expresaron.

Se identificó y describió la función de 6 familias de miRNA (MIR159, MIR160, MIR166, MIR171, MIR319, MIR535) que se involucran de manera directa al proceso de maduración y otras 5 (MIR169, MIR395, MIR398, MIR528, MIR2120) de manera indirecta.

## IX. REFERENCIAS

- Abu-Bakr A. Abu-Goukh and Hind A. Bashir. 2003. Changes in pectic enzymes and cellulase activity during guava fruit ripening. *Food Chemistry*. ELSEIVIER. 213-218.
- Agarwal, Gaurav, Divya Choudhary, Virendra P. Singh, and Ajay Arora. 2012. "Role of Ethylene Receptors during Senescence and Ripening in Horticultural Crops." *Plant Signaling and Behavior* 7 (7): 827–46. <https://doi.org/10.4161/psb.20321>.
- Akihiro, N. et al. 2014.  $\beta$ -Galactosidase and Its Significance in Ripening of "Saijyo" Japanese Persimmon Fruit. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 67(1). 68-76.
- Ali, U., Li, H., Wang, X., & Guo, L. (2018). Emerging Roles of Sphingolipid Signaling in Plant Response to Biotic and Abiotic Stresses. *Molecular Plant*, 11(11), 1328–1343. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.10.001>
- An, Wenyan, Wenfang Gong, Shoupu He, Zhaoe Pan, Junling Sun, and Xiongming Du. 2015. MicroRNA and mRNA Expression Profiling Analysis Revealed the Regulation of Plant Height in *Gossypium Hirsutum*. *BMC Genomics* 16 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2071-6>.
- Anowar Hossain, Masud Rana, Yoshinobu Kimura, Hairul Azman Roslan. 2014. "Changes in Biochemical Characteristics and Activities of Ripening Associated Enzymes in Mango Fruit during the Storage at Different Temperatures", *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2014/232969>
- Axtell, Michael J. y Bartel David. 2005. Antiquity of MicroRNAs and Their Targets in Land Plants. *Plant Cell* 17 (6): 1658–73. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.032185>.
- Ayub MY, Norazmir MN, Mamot S, Jeeven K, & Hadijah H (2010) Anti-hypertensive effect

of pink guava (*Psidium guajava*) puree on spontaneous hypertensive rats. International Food Research Journal 17:89–96.

Baby J. y Priya M.R. 2011. Review on Nutritional, Medicinal and Pharmacological Properties of Guava (*Psidium guajava* L.) International Journal of Pharma and Bio Sciences. 2: 53-69.

Bai, Selinge, Yunyun Tian, Chao Tan, Shunbuer Bai, Jinfeng Hao, and Agula Hasi. 2020. “Genome-Wide Identification of MicroRNAs Involved in the Regulation of Fruit Ripening and Climacteric Stages in Melon (*Cucumis Melo*).” *Horticulture Research* 7 (1). <https://doi.org/10.1038/s41438-020-0331-3>.

Baldrich, Patricia, Sonia Campo, Ming Tsung Wu, Tze Tze Liu, Yue le Caroline Hsing, and Blanca San Segundo. 2015. “MicroRNA-Mediated Regulation of Gene Expression in the Response of Rice Plants to Fungal Elicitors.” *RNA Biology* 12 (8): 847–63. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1050577>.

Bavelloni Alberto, Giulia Ramazzotti, Alessandro Poli, Manuela Piazzini, Enrico Focaccia, William Blalock, Irene Faenza. 2017. MiRNA-210: A Current Overview. *Anticancer Research* Dec 2017, 37 (12) 6511-6521.

Bi, Fangcheng, Xiangchun Meng, Chao Ma, and Ganjun Yi. 2015. “Identification of MiRNAs Involved in Fruit Ripening in Cavendish Bananas by Deep Sequencing.” *BMC Genomics* 16 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1995-1>.

Binder M. 2020. Ethylene signaling in plants. *Journal of Biological Chemistry*, Vol 295:22, 7710 – 7725. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.010854>

Bondada B (2014). Structural and compositional characterization of suppression of uniform ripening in grapevine: A paradoxical ripening disorder of grape berries with no known

causative clues. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 139(5):567–581. <https://doi.org/10.21273/jashs.139.5.567>.

Bondada B, Harbertson E, Shrestha PM, Keller M (2017). Temporal extension of ripening beyond its physiological limits imposes physical and osmotic challenges perturbing metabolism in grape (*Vitis vinifera* L.) berries. *Scientia Horticulturae* 219: 135–143. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.03.002>.

Boot, R. G., Verhoek, M., Donker-Koopman, W., Strijland, A., Van Marle, J., Overkleeft, H. S., Wennekes, T., & Aerts, J. M. F. G. (2007). Identification of the non-lysosomal glucosylceramidase as  $\beta$ -glucosidase 2. *Journal of Biological Chemistry*, 282(2), 1305–1312. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610544200>

Bouché, Nicolas. 2010. “New Insights into MiR398 Functions in Arabidopsis.” *Plant Signaling and Behavior* 5 (6): 684–86. <https://doi.org/10.4161/psb.5.6.11573>.

Braga MA, Marques TR, Simão AA, Botelho LNS, Oliveira LS, Abreu CMP (2018) Mechanism of firmness loss in guava cv. Pedro Sato during ripening at room temperature. *Food Science and Technology* 38(1):26–32. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.35416>.

Breslow DK, & Weissman JS (2010) Membranes in Balance: Mechanisms of Sphingolipid Homeostasis. *Molecular Cell* 40:267–279. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.10.005>

Brown, G S, A E Kitchener, W B McGlasson, and S Barnes. 1996. “The Effects of Copper and Calcium Foliar Sprays on Cherry and Apple Fruit Quality.” *Scientia Horticulturae* 67 (3): 219–27. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(96\)00937-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-4238(96)00937-5).

Buchanan M, Burton RA, Dhugga KS, Rafalski AJ, Tingey SV, Shirley NJ, Fincher GB (2012) Endo-(1,4)- $\beta$ -Glucanase gene families in the grasses: temporal and spatial

Co-transcription of orthologous genes. BMC Plant Biology.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-235>.

Cabrera JC, Boland A, Messiaen J, Cambier P, Van Cutsem P. 2008. Egg box conformation of oligogalacturonides: the time-dependent stabilization of the elicitor-active conformation increases its biological activity. Glycobiology. Vol 18(6):473-82. doi: 10.1093/glycob/cwn027.

Camarena-Tello JC, Martínez-Flores HE, Garnica-Romo MG, Padilla-Ramírez JS, Saavedra-Molina A, Alvarez-Cortes O, Bartolomé-Camacho MC, & Rodiles-López JO (2018) Quantification of phenolic compounds and in vitro radical scavenging abilities with leaf extracts from two varieties of *Psidium guajava* L. Antioxidants 7:1–12. <https://doi.org/10.3390/antiox7030034>

Capitao, Claudio, Neha Shukla, Aneta Wandrolova, Ortrun Mittelsten Scheid, and Karel Riha. 2018. "Functional Characterization of SMG7 Paralogs in *Arabidopsis Thaliana*." Frontiers in Plant Science 871 (November): 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01602>.

Carbone, Fabrizio, Leonardo Bruno, Gaetano Perrotta, Maria B. Bitonti, Innocenzo Muzzalupo, and Adriana Chiappetta. 2019. "Identification of MiRNAs Involved in Fruit Ripening by Deep Sequencing of *Olea Europaea* L. Transcriptome." PLoS ONE 14 (8): 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221460>.

Carey, A. T., Holt, K., Picard, S., Wilde, R., Tucker, C. A., Bird, C. R., Schuch, W., Seymour, C. B., C, U. K. A. T., Macrae, E. A., & Physiol, R. J. R. P. (1995). Tomato Exo-(1,4)-P-Galactanase'. 1 995, 1099–1107.

Carpinetti PA, Fiorese VS, Ignez da Cruz T, de Almeida F, Canal D, Ferreira A, Ferreira M. (2021). Efficient method for isolation of high-quality RNA from *Psidium guajava* L. tissues. PloS one, 16(7), e0255245. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255245>

Carthew, Richard W., and Erik J. Sontheimer. 2009. "Origins and Mechanisms of MiRNAs and SiRNAs." *Cell* 136 (4): 642–55. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035>.

Cedillo-Jiménez, C A, C Mondragón-Jacobo, L A Cruz-Ramirez, and A Cruz-Hernández. 2020. "MiRNA and Target Interaction in Ethylene Biosynthesis Pathway for Prickly Pear Ripening." In *Acta Horticulturae*, 521–26. International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2020.1297.68>.

Chao Gao, Zheng Ju, Dongyan Cao, Baiqiang Zhai, Guozheng Qin, Hongliang Zhu, Daqi Fu, Yunbo Luo and Benzhong Zhu. 2014. MicroRNA profiling analysis throughout tomato fruit development and ripening reveals potential regulatory. *Plant Biotechnology Journal*. 13. 370-382.

Charoenwattanasatien R, Pengthaisong S, Breen I, Mutoh R, Sansenya S, Hua Y, Tankrathok A, Wu L, Songsiriritthigul C, Tanaka H, Williams SJ, Davies GJ, Kurisu G, & Cairns JRK (2016) Bacterial  $\beta$ -Glucosidase Reveals the Structural and Functional Basis of Genetic Defects in Human Glucocerebrosidase 2 (GBA2). *ACS Chemical Biology* 11:1891–1900. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00192>

Chen, Hong, Huihui Li, Xiaoqing Lu, Longzheng Chen, Jing Liu, and Han Wu. 2019. "Identification and Expression Analysis of GRAS Transcription Factors to Elucidate Candidate Genes Related to Stolons, Fruit Ripening and Abiotic Stresses in Woodland Strawberry (*Fragaria Vesca*)." *International Journal of Molecular Sciences* 20 (18): 1–24. <https://doi.org/10.3390/ijms20184593>.

Chen, M, Cahoon, E. B., Saucedo-García, M., Plasencia, J., & Gavilanes-Ruíz, M. (2009). *Plant Sphingolipids: Structure, Synthesis and Function* BT-Lipids in Photosynthesis: Essential and Regulatory Functions (H. Wada & N. Murata (eds.); pp. 77–115). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-2863-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-90-481-2863-1_5)

Chen M, Han G, Dietrich CR, Dunn TM, Cahoon EB. 2006. The essential nature of sphingolipids in plants as revealed by the functional identification and characterization of the *Arabidopsis* LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase. *Plant Cell*; 18:3576–3593.

Chen, Qing, Xunju Liu, Yueyang Hu, Bo Sun, Yaodong Hu, Xiaorong Wang, Haoru Tang, and Yan Wang. 2018. “Transcriptomic Profiling of Fruit Development in Black Raspberry *Rubus Coreanus*.” *International Journal of Genomics* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8084032>.

Cheng MN, Huang ZJ, Hua QZ, Shan W, Kuang JF, Lu WJ, Qin YH, Chen JY (2017) The WRKY transcription factor HpWRKY44 regulates CytP450-like1 expression in red pitaya fruit (*Hylocereus polyrhizus*). *Horticulture Research*. <https://doi.org/10.1038/hortres.2017.39>.

Coant, N., Hannun, Y. A., & Brook, S. (2020). Neutral Ceramidase: advances in mechanism, cell regulation, and roles in cancer. 141–146. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2018.10.005.Neutral>

Cobucci-Ponzano, B., Aurilia, V., Riccio, G., Henrissat, B., Coutinho, P. M., Strazzulli, A., Padula, A., Corsaro, M. M., Pieretti, G., Pocsfalvi, G., Fiume, I., Cannio, R., Rossi, M., & Moracci, M. (2010). A new archaeal  $\beta$ -glycosidase from *Sulfolobus solfataricus*: Seeding a novel retaining  $\beta$ -glycan-specific glycoside hydrolase family along with the human non-lysosomal glucosylceramidase GBA. *Journal of Biological Chemistry*, 285(27), 20691–20703. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.086470>

Colquhoun TA, Schwieterman ML, Gilbert JL, Jaworski EA, Langer KM, Jones CR, Rushing GV, Hunter TM, Olmstead J, Clark DG, Folta KM (2013) Light modulation of volatile organic compounds from petunia flowers and selects fruits. *Postharvest Biology and*



Technology

86:37–44.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.06.013>.

Corbacho, J., Inês, C., Paredes, M. A., Labrador, J., Cordeiro, A. M., Gallardo, M., & Gomez-Jimenez, M. C. (2018). Modulation of sphingolipid long-chain base composition and gene expression during early olive-fruit development, and putative role of brassinosteroid. *Journal of Plant Physiology*, 231, 383–392.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.10.018>

Cosgrove DJ (2016) Plant cell wall extensibility: Connecting plant cell growth with cell wall structure, mechanics, and the action of wall-modifying enzymes. *Journal of Experimental Botany* 67(2):463–476. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv511>.

Cruz Aline Bertinatto, Bianchetti Ricardo Ernesto, Alves Frederico Rocha Rodrigues, Purgatto Eduardo, Peres Lazaro Eustaquio Pereira, Rossi Magdalena, Freschi Luciano. 2018. Light, Ethylene and Auxin Signaling Interaction Regulates Carotenoid Biosynthesis During Tomato Fruit Ripening. *Frontiers in Plant Science*. Vol 9 .10.3389/fpls.2018.01370

Dai GY, Yin J, Li KE, Chen DK, Liu Z, Bi FC, Rong C, & Yao N (2020) The Arabidopsis AtGCD3 protein is a glucosylceramidase that preferentially hydrolyzes long-acyl-chain glucosylceramides. *Journal of Biological Chemistry* 295:717–728. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011274>

Davies, G., & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3(9), 853–859. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00220-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00220-9)

Ding, Yanfei, Shaohua Gong, Yi Wang, Feijuan Wang, Hexigeduleng Bao, Junwei Sun, Chong Cai, Keke Yi, Zhixiang Chen, and Cheng Zhu. 2018. “MicroRNA166 Modulates Cadmium Tolerance and Accumulation in Rice.” *Plant Physiology* 177 (4): 1691–1703. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00485>.

Disket, D. et al. (2017). Biochemical changes in guava (*Psidium guajava*) fruits during different stages of ripening. Indian Journal of Agricultural Sciences. 87 (2), 257-60.

Dolkar, D., Bakshi, P., Wali, VK. Bharat, B., Akash, S., 2014. Growth and yield attributes of commercial guava (*Psidium guajava* L.) cultivars under sub-tropical condition. Ind J Plant Physiol. 19, 79–82 (2014). <https://doi.org/10.1007/s40502-014-0076-9>

Doyle JJ and Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of leaf tissue. 1987. Phytochemical Bulletin. 19 (1): 11 – 15.

Elhiti, Mohamed, and Claudio Stasolla. 2009. “Structure and Function of Homodomain-Leucine Zipper (HD-Zip) Proteins.” Plant Signaling and Behavior 4 (2): 86–88. <https://doi.org/10.4161/psb.4.2.7692>.

EMBL-EBI Hinxton. Pfam Tool. 2019. Available from <https://pfam.xfam.org/>. Accessed July 28, 2019.

ExpASY. PROSITE tool. 2019. Available from <https://prosite.expasy.org/>. Accessed July 28, 2019.

Fahlgren, Noah, Sanjuro Jogdeo, Kristin D. Kasschau, Christopher M. Sullivan, Elisabeth J. Chapman, Sascha Laubinger, Lisa M. Smith, et al. 2010. “MicroRNA Gene Evolution in *Arabidopsis Lyrata* and *Arabidopsis Thaliana*.” Plant Cell 22 (4): 1074–89. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.073999>.

Fangfang Li, Weidi Wang, Nan Zhao, Bingguang Xiao, Peijian Cao, Xingfu Wu, Chuyu Ye, Enhui Shen, Jie Qiu, Qian-Hao Zhu, Jiahua Xie, Xueping Zhou, and Longjiang Fan. 2015. Regulation of Nicotine Biosynthesis by an Endogenous Target Mimicry of MicroRNA in Tobacco. Plant Physiology. 169. 1062-1071.

Fang, Yujie, Yuqian Zheng, Wei Lu, Jian Li, Yujing Duan, Shuai Zhang, and Youping Wang. 2020. "Roles of MiR319-Regulated TCPs in Plant Development and Response to Abiotic Stress." *Crop Journal* 9 (1): 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2020.07.007>.

Feng C, Feng C, Lin X, Liu S, Li Y, Kang M (2021) A chromosome-level genome assembly provides insights into ascorbic acid accumulation and fruit softening in guava (*Psidium guajava*). *Plant Biotechnology Journal* 19 (4):717-730. <https://doi.org/10.1111/pbi.13498>

Ferdous, Jannatul, Syed S. Hussain, and Bu Jun Shi. 2015. "Role of MicroRNAs in Plant Drought Tolerance." *Plant Biotechnology Journal* 13 (3): 293–305. <https://doi.org/10.1111/pbi.12318>.

Ferrara, M. C., Cobucci-Ponzano, B., Carpentieri, A., Henrissat, B., Rossi, M., Amoresano, A., & Moracci, M. (2014). The identification and molecular characterization of the first archaeal bifunctional exo- $\beta$ -glucosidase/N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase demonstrate that family GH116 is made of three functionally distinct subfamilies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(1), 367–377. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.09.022>

Fischer, G., & Melgarejo, L. M. (2021). Ecophysiological aspects of guava (*Psidium guajava* L.). A review. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 15(2), e12355. <https://doi.org/10.17584/rcch.2021v15i2.12355>

Franková L, Fry SC (2013) Biochemistry and physiological roles of enzymes that "cut and paste" plant cell-wall polysaccharides. *Journal of Experimental Botany* 64(12):3519–3550. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert201>.

Fredj Ben, B., Artola, M., Overkleeft, H. S., Ubbink, M., & Johannes, M. F. G. A. (2018). Distinguishing the differences in -glycosylceramidase folds, dynamics, and actions

informs therapeutic uses. *Journal of Lipid Research*, 59(12), 2262–2276.  
<https://doi.org/10.1194/jlr.R086629>

Fruticultores de Calvillo, S.A. de C.V. 2008. Estudio orientado a identificar las necesidades de infraestructura logística en la cadena de suministro de la guayaba para la exportación a Estados Unidos.

Fukuda H (2014) *Plant cell wall patterning and cell shape*. Wiley Blackwell, Japan.

Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A. 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press. pp. 571-607

Gault, C. R., Obeid, L. M., & Hannun, Y. A. (2010). An overview of sphingolipid metabolism: From synthesis to breakdown. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 688, 1–23. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6741-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6741-1_1)

Gélvez, T.C. 1998. Manejo Post-Cosecha y Comercialización de Guayaba (*Psidium guajava* L.) Serie de paquetes de capacitación sobre manejo post-cosecha de frutas y hortalizas No. 9. Programa Nacional del SENA de Capacitación en Manejo Post-Cosecha y Comercialización de Frutas y Hortalizas, Convenio SENA – Reino Unido. Santafé de Bogotá. Colombia. 380p.

Gharat, S. A., and B. P. Shaw. 2016. “Computational Prediction and Experimental Validation of a Novel MiRNA in *Suaeda Maritima*, a Halophyte.” *Genetics and Molecular Research* 15 (1). <https://doi.org/10.4238/gmr.15017527>.

Guddeti, Sreelatha, De Chun Zhang, Ai Li Li, Chuck H. Leseberg, Hui Kang, Xiao Guang Li, Wen Xue Zhai, Mitrick A. Johns, and Long Mao. 2005. “Molecular Evolution of the Rice MiR395 Gene Family.” *Cell Research* 15 (8): 631–38.

<https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290333>.

Gudenschwager O, González-Agüero M, Defilippi BG. 2012. A general method for high-quality RNA isolation from metabolite-rich fruits, South African Journal of Botany, Volume 83, P. 186-192, <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2012.08.004>.

Guo, Da Long, Fei Fei Xi, Yi He Yu, Xiao Yu Zhang, Guo Hai Zhang, and Gan Yuan Zhong. 2016. "Comparative RNA-Seq Profiling of Berry Development between Table Grape 'Kyoho' and Its Early-Ripening Mutant 'Fengzao.'" BMC Genomics 17 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3051-1>.

Guo, Da Long, Qiong Li, Wen Qing Lv, Guo Hai Zhang, and Yi He Yu. 2018. "MicroRNA Profiling Analysis of Developing Berries for 'Kyoho' and Its Early-Ripening Mutant during Berry Ripening." BMC Plant Biology 18 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1516-x>.

Guo, L., Mishra, G., Markham, J. E., Li, M., Tawfall, A., Welti, R., & Wang, X. (2012). Connections between sphingosine kinase and phospholipase D in the abscisic acid signaling pathway in *Arabidopsis*. Journal of Biological Chemistry, 287(11), 8286–8296. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.274274>

Haile, Zeraye Mehari, Ellaine Grace Nagpala-De Guzman, Marco Moretto, Paolo Sonogo, Kristof Engelen, Lisa Zoli, Claudio Moser, and Elena Baraldi. 2019. "Transcriptome Profiles of Strawberry (*Fragaria Vesca*) Fruit Interacting with *Botrytis Cinerea* at Different Ripening Stages." Frontiers in Plant Science 10 (September): 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01131>.

Harkess, Alex, Jinsong Zhou, Chunyan Xu, John E. Bowers, Ron Van Der Hulst, Saravanaraj Ayyampalayam, Francesco Mercati, et al. 2017. "The Asparagus Genome Sheds Light on the Origin and Evolution of a Young y Chromosome." Nature Communications 8 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01064-8>.

Hédiji, Hédia, Wahbi Djebali, Aïcha Belkadhi, Cécile Cabasson, Annick Moing, Dominique Rolin, Renaud Brouquisse, Philippe Gallusci, and Wided Chaïbi. 2015. "Impact of Long-Term Cadmium Exposure on Mineral Content of *Solanum lycopersicum* Plants: Consequences on Fruit Production." *South African Journal of Botany* 97: 176–81. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.01.010>.

Hendelman, A, K Buxdorf, R Stav, M Kravchik, and T Arazi. 2012. "Inhibition of Lamina Outgrowth Following *Solanum lycopersicum* AUXIN RESPONSE FACTOR 10 (SIARF10) Derepression." *Plant Molecular Biology* 78 (6): 561–76. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9883-4>.

Henrissat, B., Callebaut, I., Fabrega, S., Lehn, P., Mornon, J. P., & Davies, G. (1995). Conserved catalytic machinery and the prediction of a common fold for several families of glycosyl hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(15), 7090–7094. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.15.7090>

Hirsch, Sibylle, and Giles E.D. Oldroyd. 2009. "GRAS-Domain Transcription Factors That Regulate Plant Development." *Plant Signaling and Behavior* 4 (8): 698–700. <https://doi.org/10.4161/psb.4.8.9176>.

Hou CX, Dirk LMA, Pattanaik S, Das NC, Maiti IB, Houtz RL, Williams MA (2007) Plant peptide deformylase: A novel selectable marker and herbicide target based on essential co-translational chloroplast protein processing. *Plant Biotechnology Journal* 5(2):275–281. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00238.x>.

Hou CX, Dirk LMA, Williams MA (2004) Inhibition of peptide deformylase in *Nicotiana tabacum* leads to decreased D1 protein accumulation, ultimately resulting in a reduction of photosystem II complexes. *American Journal of Botany* 91(9):1304–1311. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.9.1304>.

Hou, Yanming, Lulu Zhai, Xuyan Li, Yu Xue, Jingjing Wang, Pengjie Yang, Chunmei Cao, Hongxue Li, Yuhai Cui, and Shaomin Bian. 2017. "Comparative Analysis of Fruit Ripening-Related MiRNAs and Their Targets in Blueberry Using Small RNA and Degradome Sequencing." *International Journal of Molecular Sciences* 18 (12). <https://doi.org/10.3390/ijms18122767>.

Huang, Si Qi, Jie Peng, Cheng Xiang Qiu, and Zhi Min Yang. 2009. "Heavy Metal-Regulated New MicroRNAs from Rice." *Journal of Inorganic Biochemistry* 103 (2): 282–87. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2008.10.019>.

Huijuan Yang, Liu Junling, Dang Meile, Zhang Bo, Li Hongguang, Meng Rui, Qu Dong, Yang Yazhou, Zhao Zhengyang. 2018. Analysis of  $\beta$ -Galactosidase During Fruit Development and Ripening in Two Different Texture Types of Apple Cultivars. *Frontiers in Plant Science*. Vol 9. 10.3389/fpls.2018.00539

Ifigeneia M, Keulemans J, Kanellis A, Davey M (2012). Regulation of fruit ascorbic acid concentrations during ripening in high and low vitamin C tomato cultivars. *BMC Plant Biology* 12:239. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-239>

Iqbal, Noushina, Asim Masood, M. Iqbal R. Khan, Mohd Asgher, Mehar Fatma, and Nafees A. Khan. 2013. "Cross-Talk between Sulfur Assimilation and Ethylene Signaling in Plants." *Plant Signaling and Behavior* 8 (1): 104–12. <https://doi.org/10.4161/psb.22478>.

Jara K, Castro RI, Ramos P, Parra-Palma C, Valenzuela-Riffo F, Morales-Quintana L (2019) Molecular Insights into FaEG1, a Strawberry Endoglucanase Enzyme Expressed during Strawberry Fruit Ripening. *Plants (Basel, Switzerland)* 8(6):140. <https://doi.org/10.3390/plants8060140>

Jiang, F., Lopez, A., Jeon, S. et al. (2019) Disassembly of the fruit cell wall by the ripening-associated polygalacturonase and expansin influences tomato cracking. *Hortic Res* 6, 17. <https://doi.org/10.1038/s41438-018-0105-3>

Jiang, Ning, Jun Cui, Yunsheng Shi, Guanglei Yang, Xiaoxu Zhou, Xinxin Hou, Jun Meng, and Yushi Luan. 2019. "Tomato LncRNA23468 Functions as a Competing Endogenous RNA to Modulate NBS-LRR Genes by Decoying MiR482b in the Tomato-*Phytophthora Infestans* Interaction." *Horticulture Research* 6 (1). <https://doi.org/10.1038/s41438-018-0096-0>.

Jiménez, Ana, Gary Creissen, Baldeep Kular, John Firmin, Sue Robinson, Martine Verhoeven, and Phil Mullineaux. 2002. "Changes in Oxidative Processes and Components of the Antioxidant System during Tomato Fruit Ripening." *Planta* 214 (5): 751–58. <https://doi.org/10.1007/s004250100667>.

Juere DH, Matthews BW, Huber RE (2012) LacZ  $\beta$ -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. *Protein Science* 21(12):1792–1807. <https://doi.org/10.1002/pro.2165>.

Jung, Jae-Hoon, and Chung-Mo Park. 2007. "MIR166/165 Genes Exhibit Dynamic Expression Patterns in Regulating Shoot Apical Meristem and Floral Development in *Arabidopsis*." *Planta* 225 (6): 1327–38.

Kamath J. V., C.K. Nair Rahul, K. Ashok, S.L. Mohana. 2008. *Psidium guajava* L: A review. *International Journal of Green Pharmacy*. 1: 9-12.

Kitazumi, Ai, Yoshihiro Kawahara, Ty S Onda, David De Koeyer, Benildo G de los Reyes, and S Cloutier. 2015. "Implications of MiR166 and MiR159 Induction to the Basal Response Mechanisms of an Andigena Potato (*Solanum Tuberosum* Subsp. Andigena) to Salinity Stress, Predicted from Network Models in *Arabidopsis*." *Genome* 58 (1): 13–24. <https://doi.org/10.1139/gen-2015-0011>.



Klee, H. J. (2010). Improving the flavor of fresh fruits: Genomics, biochemistry, and biotechnology. *New Phytologist*, 187(1), 44–56. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03281.x>

Kumar, Vinay, Mohammad Irfan, Sumit Ghosh, Niranjana Chakraborty, Subhra Chakraborty, and Asis Datta. 2016. "Fruit Ripening Mutants Reveal Cell Metabolism and Redox State during Ripening." *Protoplasma* 253 (2): 581–94. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0836-z>.

Leipelt, M., Warnecke, D., Zähringer, U., Ott, C., Müller, F., Hube, B., & Heinz, E. (2001). Glucosylceramide Synthases, a Gene Family Responsible for the Biosynthesis of Glucosphingolipids in Animals, Plants, and Fungi. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36), 33621–33629. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104952200>

Levy I, Shani Z, Shoseyov O (2002) Modification of polysaccharides and plant cell wall by endo-1,4-β-glucanase and cellulose-binding domains. *Biomolecular Engineering* 19(1):17–30. [https://doi.org/10.1016/s1389-0344\(02\)00007-2](https://doi.org/10.1016/s1389-0344(02)00007-2).

Li, Fangfang, Weidi Wang, Nan Zhao, Bingguang Xiao, Peijian Cao, Xingfu Wu, Chuyu Ye, et al. 2015. "Regulation of Nicotine Biosynthesis by an Endogenous Target Mimicry of MicroRNA in Tobacco." *Plant Physiology* 169 (2): 1062–71. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00649>.

Li PY, Hsu CC, Yin MC, Kuo YH, Tang FY, Chao CY, & McPhee DJ (2015) Protective effects of red guava on inflammation and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic mice. *Molecules* 20:22341–22350. <https://doi.org/10.3390/molecules201219831>

Li, Shan, Ka Li, Zheng Ju, Dongyan Cao, Daqi Fu, Hongliang Zhu, Benzong Zhu, and Yunbo Luo. 2016. "Genome-Wide Analysis of Tomato NF-Y Factors and Their Role

in Fruit Ripening.” *BMC Genomics* 17 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2334-2>.

Li, Xuyan, Xin Xie, Ji Li, Yuhai Cui, Yanming Hou, Lulu Zhai, Xiao Wang, Yanli Fu, Ranran Liu, and Shaomin Bian. 2017. “Conservation and Diversification of the MiR166 Family in Soybean and Potential Roles of Newly Identified MiR166s.” *BMC Plant Biology* 17 (1): 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-0983-9>.

Liang Y, Yuan Y, Liu T, Mao W, Zheng Y, Li D (2014) Identification and computational annotation of genes differentially expressed in pulp development of *Cocos nucifera* L. by suppression subtractive hybridization. *BMC Plant Biology* 14:205. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0205-7>

Liu M, Pirrello J, Chervin C, Roustan JP, 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>.

Liu, Yudong, Yuan Shi, Deding Su, Wang Lu, and Zhengguo Li. 2021. “SIGRAS4 Accelerates Fruit Ripening by Regulating Ethylene Biosynthesis Genes and SIMADS1 in Tomato.” *Horticulture Research* 8 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41438-020-00431-9>.

Ma, Li, Yan-na Shi, Don Grierson, and Kun-song Chen. 2020. “Research Advance in Regulation of Fruit Quality Characteristics by MicroRNAs.” *Food Quality and Safety* 4 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyz039>.

Maduwanthi, S., Marapana, R. (2017). "Biochemical changes during ripening of banana: A review", *International Journal of Food Science and Nutrition*, Vol.2 (5), pp. 166-169

Maduwanthi, S., Marapana, R. (2019). Induced Ripening Agents and Their Effect on Fruit Quality of Banana. *International journal of food science*, 2019, 2520179. <https://doi.org/10.1155/2019/2520179>

Maniatis T, Fritsch E and Sambrook J. 1982. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.

Markham, J. E., Lynch, D. V, Napier, J. A., Dunn, T. M., & Cahoon, E. B. (2013). Plant sphingolipids: function follows form. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(3), 350–357. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.02.009>

Maronedze C, Gehring C, Thomas L (2014) Dynamic changes in the date palm fruit proteome during development and ripening. *Horticulture Research*. <https://doi.org/10.1038/hortres.2014.39>.

Martin E, Schüle R, Smets K, Rastetter A, Boukhris A, Loureiro JL, Gonzalez MA, Mundwiller E, Deconinck T, Wessner M, Jornea L, Oteyza AC, Durr A, Martin JJ, Schöls L, Mhiri C, Lamari F, Züchner S, De Jonghe P, ... Stevanin G (2013) Loss of function of glucocerebrosidase GBA2 is responsible for motor neuron defects in hereditary spastic paraplegia. *American Journal of Human Genetics* 92:238–244. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.11.021>

Martínez-González M., Balois-Morales R., Cortes-Cruz M., Palomino-Hermosillo Y. y López-Gúzman G. (2017). Poscosecha de frutos: maduración y cambios bioquímicos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 19. 4075-4087.

Martínez-González, Rosendo Balois-Morales, Irán Alia-Tejagal, Moises Alberto Cortes-Cruz, Yolotzin Apatzingan Palomino-Hermosillo y Graciela Guadalupe López-Gúzman. 2017. Poscosecha de frutos: maduración y cambios bioquímicos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 19. 4075-4087.

Matthewman, Colette A., Cintia G. Kawashima, Dalibor Húska, Tibor Csorba, Tamas Dalmay, and Stanislav Kopriva. 2012. "MiR395 Is a General Component of the Sulfate Assimilation Regulatory Network in *Arabidopsis*." *FEBS Letters* 586 (19): 3242–48. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.06.044>.

Mellidou I, Keulemans J, Kanellis AK, Davey MW. 2012. Regulation of fruit ascorbic acid concentrations during ripening in high and low vitamin C tomato cultivars. *BMC Plant Biol.* 12:239. doi: 10.1186/1471-2229-12-239.

Melser S., Brigitte Batailler, Martine Peypelut, Christel Poujol, Yannick Bellec, Valérie Wattelet-Boyer, Lilly Maneta-Peyret, Jean-Denis Faure and Patrick Moreau. (2010). Glucosylceramide Biosynthesis is Involved in Golgi Morphology and Protein Secretion in Plant Cells. *Traffic.* 11: 479-490.

Mercado JA, Trainotti L, Jiménez-Bermúdez L, Santiago-Doménech N, Posé S, Donolli R, Barceló M, Casadoro G, Pliego-Alfaro F, Quesada MA (2010) Evaluation of the role of the endo- $\beta$ -(1,4)-glucanase gene FaEG3 in strawberry fruit softening. *Postharvest Biology and Technology* 55(1):8–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.08.004>.

Meng, Chen, Dongyue Yang, Xiaocui Ma, Weiyang Zhao, Xiaoqing Liang, Nana Ma, and Qingwei Meng. 2016. "Suppression of Tomato SINAC1 Transcription Factor Delays Fruit Ripening." *Journal of Plant Physiology* 193: 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.01.014>.

Miedes E, Zarra I, Hoson T, Herbers K, Sonnewald U, Lorences EP (2011) Xyloglucan endotransglucosylase and cell wall extensibility. *Journal of Plant Physiology* 168(3):196–203. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.06.029>.

Millar, Anthony A., Allan Lohe, and Gigi Wong. 2019. "Biology and Function of MiR159 in Plants." *Plants* 8 (8). <https://doi.org/10.3390/plants8080255>.

Moellering ER, Muthan B, Benning C. 2010. Freezing tolerance in plants requires lipid remodeling at the outer chloroplast membrane. *Science*. 330(6001):226-8. doi: 10.1126/science.1191803

Naphatsamon, U., Ohashi, T., Misaki, R., & Fujiyama, K. (2018). The production of human  $\beta$ -glucocerebrosidase in *Nicotiana benthamiana* root culture. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7). <https://doi.org/10.3390/ijms19071972>

Onik, Jakaria Chowdhury, Xiaojia Hu, Qiong Lin, and Zhidong Wang. 2018. “Comparative Transcriptomic Profiling to Understand Pre- and Post-Ripening Hormonal Regulations and Anthocyanin Biosynthesis in Early Ripening Apple Fruit.” *Molecules* 23 (8): 1–19. <https://doi.org/10.3390/molecules23081908>.

Opazo M., Carlos R. Figueroa, Josefa Henríquez, Raúl Herrera, Consuelo Bruno, Pablo D.T. Valenzuela, María A. Moya-León. Characterization of two divergent cDNAs encoding xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase (XTH) expressed in *Fragaria chiloensis* fruit. 2010. *Plant Science* 179: 479-488.

Orathai Wongmetha, Lih-Shang Ke, Yu-Shen Liang. 2015. The changes in physical, biochemical, physiological characteristics and enzyme activities of mango cv. Jinhwang during fruit growth and development. *Wageningen Journal of Life Sciences*. Vol 72–73: 7-12. <https://doi.org/10.1016/j.njas.2014.10.001>.

Padilla-Ramírez, José Saúl, Ernesto González Gaona, Miguel Ángel Perales de la Cruz. 2010. *Nuevas Variedades de Guayaba (Psidium Guajava L.)*. Folleto Té. México: INIFAP-CIRNOC-Campo Experimental Pabellón. 32 p.

Padilla Ramírez, José Saúl, Ernesto González Gaona, Miguel Ángel Perales de la Cruz, Héctor Rogelio Reyes Phillips, and Esteban Salvador Osuna Ceja. 2007. “Variabilidad Del Fruto de La Guayaba Mexicana.” SAGARPA/INIFAP, no. 31: 2–57.

http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/2045/Variabilidad del fruto de la guayaba psidium guajava l. Mexicana.pdf?sequence=1.

Padilla Ramírez JS, González Gaona E, Rodríguez Moreno VM, Cortés Penagos CJ, Sánchez Rico T (2014) Caracterización morfológica y bioquímica de frutos de guayaba, 1st edn. Sagarpa/Inifap, México.

Parra Coronado A. 2014. Maduración y comportamiento poscosecha de la guayaba (*Psidium guajava* L.) Una revisión. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas. 8: 314-327.

Parra-Lobato, M. C., Paredes, M. A., Labrador, J., Saucedo-García, M., Gavilanes-Ruiz, M., & Gomez-Jimenez, M. C. (2017). Localization of sphingolipid enriched plasma membrane regions and long-chain base composition during mature-fruit abscission in olive. *Frontiers in Plant Science*, 8(June), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01138>

Passardi F., G. Thelier, M. Za'mocky', C. Cosio, N. Rouhier, F. Teixera, M. Margis-Pinheiro, V. Loannidis, C. Penel, L. Falquet, C. Dunand. 2007. PeroxyBase: the peroxidase Database. *Phytochemistry*. *Phytochemistry* 68: 1605-11.

Peer, M., Stegmann, M., Mueller, M. J., & Waller, F. (2010). *Pseudomonas syringae* infection triggers de novo synthesis of phytosphingosine from sphingosine in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, 584(18), 4053–4056. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.08.027>

PEGUAM. PRODUCTORES Y EMPACADORES EXPORTADORES DE GUAYABA DE MEXICO, A.C. 2010. Diagnóstico de necesidades de infraestructura para impulsar la exportación de guayaba.

Pérez Gutiérrez R., M. Mitchell, S. Solis, R. Vargas. 2008. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. 117: 1-27.

Phukan UJ, Jeena GS, Shukla RK (2016) WRKY transcription factors: Molecular regulation and stress responses in plants. *Frontiers in Plant Science*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00760>.

Rajagopalan, Ramya, Hervé Vaucheret, Jerry Trejo, and David P. Bartel. 2006. "A Diverse and Evolutionarily Fluid Set of MicroRNAs in *Arabidopsis Thaliana*." *Genes and Development* 20 (24): 3407–25. <https://doi.org/10.1101/gad.1476406>.

Razzaq, Kashif, Ahmad Sattar Khan, Aman Ullah Malik, and Muhammad Shahid. 2013. "Ripening Period Influences Fruit Softening and Antioxidative System Of 'samar Bahisht Chaunsa' Mango." *Scientia Horticulturae* 160: 108–14. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.05.018>.

Reyes, José L., and Nam Hai Chua. 2007. "ABA Induction of MiR159 Controls Transcript Levels of Two MYB Factors during *Arabidopsis* Seed Germination." *Plant Journal* 49 (4): 592–606. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02980.x>.

Reyes Silva AI, Morales Dominguez, J.F., H.G. Núñez Palenius, G. Hernández Gúzman, A.G. Alpuche Solís, C. Garcidueñas Piña. 2013. ADNc Relacionados con la maduración del fruto de guayaba (*Psidium guajava* L.). Caracterización y Análisis de expresión. Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Rizzo, W. B. (2015). Fatty Aldehyde and Fatty Alcohol Metabolims: Review and Importance for Epidermal Structure and Function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1841(3), 377–389. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2013.09.001.Fatty>

Rodríguez, Fernando I, Jeffrey J Esch, Anne E Hall, Brad M Binder, G Eric Schaller, and Anthony B Bleecker. 1999. "A Copper Cofactor for the Ethylene Receptor ETR1 from *Arabidopsis*." *Science* 283 (5404): 996–98. <http://www.jstor.org/stable/2897729>.

Rodríguez Y., F. García, E. Silva. 2011. Expresión del gen de la ACC oxidasa en la maduración del fruto de Pitaya (*Stenocereus stellatus* (Pfeiff.) Riccob.) Cactaceae. *Biológicas* 13: 54-58.

Rop, Otakar, Jiri Sochor, Tunde Jurikova, Ondrej Zitka, Helena Skutkova, Jiri Mlcek, Petr Salas, et al. 2011. "Effect of Five Different Stages of Ripening on Chemical Compounds in Medlar (*Mespilus Germanica* L.)." *Molecules* 16 (1): 74–91. <https://doi.org/10.3390/molecules16010074>.

Roswitha, S. and Georg, L. Biochemical and molecular characterization of xyloglucan endotransglucosylase from ripe kiwifruit. 1998. *Planta*. 204. 242-251.

Ross, G. et al. (2009). Analysis of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) gene families in kiwifruit and apple. *Postharvest Biology and Technology*. 51.149-157.

Sakon, J., Irwin, D., Wilson, D. B., & Karplus, P. A. (1997). Structure and mechanism of endo/exocellulase E4 from *Thermomonospora fusca*. *Nature Structural Biology*, 4(10), 810–818. <https://doi.org/10.1038/nsb1097-810>

Salazar Iribe A. y Gamboa de Buen A. (2013). Importancia de las pectinas en la dinámica de la pared celular durante el desarrollo vegetal. *Revista de Educación Bioquímica (REB)*. 32(2). 67-75.

Saucedo-García, M., Guevara-García, A., González-Solís, A., Cruz-García, F., Vázquez-Santana, S., Markham, J. E., Lozano-Rosas, M. G., Dietrich, C. R., Ramos-Vega, M., Cahoon, E. B., & Gavilanes-Ruiz, M. (2011). MPK6, sphingosine and the LCB2a gene from serine palmitoyl transferase are required in the signaling pathway that



mediates cell death induced by long chain bases in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 191(4), 943–957. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03727.x>

Schwab, Rebecca, Javier F. Palatnik, Markus Riester, Carla Schommer, Markus Schmid, and Detlef Weigel. 2005. "Specific Effects of MicroRNAs on the Plant Transcriptome." *Developmental Cell* 8 (4): 517–27. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.01.018>.

Shani Z, Dekel M, Roiz L, Horowitz M, Kolosovski N, Lapidot S, Alkan S, Koltai H, Tsabary G, Goren R, et al: Expression of endo-1,4- $\beta$ -glucanase (*cel1*) in *Arabidopsis thaliana* is associated with plant growth, xylem development and cell wall thickening. *Plant Cell Rep* 2006, V25(10):1067.

Shimosaka T, Makarova KS (2019) Identification of Dephospho-Coenzyme A (Dephospho-CoA) Kinase in *Thermococcus kodakarensis* and Elucidation of the Entire CoA Biosynthesis Pathway in Archaea. *American Society for Microbiology* 10(4):1–14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01146-19>.

SIAP

[http://infosiap.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=240](http://infosiap.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=240), (Última Visita: 3 de Agosto de 2019).

Smith, D. L., & Gross, K. C. (2000). A family of at least seven  $\beta$ -galactosidase genes is expressed during tomato fruit development. *Plant Physiology*, 123(3), 1173–1183. <https://doi.org/10.1104/pp.123.3.1173>

Sun, G. MicroRNAs and their diverse functions in plants. *Plant Mol Biol* 80, 17–36 (2012). <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9817-6>

Sun, Liang, Mei Zhang, Jie Ren, Jianxun Qi, Guojun Zhang, and Ping Leng. 2010. "Reciprocity between Abscisic Acid and Ethylene at the Onset of Berry Ripening and after Harvest." *BMC Plant Biology* 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-257>.

Sunkar, Ramanjulu, Avnish Kapoor, and Jian Kang Zhu. 2006. "Erratum: Posttranscriptional Induction of Two Cu/Zn Superoxide Dismutase Genes in *Arabidopsis* Is Mediated by Downregulation of MiR398 and Important for Oxidative Stress Tolerance (Plant Cell (2006) 18 (2051-2065))." *Plant Cell* 18 (9): 2415. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.180960>.

Tani M, Iida H, & Ito M (2003) O-glycosylation of mucin-like domain retains the neutral ceramidase on the plasma membranes as a type II integral membrane protein. *Journal of Biological Chemistry* 278:10523–10530. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207932200>

Tanhanuch, W., Chantarangsee, M., Maneesan, J., & Ketudat-Cairns, J. (2008). Genomic and expression analysis of glycosyl hydrolase family 35 genes from rice (*Oryza sativa* L.). *BMC Plant Biology*, 8. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-84>

Taron, C. H., Benner, J. S., Hornstra, L. J., & Guthrie, E. P. (1995). A novel  $\beta$ -galactosidase gene isolated from the bacterium *Xanthomonas manihotis* exhibits strong homology to several eukaryotic  $\beta$ -galactosidases. *Glycobiology*, 5(6), 603–610. <https://doi.org/10.1093/glycob/5.6.603>

Trainotti, Livio, Alice Tadiello, and Giorgio Casadoro. 2007. "The Involvement of Auxin in the Ripening of Climacteric Fruits Comes of Age: The Hormone Plays a Role of Its Own and Has an Intense Interplay with Ethylene in Ripening Peaches." *Journal of Experimental Botany* 58 (12): 3299–3308. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm178>.

Tsuzuki, Masayuki, Ryuichi Nishihama, Kimitsune Ishizaki, Yukio Kurihara, Minami Matsui, John L. Bowman, Takayuki Kohchi, Takahiro Hamada, and Yuichiro Watanabe. 2016. "Profiling and Characterization of Small RNAs in the Liverwort, *Marchantia Polymorpha*, Belonging to the First Diverged Land Plants." *Plant and Cell Physiology* 57 (2): 359–72. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv182>.

Uemura, M., & Steponkus, P. L. (1994). A contrast of the plasma membrane lipid composition of oat and rye leaves in relation to freezing tolerance. *Plant Physiology*, 104(2), 479–496. <https://doi.org/10.1104/pp.104.2.479>

Urquía D., Gutierrez B., Pozo G., Pozo MJ., Torres ML. (2021). Origin and dispersion pathways of guava in the Galapagos Islands inferred through genetics and historical records. *Ecology and Evolution*, 11, 15111– 15131. <https://doi.org/10.1002/ece3.8193>

Valenzuela-ri, F., & Morales-quintana, L. (2019). Molecular Insights into FaEG1, a Strawberry Fruit Ripening. *Plants*, 8(140).

Van Casteren, W. H. M., Eimermann, M., van den Broek, L. A. M., Vincken, J.-P., Schols, H. A., & Voragen, A. G. J. (2000). Purification and characterization of a  $\beta$ -galactosidase from *Aspergillus aculeatus* with activity towards (modified) exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. cremoris B39 and B891. *Carbohydrate Research*, 329(1), 75–85. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)00152-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00152-X)

Vera, A et al. 2015. PhD Tesis. Universidad Complutense de Madrid.

Vioque B. and J.C. Fernández-Maculet. 1991. Las peroxidases y la conversión del ácido 1aminociclopropano-1-carboxílico en etileno. Instituto de la Grasa y sus Derivados, Volumen 42. Fasc. 4. 293 -297. Sevilla.

Voinnet, Olivier. 2009. “Origin, Biogenesis, and Activity of Plant MicroRNAs.” *Cell* 136 (4): 669–87. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.046>.

Wang Y, Azhar S, Gandini R, Divne C, Ezcurra I, Aspeborg H (2015) Biochemical characterization of the novel endo- $\beta$ -mannanase AtMan5-2 from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 241:151–163. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.10.002>.

Wang, Yunxiang, Wensheng Li, Hong Chang, Jiahua Zhou, Yunbo Luo, Kaichun Zhang, Jinhua Zuo, and Baogang Wang. 2020. "SRNAome and Transcriptome Analysis Provide Insight into Strawberry Fruit Ripening." *Genomics* 112 (3): 2369–78. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.01.008>.

Warnecke D. and E. Heinz. 2002. Recently discovered functions of glucosylceramides in plants and fungi. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 60. 919-941.

Wei Wei, Chun Yang, Jun Luo, Changmei Lu, Yajun Wu, Sheng Yuan. 2010. Synergism between cucumber  $\alpha$ -expansin, fungal endoglucanase and pectin lyase, *Journal of Plant Physiology*, Vol 167:14, 1204-1210, <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.03.017>.

William W. Wilfinger, Karol Mackey, and Piotr Chomczynski. 1997. Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. *BioTechniques*. 22:3, 474-481

Wu, Juxun, Saisai Zheng, Guizhi Feng, and Hualin Yi. 2016. "Comparative Analysis of MiRNAs and Their Target Transcripts between a Spontaneous Late-Ripening Sweet Orange Mutant and Its Wild-Type Using Small RNA and Degradome Sequencing." *Frontiers in Plant Science* 7 (September): 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01416>.

Wu, Liang, Qingqing Zhang, Huanyu Zhou, Fangrui Ni, Xueying Wu, and Yijun Qi. 2009. "Rice Microrna Effector Complexes and Targets." *Plant Cell* 21 (11): 3421–35. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.070938>.

Xie, Yin-Ge, Yang-Yang Ma, Pin-Pin Bi, Wei Wei, Jie Liu, Yang Hu, Yi-Jie Gou, Dong Zhu, Yingqiang Wen, and Jia-Yue Feng. 2019. "Transcription Factor FvTCP9 Promotes Strawberry Fruit Ripening by Regulating the Biosynthesis of Abscisic Acid and

Anthocyanins.” *Plant Physiology and Biochemistry* 146 (November).  
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.11.004>.

Xin, Chengqi, Wanfei Liu, Qiang Lin, Xiaowei Zhang, Peng Cui, Fusen Li, Guangyu Zhang, et al. 2015. “Profiling MicroRNA Expression during Multi-Staged Date Palm (*Phoenix Dactylifera* L.) Fruit Development.” *Genomics* 105 (4): 242–51.  
<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.01.004>.

Xu, Yuanyuan, Zhe Liu, Lina Lou, and Xiaojun Su. 2018. “Identification of Browning-Related MicroRNAs and Their Targets Reveals Complex MiRNA-Mediated Browning Regulatory Networks in *Luffa Cylindrica*.” *Scientific Reports* 8 (1): 1–16.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-33896-9>.

Yang H, Liu J, Dang M, Zhang B, Li H, Meng R, Qu D, Yang Y, Zhao Z (2018) Analysis of  $\beta$ -galactosidase during fruit development and ripening in two different texture types of apple cultivars. *Frontiers in Plant Science*.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00539>.

Yang, Liyu, Ya Wu, Wenliang Wang, Bigang Mao, Bingran Zhao, and Jianbo Wang. 2017. “Genetic Subtraction Profiling Identifies Candidate MiRNAs Involved in Rice Female Gametophyte Abortion.” *G3: Genes, Genomes, Genetics* 7 (7): 2281–93.  
<https://doi.org/10.1534/g3.117.040808>.

Yang, Tianxiao, Yongyan Wang, Sachin Teotia, Zhaohui Wang, Chaonan Shi, Huwei Sun, Yiyu Gu, Zhanhui Zhang, and Guiliang Tang. 2019. “The Interaction between MiR160 and MiR165/166 in the Control of Leaf Development and Drought Tolerance in *Arabidopsis*.” *Scientific Reports* 9 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39397-7>.

Yaron Sitrit, Joseph Riov and Amos Blumenfeld. 1985. Regulation of Ethylene Biosynthesis in Avocado Fruit during Ripening. *Plant Physiology*. 81, 130-135.

Yashoda, H.M., Prabha, T.N. and Tharanathan, R.N. (2006), Mango ripening: changes in cell wall constituents in relation to textural softening. *J. Sci. Food Agric.*, 86: 713-721. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2404>

Yildiz Y, Hoffmann P, Vom Dahl S, Breiden B, Sandhoff R, Niederau C, Horwitz M, Karlsson S, Filocamo M, Elstein D, Beck M, Sandhoff K, Mengel E, Gonzalez MC, Nöthen MM, Sidransky E, Zimran A, & Mattheisen M (2013) Functional and genetic characterization of the non-lysosomal glucosylceramidase 2 as a modifier for Gaucher disease. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-151>

Yusuf, Noor Hydayaty Md, Wen Dee Ong, Raimi Mohamed Redwan, Mariam Abd Latip, and S Vijay Kumar. 2015. "Discovery of Precursor and Mature MicroRNAs and Their Putative Gene Targets Using High-Throughput Sequencing in Pineapple (*Ananas Comosus* Var. *Comosus*)." *Gene* 571 (1): 71–80. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.06.050>.

Za'mocky' M. and C. Obinger. 2010. Molecular Phylogeny of Heme Peroxidases. Chapter 2. *In: E. Torres and M. Ayala (eds.), Biocatalysis Based on Heme Peroxidases.* Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg.

Zainon MA, Santhi A, Hamid L (1995)  $\beta$ -Galactosidase and Its Significance in Ripening Mango Fruit. *Phytochemistry* 38(5):1109–1114.

Zeiger E. and L. Taiz. 2006. *Fisiología Vegetal Volumen 2.* Publicacions de la Universitat Jaume. USA. Pag: 994 -997.

Zeng, Hou Qing, Yi Yong Zhu, Si Qi Huang, and Zhi Min Yang. 2010. "Analysis of Phosphorus-Deficient Responsive MiRNAs and Cis-Elements from Soybean (*Glycine Max* L.)." *Journal of Plant Physiology* 167 (15): 1289–97.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.04.017>.

Zeng, Shaohua, Yongliang Liu, Lizhu Pan, Alice Hayward, and Ying Wang. 2015. "Identification and Characterization of MiRNAs in Ripening Fruit of *Lycium Barbarum* L. Using High-Throughput Sequencing." *Frontiers in Plant Science* 6 (September): 1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00778>.

Zhang, S., McCarter, J. D., Okamura-Oho, Y., Yaghi, F., Hinek, A., Withers, S. G., & Callahan, J. W. (1994). Kinetic mechanism and characterization of human  $\beta$ -galactosidase precursor secreted by permanently transfected Chinese hamster ovary cells. *Biochemical Journal*, 304(1), 281–288. <https://doi.org/10.1042/bj3040281>

Zhang, Tian, Haosu Tang, Dimitrios Vavylonis, and Daniel J. Cosgrove. 2019. "Disentangling Loosening from Softening: Insights into Primary Cell Wall Structure." *Plant Journal* 100 (6): 1101–17. <https://doi.org/10.1111/tpj.14519>.

Zhang Yu , Yun Ze , Gong Liang , Qu Hongxia , Duan Xuwu, Jiang Yueming and Zhu Hong. 2018. Comparison of miRNA Evolution and Function in Plants and Animals, *MicroRNA*; 7(1) . <https://dx.doi.org/10.2174/2211536607666180126163031>

Zhang, Zhenhai, Jingyin Yu, Daofeng Li, Zuyong Zhang, Fengxia Liu, Xin Zhou, Tao Wang, Yi Ling, and Zhen Su. 2009. "PMRD: Plant MicroRNA Database." *Nucleic Acids Research* 38 (SUPPL.1): 806–13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp818>.

Zhao, Botao, Liangfa Ge, Ruqiang Liang, Wei Li, Kangcheng Ruan, Hongxuan Lin, and Youxin Jin. 2009. "Members of MiR-169 Family Are Induced by High Salinity and Transiently Inhibit the NF-YA Transcription Factor." *BMC Molecular Biology* 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-29>.

Zhou H, Yu Z, Ye Z, Su M (2018) Multiplex analyses of the changes of aromatic compounds

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

during the development of peach fruit using GC–MS and iTRAQ proteomic techniques. *Scientia Horticulturae* 236:96–105. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.03.009>.

Zhu, Qian Hao, Longjiang Fan, Yang Liu, Hao Xu, Danny Llewellyn, and Iain Wilson. 2013. “MiR482 Regulation of NBS-LRR Defense Genes during Fungal Pathogen Infection in Cotton.” *PLoS ONE* 8 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084390>.

Zhu, X., Li, Q., Li, J., Luo, J., Chen, W., & Li, X. (2018). Comparative study of volatile compounds in the fruit of two banana cultivars at different ripening stages. *Molecules*, 23(10). <https://doi.org/10.3390/molecules23102456>

Zinin, A. I., Eneyskaya, E. V, Shabalin, K. A., Kulminskaya, A. A., Shishlyannikov, S. M., & Neustroev, K. N. (2002). 1-O-Acetyl- $\beta$ -d-galactopyranose: a novel substrate for the transglycosylation reaction catalyzed by the  $\beta$ -galactosidase from *Penicillium sp.* *Carbohydrate Research*, 337(7), 635–642. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(02\)00027-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00027-7)



ANEXO A

Mejía-Mendoza et al.  
 Journal of Genetic Engineering and Biotechnology (2022) 20:3  
<https://doi.org/10.1186/s43141-021-00289-x>

Journal of Genetic Engineering  
 and Biotechnology

RESEARCH

Open Access



# Identification in silico and expression analysis of a $\beta$ -1-4-endoglucanase and $\beta$ -galactosidase genes related to ripening in guava fruit

Mario A. Mejía-Mendoza<sup>1</sup>, Cristina Garcidueñas-Piña<sup>1</sup>, José S. Padilla-Ramírez<sup>2</sup>, Ruth E. Soria-Guerra<sup>3</sup> and José Francisco Morales-Domínguez<sup>1\*</sup>

**Abstract**

**Background:** Guava fruit softening is a crucial process during ripening and this process involves a number of enzymes that modifies the cell wall. Two of the enzymes that regulate this process are (a) the  $\beta$ -1, 4-endoglucanase 17 (BEG) which hydrolyze  $\beta$ -1, 4 bonds from cellulose and hemicellulose, and (b)  $\beta$ -galactosidase (BGA) that hydrolyzes pectin chains. Bioinformatics and expression analysis information on these genes is limited in guava fruit.

**Results:** A fragment of a  $\beta$ -1, 4-endoglucanase 17 (*PgE17*), and another of a  $\beta$ -galactosidase (*PgGa1*) were identified. These sequences have a similarity of more than 85% with those reported in the NCBI database. In the guava genome, one homologous sequence was found for *PgE17* in Chr 4 and two homologous to *PgGa1*: one in Chr 3 and the other one in Chr 6. Putative protein PgE17 contains part of the glyco\_hydro\_9 domain. Putative protein PgGa1 has a part of the glyco\_hydro\_35 domain. Phylogenetic analysis of *PgE17* and *PgGa1* revealed that both are highly conserved inside the *Myrtaceae* family. In silico expression analysis showed that both *PgE17* and *PgGa1* work in a coordinated way with other cell wall modifier enzymes. Expression of these genes was found in all the guava samples analyzed. However, the highest expression was found in the fruit in the breaking and ripe states.

**Conclusions:** A  $\beta$ -1, 4-endoglucanase 17, and  $\beta$ -galactosidase 1 sequences were identified. *PgE17* and *PgGa1* are expressed in all the plant tissues, and fruit ripening states. Although, the highest expression was on breaker and ripe states.

**Keywords:** *Psidium guajava*, Cell wall, Expression analysis, Bioinformatic analysis, Cell elongation, Fruit softening

**Background**

The guava plant (*Psidium guajava* L.) belongs to the *Myrtaceae* family, and it grows on tropical and sub-tropical areas around the globe. Guava fruit has important nutritional properties like the high content of C vitamin of approximately 80–100 mg per gram of fruit [1]. Also,

it is rich in tannins, tri-terpenes, flavonoids, saponins, lecithin, potassium, and soluble fiber [2]. In México, the guava fruit is one of the most important crops, and the most cultivated cv is the "media china", which is characterized by its pale pink pulp color, intense sweet flavor, and significant commercial value due to its high demand on food and medicinal products [1]. Recent studies shows that ripening related enzymes and mechanical stresses during post-harvest period alters the cell wall (CW) structure damaging the fruit [3].

\*Correspondence: francisco.morales@edu.usma.mx  
<sup>1</sup>Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA), Av. Universidad, #940, Ciudad Universitaria, CP 20100, Aguascalientes, Aguascalientes, México  
 Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2021. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Due to the climacteric nature of guava fruit, its ripening process is regulated by their breathing levels and ethylene production [4]. Ethylene is the principal auto-catalytic hormone in climacteric fruits, it is responsible for synthesizing ripening related enzymes [5]. Most of these enzymes work together in a coordinated way to modify and degrade complex carbohydrates to simple monosaccharides in the CW [6]. This process alters the firmness of the fruit (softening), as well as its flavor, and fosters the generation of volatile organic compounds (odor) [7].

Fruit softening is mainly achieved by the CW modification, principally in its primary wall pectin and hemicellulose residues [8]. The main enzyme that modify these residues is the  $\beta$ -1,4-endoglucanase (BEG) (EC 3.2.1.4) which hydrolyze  $\beta$ -1,4 bonds from cellulose and hemicellulose [9]. This enzyme acts during the breaker and ripe states of ripening when the pectin bonds are stronger, and many cellulose and hemicellulose residues are free. Another CW modifier enzyme is the  $\beta$ -galactosidase (BGA) (EC 3.2.1.23), which modifies pectin chain structure [10]. This enzyme can be found in three isoforms (I, II, and III), the isoform I is the most related to the ripening process [11]. Its function is to de-ramify pectin chains and the galactans and galactan-pyranoses degradation [10]. Its activity increases during the breaker and ripe ripening periods [12].

In this study, two gene fragments belonging to the *BEG* (*PgE17*) and *BGA* (*PgGa1*) enzymes in guava fruit were identified and characterized. In addition, the in silico and expression analysis of these two gene fragments in different parts of the guava plant (leaves, stem, and root), and

in the green, breaker, ripe, and overripe ripening states of the fruit were performed.

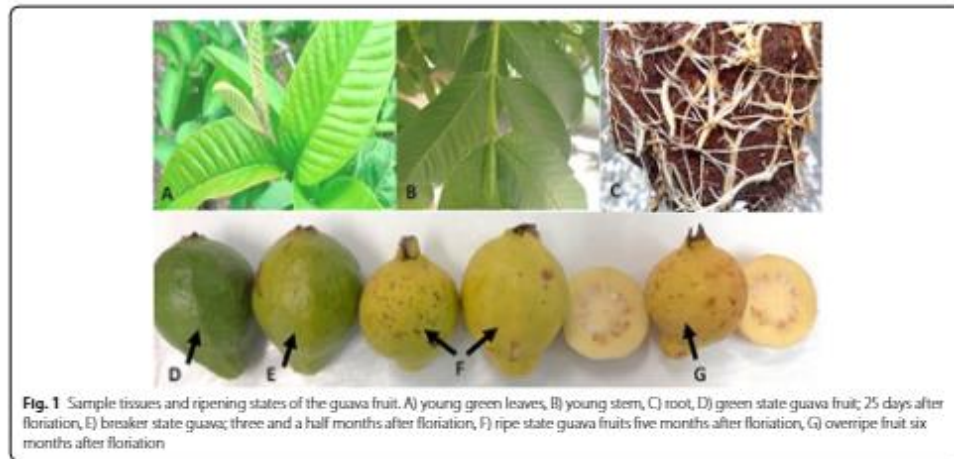
**Methods**

**Plant material**

Samples of young leaves, stem, root, and four ripening states of the fruit: green, breaker, ripe, and over ripe (Fig. 1) were analyzed. They were taken from a guava tree c.v. Calvillo S-XX1 [2], located in the Germplasm Bank from the Experimental Site "Los Cañones", belonging to the INIFAP, in the Huanusco municipality, state of Zacatecas, México (latitude 21°44'43.6 N; longitude 102°58'02.0 W).

**RNA extraction, RT-PCR, and cloning**

Plant material was frozen and powdered with liquid nitrogen, RNA extraction was carried out following the protocol of Doyle and Doyle [13]. cDNA synthesis was performed with the SuperScript® III One-Step RT-PCR with Platinum® Taq kit (ThermoFisher®). Degenerated oligonucleotides were designed by aligning five different BGA and BEG aminoacidic sequences from taxonomic close plants respectively using the CODEHOP-] program from Viral Bioinformatics Research Center (<https://4virology.net/virology-ca-tools/j-codehop/>) [14]. Aminoacidic sequences from *Rhodammia argentea* (XP\_030541685.1 and XP\_030543190.1), *Eucalyptus grandis* (XP\_010049746.2 and XP\_010069895.2), *Syzygium oleosum* (XP\_030443911.1 and XP\_030454903.1), *Quercus suber* (XP\_023914075.1 and XP\_023907247.1), and *Durio zibethinus* (XP\_022732674.1 and XP\_022770876.1), were used to design the oligonucleotides for *PgE17* and *PgGa1*



**Fig. 1** Sample tissues and ripening states of the guava fruit. A) young green leaves, B) young stem, C) root, D) green state guava fruit; 25 days after flowering, E) breaker state guava; three and a half months after flowering, F) ripe state guava fruits five months after flowering, G) overripe fruit six months after flowering

(from *BGA* and *BEG*, respectively). Primers for the *PgE17* were forward: 5'-GACAACACCTTCGGCTgggaya-3', and reverse 5'-GGCCGGCTCGGACTGytrtarc-3'; and for *PgGal*: forward 5'-CAGACCTACGTGTTc-gaaygg-3', and reverse 5'-GAAGTTGGTGCCGCrt-grtcat-3'. The following PCR programs were used to amplify the fragments: 95 °C for 10 min, 35 cycles of 95 °C for 1 min, 56 °C, (for *PgE17*) or 52.4 °C (for *PgGal*) for 40 s and 72 °C for 90 s, and 72 °C for 10 min. A Palm-Cycler® (Corbett Research) thermocycler was used for this process. PCR products were loaded into a 1.5% agarose gel, stained with ethidium bromide, and visualized under UV light. Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®) and pGEM-T Easy Vector Systems kits were used to purify and cloning the desired PCR products.

#### Bioinformatic analysis of the sequences

The obtained sequences were compared with the *Eucalyptus grandis* genome (Accession number: GCA\_016545825.1) and the *P. guajava* genome assembly guava\_v11.23 (Assembly accession number: GCA\_016432845.1) [15] in the NCBI database using both nucleotide and aminoacid sequences by the BLASTn, BLASTp and TBLASTN webtools (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Virtual translation of putative proteins was made using the Translate tool (<https://web.expasy.org/translate/>). The isoelectric point, the instability index; the aliphatic index and the GRAVY value of the putative proteins and their homologous regions found in *BGA* and *BEG* from *E. grandis* were measured with the ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>) [16] from the ExPASy website. The CLUSTAL Ω (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) [17] program was used for developing multiple alignments. Phylogeny analysis was performed with the PAUP4 software using: the distance method with DNA/RNA distances uncorrected p, unweighted least squares, negatives branch lengths in zero, all substitutions to the estimate count, output precision for scores up to 5 decimals, and a bootstrap of 100. Conserved domains and motifs search was performed using *PgE17* and *PgGal* as search templates on the pFAM website (<https://pfam.xfam.org/>) [18]. *BGA* and *BEG* from *E. grandis* were used as a biological model for the co-expression analysis in the STRING platform (<https://string-db.org/>) [19].

#### Expression analysis of *PgE17* and *PgGal*

The expression of *PgE17* and *PgGal* was analyzed in leaf, stem, and root samples, as well as in fruit in the green, breaker, ripe, and overripe stages of ripening. The ribosomal 25S sub-unit gene from *Nicotiana tabacum* leaf was used as a reference gene to measure the relative

expression as described in other works [20, 21]. The green ripening state results were used for data normalization.

The qPCR primers for *PgE17* were forward 5'-GGTACGGTCGTGCTGGTC-3', reverse 5'-GGCGAAGATCCAGTGCTC-3', and for *PgGal*: forward 5'-AAAGGTCACGCAGAAGATAGT-3' and reverse 5'-CTGGTCAAATTCGTTCTCTAT-3'. The qPCR reactions were performed using the Applied Biosystems™ Power SYBR™ Green PCR Master Mix kit, in a 96-well StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) thermocycler. Each reaction was assembled as follows: 10 µl of Power SYBR™ Green PCR Master Mix (2X), 200 ng of cDNA, and 100 nM of forward and reverse primers. The final volume was adjusted to 20 µl using Nuclease-Free Water. The PCR conditions were as follows, initial denaturation at 95 °C for 2 min, followed by 40 cycles of 5 s denaturation at 95 °C, an annealing and extension cycle at 52 °C for 30 s. Gathered data was analyzed using the StepOne™ Real-Time PCR System Software (Applied Biosystems). The relative fold changes in gene expression were calculated by the 2<sup>-ΔΔCt</sup> model.

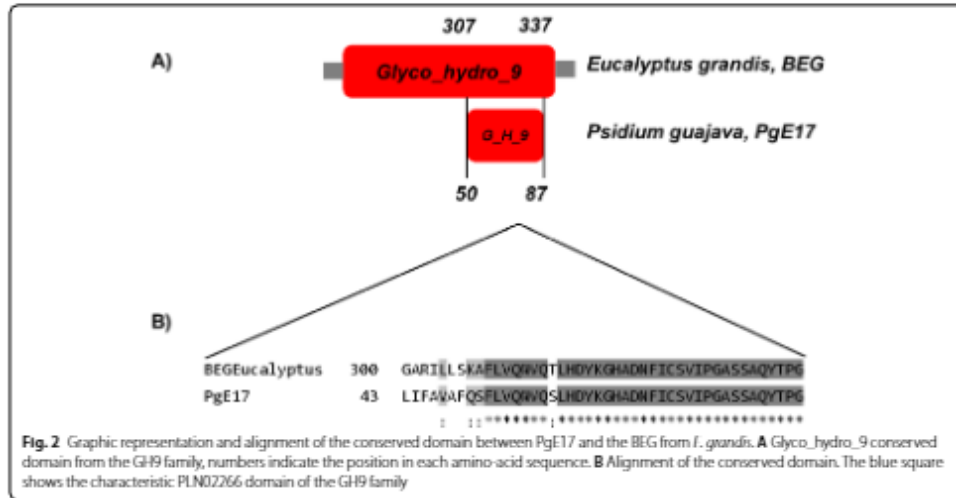
## Results

### Bioinformatic analysis

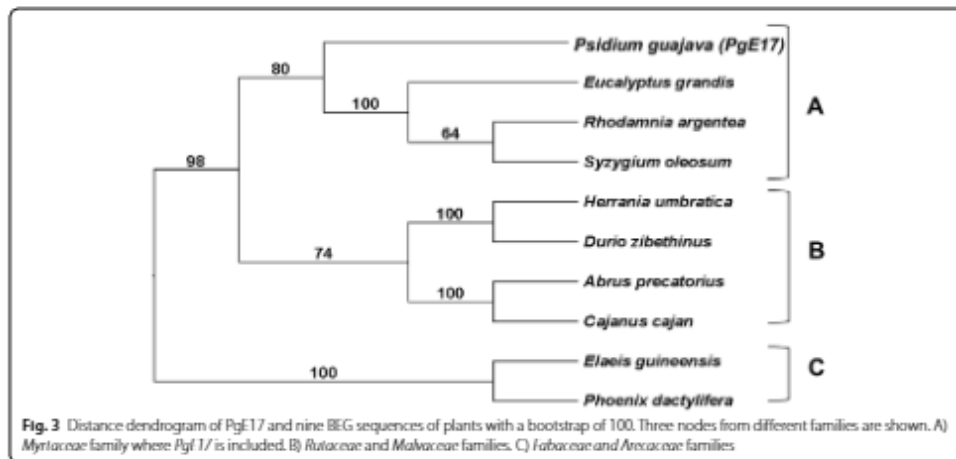
A 331 nt sequence for *PgE17* and a putative translation protein sequence of 109 aa were obtained. The blastn and blastp analysis showed 91% similarity with several sequences reported in the NCBI data bases (Supplementary Figure 1). In *E. grandis* genome was found three *PgE17* homologous genes localized on chromosomes (Chr) 2, 4, and 8 (Supplementary Figure 2) with 89, 50, and 35% of similarity respectively (Supplementary Table 1). Likewise in the *P. guajava* genome there are one homologous sequence localized in the Chr 4 (9,959,984 to 9,960,316 nucleotide; Supplementary Figure 3) with a 98% identity (Supplementary Table 3).

*PgE17* aa sequence possesses part of the conserved domain Glyco\_hydro\_9, also present in the *BEG* from *E. grandis* and *P. guajava* (Fig. 2). The phylogenetic analysis (Fig. 3) revealed that multiple significant differences exist between the 10 *BEG* aa sequences from different plants.

For *PgGal*, a 750-nt-long sequence and 249 aa for its virtual translation were obtained. The blastn and blastp similitude analysis with *BGA* aa sequences from other plants showed an average similarity of 95%. With *Rhodamnia argentea*, *Syzygium oleosum*, and *E. grandis* the similarity was 98%, the highest obtained (Supplementary Figure 3). The similarity analysis of *PgGal* (Supplementary Figure 4) showed sequences with 71 and 92% of similitude in Chr 1, 3, 4, 6, 7, and 9 of *E. grandis* genome. However, a sequence found in the Chr 10 exhibited the



**Fig. 2** Graphic representation and alignment of the conserved domain between PgE17 and the BEG from *E. grandis*. **A** Glyco\_hydro\_9 conserved domain from the GH9 family, numbers indicate the position in each amino-acid sequence. **B** Alignment of the conserved domain. The blue square shows the characteristic PLN02266 domain of the GH9 family



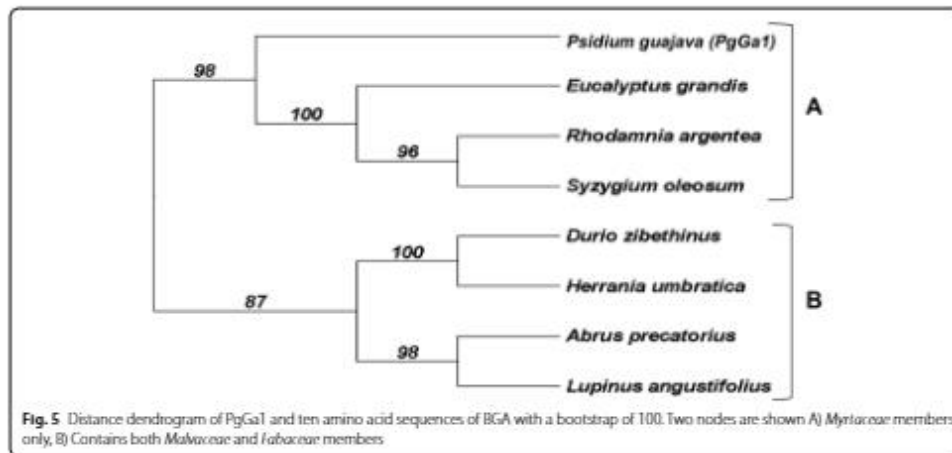
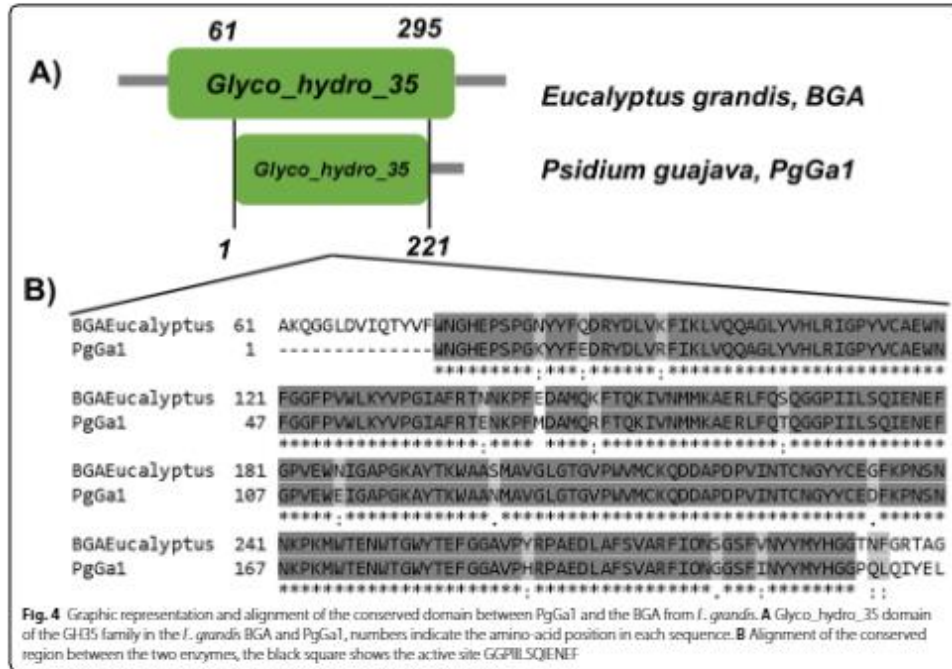
**Fig. 3** Distance dendrogram of PgE17 and nine BEG sequences of plants with a bootstrap of 100. Three nodes from different families are shown. **A**) Myrtaceae family where *Ptyl 1/* is included. **B**) Rutaceae and Malvaceae families. **C**) Fabaceae and Araceae families

highest similarity with PgGa1 with 98.2% (Supplementary Table 2).

Furthermore, PgGa1 blastn analysis on the *P. guajava* genome founded one identical sequence and one similar sequence on the Chr 6 and 3 respectively (Supplementary Figure 4). Identical sequence found in the Chr 6 is located between the nucleotides 38,077,142 to 38,077,288 and has a 100% identity with PgGa1 (Supplementary Table 4). On the other hand, Chr 3 sequence was from

nucleotide 7,575,108 to 7,575,192 and has 83.53% identity with PgGa1 (Supplementary Table 4).

In the putative aa sequence of PgGa1, the Glyco\_Hydro\_35 conserved domain was found, which is exclusive to the BGA and enzymes belonging to the family 35 of glycosyl hydrolases (GH35) [19]. This conserved domain is located between the 29 and 335 aa residue positions in the BGA of *E. grandis* (Fig. 4). PgGa1 also contains the putative active site GGPIILSQIENEF



**Table 1** Parametric values of putative proteins PgE17, PgGa1 from *P. guajava*, BEG, and BGA from *E. grandis* and its conserved regions

Protein	Theoretical pI	GRAVY	Aliphatic index	Instability index	Length (aa)
$\beta$ -1,4-endoglucanase 17 conserved region from <i>E. grandis</i>	7.12	-0.020	86.85	17.40	108
Conserved region in Chr 4 of <i>P. guajava</i> genome	6.28	0.274	94.55	37.89	101
PgE17	6.25	0.344	96.57	40.15	108
$\beta$ -galactosidase 1 conserved region from <i>E. grandis</i>	5.95	-0.336	62.79	33.68	247
Conserved region in Chr 6 of <i>P. guajava</i> genome	6.18	-0.298	65.49	31.20	204
PgGa1	5.54	-0.476	63.16	38.72	248

pI Isoelectric point, GRAVY grand average of hydropathicity

(Fig. 4, black square). The phylogenetic analysis revealed a minimal node formation and situated PgGa1 inside the *Myrtaceae* family (Fig. 5).

The parametric values showed in Table 1 were used to compare the physicochemical properties of the putative proteins of PgE17 and PgGa1 of *P. guajava* with the respective *E. grandis* proteins found in the database, both the complete protein and the corresponding conserved region.

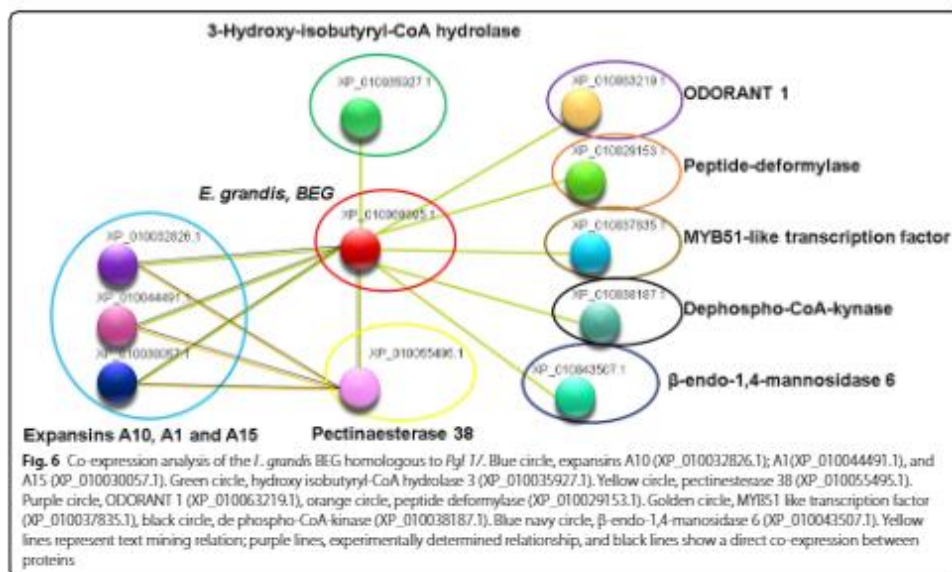
**In silico co-expression analysis of BGA and BEG**

In silico co-expression analysis of PgE17 displayed a direct relationship with CW modifiers proteins and proteins related to the synthesis metabolic pathways of aromatic compounds during the ripening process. CW modifiers proteins were three expansins, a  $\beta$ -endo-1,4-mannosidase,

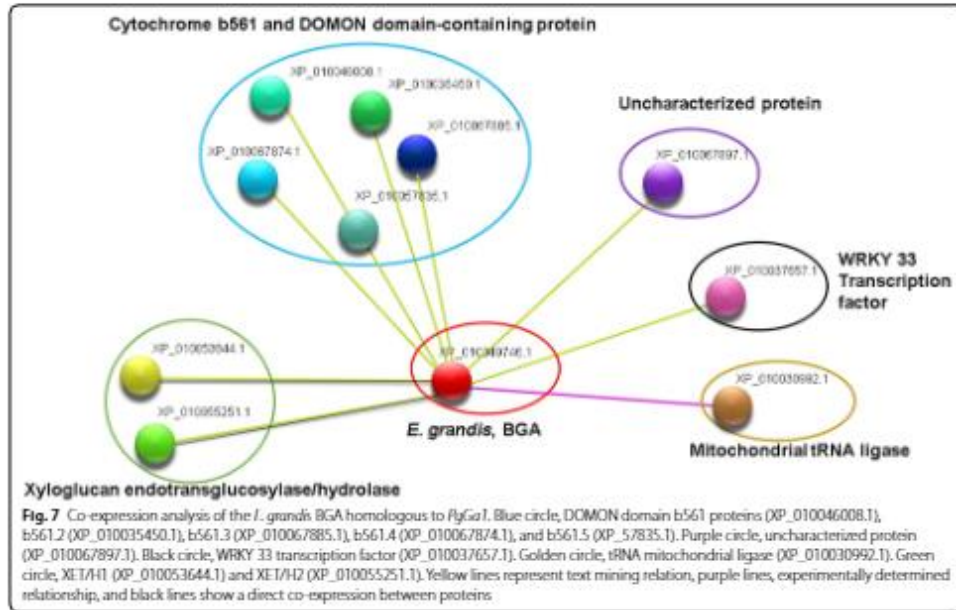
and a pectinesterase. Besides, the aromatic compounds synthesis related were: a peptide deformylase, a de-phospho-CoA-kinase, a hydroxy-isobutyryl-CoA hydrolase, and a MYB51-like transcription factor (Fig. 6). In silico co-expression analysis for PgGa1 (Fig. 7) showed the association with CW elongation enzymes during ripening such as two xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XET/H) and to others that are indirectly related to the ripening process such as the DOMON-domain proteins from the b561 cytochrome, WRKY transcription factor, and a tRNA ligase.

**Expression analysis**

qPCR analysis for PgE17 exhibited a higher expression on the breaker state in fruit, equivalent to 50 times more than in the green state. PgE17 expression was between



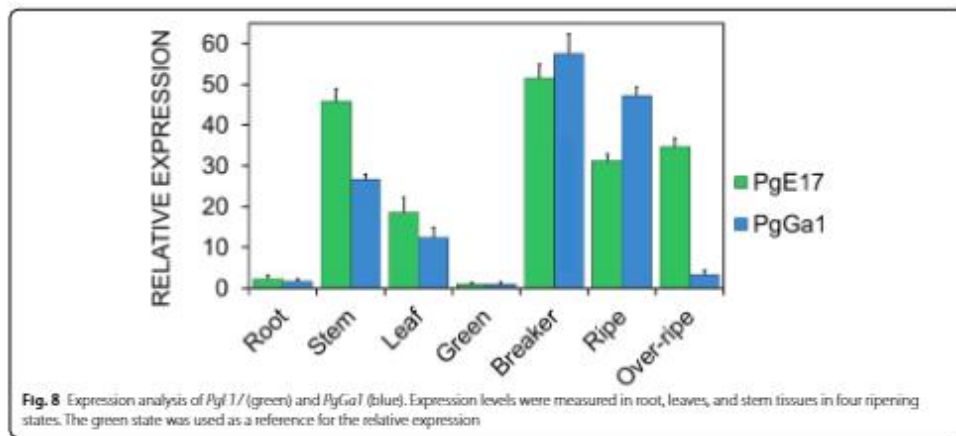
**Fig. 6** Co-expression analysis of the *E. grandis* BEG homologous to Pyl 17. Blue circle, expansins A10 (XP\_010032826.1); A1 (XP\_010044491.1), and A15 (XP\_010030057.1). Green circle, hydroxy isobutyryl-CoA hydrolase 3 (XP\_010035927.1). Yellow circle, pectinesterase 38 (XP\_010055490.1). Purple circle, ODORANT 1 (XP\_010005219.1), orange circle, peptide deformylase (XP\_010029153.1). Golden circle, MYB51 like transcription factor (XP\_010057935.1), black circle, de phospho-CoA-kinase (XP\_010038187.1). Blue navy circle,  $\beta$ -endo-1,4-mannosidase 6 (XP\_010043507.1). Yellow lines represent text mining relation; purple lines, experimentally determined relationship, and black lines show a direct co-expression between proteins



15 and 20 times lower in ripe and over ripe fruits than breaker fruit (Fig. 8), the expression in the root was the lowest, with about 45 times lower than the breaker. Meanwhile, the expression of *PgE17* in stem was 40–45 times higher than the green fruit, being the second

higher value. The expression of *BEG* in leaf was between 18 and 20 more times than in green fruit, the second lowest after root.

For *PgGa1* (Fig. 8), the highest expression was found in the breaker and ripe states, with 55 and 45 times more



than in the green state, respectively. On the other hand, *PgGal* expression in the over ripe state was 50 times lower than the ripe fruit. This is the lowest expression of all fruit states, and second lowest of all tissues, only two to three times higher than the expression observed in root. Expression levels in leaves and stem were between 20 to 30 times lower than in fruit, but higher than root; tissue in which expression was null.

### Discussion

Fruit ripening is mainly due to two different metabolic events: starch degradation and cell wall modification [22]. Referring to cell wall compounds, pectin polymers are responsible for the firmness in green fruits and their degradation during the ripening process leads to the softening of the fruit [12]. Like many fruits, guava fruit suffers from these process, several studies have been carried out on the enzymatic activity of both carbohydrate metabolism and the cell wall. The ability to modify the cell wall depends on the type of fruit and in many cases is not related to the softening rate, nor does it depend on the enzymes themselves [22].

There are several works in the literature about the enzymatic activity related to the ripening of the guava fruit, but there are few related to the expression of genes of *BEG* and *BGA*. Therefore, this work focuses on the identification and bioinformatic analysis and expression study in different organs of the guava plant and its comparison with the enzymatic activity reported in the literature.

The aa sequence of *PgE17* contained a conserved region of the Glyco\_hydro\_9 domain belongs to the family 9 of the glycosylhydrolases (GH9) that modifies the CW indirectly [23], and also contains a high number of contiguous hydrophobic aa that helps shape its tridimensional structure, which is a general characteristic between the *BEG* enzymes [24].

Physicochemical properties show that *PgE17* has different characteristics than the *BEG* of *E. grandis* and similar characteristics of the *BEG* of *P. guajava* [15]. The pI value, which is the pH at which the proteins have no electrical charge, was acidic for *PgE17*, while it was basic for *E. grandis* *BEG* (Table 1). The GRAVY value allows proteins to be classified as hydrophobic, if the value is positive, or as hydrophilic, if the value is negative. Based on the GRAVY values obtained (Table 1), the *PgE17* sequence can be considered hydrophobic, like the transmembrane proteins. In contrast, both *E. grandis* *BEG* sequences can be considered hydrophilic proteins. The instability index measures the stability of the protein in water, and proteins are considered stable if this index is less than 40. Therefore, the instability index reveal that *PgE17* is unstable, while the conserved region of *BEG* from *E. grandis* and *P. guajava* genome are stable

(Table 1). These differences can be attributed to the fact that the aa sequence of the proteins of this family differs from one species to another [23]. The only value consistent across the different sequences was the aliphatic index. This parameter measures the volume occupied by the aliphatic side chains and it is indicative of thermostability, proteins with a high value are stable in a wide temperature range [16]. *PgE17*, the conserved region of *BEG*, and the complete *BEG* protein have large aliphatic index values, revealing their thermostability (Table 1). The aliphatic index of *PgE17* was higher than that of the conserved region of *BEG* and that of the full *BEG* protein from *E. grandis* (Table 1), indicating that *PgE17* is more thermostable.

Phylogenetic differences between 10 *BEG* from plants including *PgE17* were previously described by Jara and Castro [24], which they establish multiple differences between the amino acid sequences in *BEG* genes inside the GH9 family, which is derived from divergent evolution.

The *PgGal* sequence has similitude with a one sequence of the Chr 10 of *E. grandis* corresponding to *BGA* and with *BGA P. guajava* [15]. *BGA* has been found in *Rhodamnia argentea*, *Syzygium oleosum*, and *E. grandis*, all of them members of the *Myrtaceae* family. Glyco\_hydro\_35 domain found in *PgGal* changes the typical configuration of *BGA* to  $\beta$ -anomeric [25], allowing the hydrolyzation of the bond between galactose and glucose [26]. On the *BGA* enzymes active site GGPIILS-QIENEF, is located right after the signal peptide, inside the N-terminal region [25] and acts in the p-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosides and 1,4- $\beta$ -D-galactans residues from the CW modifications [27, 28].

Parametric analysis showed all sequences analyzed have similar values (Table 1). For example, the negative GRAVY values suggest that are hydrophilic, with a higher probability of being globular. These results, together with the similarity found in the phylogenetic analysis, support the idea that the proteins of this family are conserved in the different species [25].

Low diversification of nodes in the phylogenetic tree indicates that aa sequences of *BGA* are highly conserved between and inside plant species. A similar phylogeny with a low number of nodes of this protein was described by Smith and Gross [29] and explained by Tanthanuch et al. [25], who mentions that the *BGA* gene in plants has suffered a minimal number of evolutionary changes since the divergence of plants and animals.

*PgE17* co-expressed with several CW modifiers proteins, relates to ripening in the following ways: the expansins hydrolyze the hydrogen bonds from cellulose and hemicellulose, causing the CW expansion [30]; also there is evidence of their high expression on guava fruits



[31]. The  $\beta$ -endo-1,4-mannosidase hydrolyze the  $\beta$ -1,4 intern bonds of mannose chains from the CW producing the characteristically softening during ripening [32]. Pectinesterase 38 de ramify homogalacturonan chains from the CW releasing hemicellulose and cellulose residues, boosting the softening of the fruit [3]. Peptide deformylase hydrolyses the N-formyl groups from immature protein sequences from chloroplast in plants [33]; malfunction of this enzyme causes the accumulation of misfolded proteins and chlorosis, resulting in bad development and malformation of the plant tissues, including the fruit [34]. The de-phospho-CoA-kinase removes phosphate groups from the phosphorylated CoA groups for the biosynthesis of the A-Coenzyme, which is essential for plant gas exchange during ripening of the fruit [35]. The MYB51-like transcription factor related to the ripening process is significant because it acts as a callose transporter to the CW [36]. Increasing callose concentrations in the CW and phloem have been observed during the ripening of grapefruit (*Vitis vinifera*) [37]. Regarding aromatic compounds, it has been observed that hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase takes part in their synthesis during the ripening of peach fruit (*Prunus persica* cv. Huijiingmilu) [38]; as well as for the biosynthesis of fat acids [39], which have been related to the ripening of the olive fruit (*Olea europea* cv. Picual) [40, 41]. The ODOR-ANTI1 factor, together with the EOBII transcription factor regulates the production of aromatic compounds in flowers and during the ripening of some fruits like tomato (*Solanum lycopersicum*), strawberry (*Fragaria vesca*), and the blueberry (*Vaccinium corymbosum*) [42].

*PgGal* co-expresses with ripening involved proteins such as, XET/H enzymes that induce hydrolysis or addition of xyloglucan chains to the CW, giving extensibility to the cell, which is a necessary process for ripening [43]. Furthermore, *PgGal* is indirectly related to ripening proteins, like those with the DOMON-domain b561, which catalyzes the electrons trans-membranal transport, and the ascorbate regeneration [44]. This could be related to the high amount of C vitamin in the guava fruit [1]. WRKY and RAP2 transcription factors has been observed to act altogether in cellular signaling processes and abiotic and biotic stress responses in guava fruit [45, 46]. High tRNA-met expression levels has been found during the ripening of the palm fruit (*Phoenix dactylifera*) and tomato [47]. Methionine is the main precursor of ethylene, an essential compound in climacteric fruit ripening [48].

The expression analysis of *PgE17* showed a high expression in the breaker period and is could be due because in this state there is an increasing rate of growing and development of the fruit, and the rupture of

large amounts of  $\beta$ -1,4 bonds from hemicellulose is necessary, in which BEG enzymes are involved [49]. Similar results were described by Carey et al., who found high BEG expression levels in tomato fruit in the breaker state [28]. Besides, the decrease in the subsequent states (ripe and over ripe) is caused by the previous accumulation of BEG which caused a depletion of its substrate [50]. This was confirmed in tomato fruit and strawberry by measuring the expression and quantity of BEG enzymes during the breaker, ripe and overripe states, resulting in high concentrations of BEG enzyme during the breaker state and a decrease in its activity in the ripe period [51, 52]. And the other hand, the low expression of *PgE17* in root concurs with Buchanan et al. [9], who demonstrated in sorghum (*Sorghum bicolor*), maize (*Zea mays*), rice (*Oryza sativa*), and some pasture (*Brachypodium* sp.), that BEG expression levels depend on the specie and type of root, among which the root does not need significant modifications on its CW. *PgE17* expression in stem and leaves is high due to their constant growth and development rate, BEG enzymes participate in the rearrangement of these structures [50].

In *PgGal* the high expression on breaker and ripe state maybe due to the onset of fruit softening in this period, and so it requires the de ramification of pectin chains that gives support and stiffness to the CW [3, 10]. These events have been seen in the enzymatic activity of BGA in these states generates a constant amount of hemicellulose residues [6, 53], which is related to the high expression of *PgE17* found in braker state. This theory is confirmed by Zainon et al. [11], who analyzed the BGA and BEG activity and substrate in mango fruit (*Mangifera indica* cv. Harumanis), proved that in the breaker and ripe states the decrease in pectin chains caused by BGA enzymes resulted in a reduction of hemicellulose chains due to BEG activity. Significant decrease of *PgGal* expression in the over ripe state is because it is limited to the pectin available chains [10]. The last ripening state exhibits a low quantity of these chains due the action of other enzymes, such as pectinesterases [3] and polygalacturonases [53] that act in response to the massive release of pectin residues caused by BGA. Together, these results indicate that BGA high expression plays a key role in the CW degradation, process which have been established as an essential contributor of the softening of the fruit during ripening [15].

The low expression of BGA observed in stem, leaves and roots, suggests that the CW of these tissues does not need significant modifications. Similar results were reported in apple (*Malus domestica*) [54].

**Conclusion**

Two gene partial sequences were identified in the guava plant: *PgEI7* and *PgGa1*. Bioinformatic analysis showed that *PgEI7* belongs to a *BEG*, and *PgGa1* to a *BGA* gene, and that they have homologous in the *Myrtaceae* family. The qPCR analysis revealed that the expression of both genes increases in the breaker and ripe stages, which demonstrates the importance of these enzymes in the softening and ripening processes of the fruit.

**Abbreviations**

CW: Cell wall; BEG:  $\beta$  1,4 endoglucanase; BGA:  $\beta$  galactosidase; IANBAMA: Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola y Ambiental; IPICYT: Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica; GH9: Family 9 of the glycosylhydrolases; F. grandis: *F. grandis*; GH5: Family 35 of glycosyl hydrolases; XI 1/E: Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase; tRNA<sup>met</sup>: tRNA methionine.

**Supplementary Information**

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00789-x>.

**Additional file 1.**

**Acknowledgements**

The authors gratefully acknowledge the financial support by the Universidad Autónoma de Aguascalientes, under project grant number PIB17/1, the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the awarded scholarship under the program "Doctorado en Ciencias Biológicas" number 001651, and special thanks to the PhD. Roberto Rico Martínez for taking the time to review this paper. The "Cahillo Siglo XXI" is a local guava variety from Calvillo, Aguascalientes, México that has been registered on the Mexican Catalog for Vegetal Varieties under the register number: GUA 005 160/09.

**Authors' contributions**

Mejía-Mendoza, Garcidueñas Pina, Padilla Ramírez, Soría Gaona, and Morales Domínguez have equally contributed to the research work of the current article. All authors have read and approved the manuscript.

**Funding**

Financial support was provided by the Autonomous University of Aguascalientes, under project grant number PIB17/1.

**Availability of data and materials**

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are not available, only the sequences in the GenBank accessions, but are available from the corresponding author on reasonable request.

**Declarations**

**Ethics approval and consent to participate**

Not applicable.

**Consent of publication**

Not applicable.

**Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

**Author details**

<sup>1</sup>Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA), Av. Universidad, #940, Ciudad Universitaria, C.P. 20100, Aguascalientes, Aguascalientes, México. <sup>2</sup>Instituto Nacional

de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Pabellón, KM 32.5, Carretera Aguascalientes-Zacatecas, C.P. 20660 Pabellón de Arteaga, Aguascalientes, Aqs, México. <sup>3</sup>Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP), Av. Dr. Manuel Nava No. 6 /Zona Universitaria, C.P. 87100 San Luis Potosí, S.L.P., México.

Received: 10 June 2021 Accepted: 13 December 2021

Published online: 03 January 2022

**References**

1. Padilla Ramírez JS, Gorutlev-Gaona I, Rodríguez Moreno VM, Cortés-Penaagos CJ, Sánchez-Rico I (2014) Caracterización morfológica y bioquímica de frutos de guayaba, 1st edn. Sagarpa/Infap, México
2. Padilla Ramírez JS, Gorutlev-Gaona I, de la Cruz MA P (2010) Nuevas variedades de guayaba (*Psidium guajava* L.), 1st edn. INIAP-CIRNOC. Campo Experimental Pabellón, México
3. Cosgrove DJ (2016) Plant cell wall extensibility: Connecting plant cell growth with cell wall structure, mechanics, and the action of wall modifying enzymes. *J Exp Bot* 67(7):463–476. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv511>
4. Dolkar D, Baleshi P, Gupta M, Wali V, Kumar R, Havanika I, Kher D (2017) Biochemical changes in guava (*Psidium guajava*) fruits during different stages of ripening. *Indian J Agric Sci* 87:257–260
5. Jain N, Dhawan K, Malhotra SP, Siddiqui S, Singh R (2001) Compositional and enzymatic changes in guava (*Psidium guajava* L.) fruits during ripening. *Acta Physiol Plant* 23(3):357–367. <https://doi.org/10.1007/s11738-001-0044-7>
6. Franková I, Fry SC (2013) Biochemistry and physiological roles of enzymes that 'cut and paste' plant cell wall polysaccharides. *J Exp Bot* 64(12):3519–3550. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert201>
7. Rizzo WB (2015) Fatty Aldehyde and Fatty Alcohol Metabolism: Review and Importance for Epidermal Structure and Function. *Biochim Biophys Acta* 1841(3):377–389. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.09.001>
8. Zhang J, Tang H, Vaylonsis D, Cosgrove DJ (2019) Disentangling loosening from softening: Insights into primary cell wall structure. *Plant J* 100(6):1101–1117. <https://doi.org/10.1111/tpj.14519>
9. Buchanan M, Burton RA, Dhugga KS, Rakabki AJ, Tingey SV, Shirley NJ, Fincher GB (2017) Endo (1,4)  $\beta$  Galactanase gene families in the grasses: temporal and spatial Co-transcription of orthologous genes. *BMC Plant Biol*. <https://doi.org/10.1186/s12871-017-2229-12-235>
10. Nakamura A, Maeda H, Mizuno M, Koshi Y, Nagamatsu Y (2003)  $\beta$  Galactosidase and Its Significance in Ripening of 'Satsumi' Japanese Persimmon Fruit. *Biosci Biotechnol Biochem* 67(1):68–76. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.68>
11. Zaiton MA, Santhi A, Hamid I (1995)  $\beta$  Galactosidase and Its Significance in Ripening Mango Fruit. *Phytochemistry* 38(5):1109–1114
12. Braga MA, Marques TR, Simão AA, Botelho INS, Oliveira LS, Abreu CMP (2018) Mechanism of firmness loss in guava cv. Pedro Sato during ripening at room temperature. *Food Sci Technol* 38(1):26–32. <https://doi.org/10.1590/1678-452x.35416>
13. Doyle JJ, Doyle J (1990) Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. *Focus* 12(1):13–15
14. Boyce R (2009) iCODHOP: a new interactive program for designing Consensus Divergent Hybrid Oligonucleotide Primers from multiply aligned protein sequences. *Nucleic Acids Res* 37:222–228
15. Feng C, Feng C, Lin X, Liu S, Li Y, Kang M (2021) A chromosome-level genome assembly provides insights into ascorbic acid accumulation and fruit softening in guava (*Psidium guajava*). *Plant Biotechnol J* 19(4):717–730. <https://doi.org/10.1111/pxb.13498>
16. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: Walker JM (ed) *The Proteomics Protocols Handbook*. Humana Press
17. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Soding J, Thompson JD, Higgins DG (2011) Fast, scalable generation of high quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 7:539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
18. Mistry J (2007) Predicting active site residue annotations in the Pfam database. *BMC Bioinformatics* 8:298. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-298>

19. Söhlaczyk D, Gable AJ, Lyon DJ, Junge A, Wyder S, Huerta Cepas J, Simonovic M, Doncheva NI, Morris JH, Bork P, Jensen LJ, von Mering C (2019) STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res*. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>

20. Campos MD, Frederico AM, Nothnagel I, Amholdt-Schmitt B, Cardoso H (2015) Selection of suitable reference genes for reverse transcription quantitative real-time PCR studies on different experimental systems from carrot (*Daucus carota* L.). *Sci Hortic* 186:115–123. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.12.038>

21. Iskandar HM, Simpson RS, Casu RE, Bonnett GD, Maclean DJ, Mannes JM (2004) Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane. *Plant Mol Biol Report* 22:325–337. <https://doi.org/10.1007/BF02772676>

22. Davies G, Henrissat B (1995) Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3(9):853–859. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(01\)00270-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(01)00270-9)

23. Jara K, Castro R, Ramos P, Parra Palma C, Valenzuela Rillo J, Morales Quintana I (2019) Molecular Insights into FaG1, a Strawberry Endo-galactanase Enzyme Expressed during Strawberry Fruit Ripening. *Plants (Basel, Switzerland)* 8(6):140. <https://doi.org/10.3390/plants8060140>

24. Zinay AI, Enyuskaya IV, Shabalina KA, Kulinskaya AM, Shishlyan nikov SM, Nesturov RN (2002) 1-O-Acetyl- $\beta$ -D-galactopyranose: a novel substrate for the transglycosylation reaction catalyzed by the  $\beta$ -galactosidase from *Penicillium* sp. *Carbohydr Res* 337(7):635–642. [https://doi.org/10.1016/S0008-6715\(02\)00077-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6715(02)00077-7)

25. Iantehuch W, Chantarengsoe M, Manresan J, Ketudat Cairns J (2008) Genomic and expression analysis of glycosyl hydrolase family 35 genes from rice (*Oryza sativa* L.). *BMC Plant Biol*. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-84>

26. Jones DJ, Matthews BW, Huber R (2012) Lac/  $\beta$ -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. *Protein Sci* 21(12):1797–1807. <https://doi.org/10.1002/pro.2165>

27. Carey AJ, Holt K, Picard S, Wilde R, Tucker CA, Bard CR, Schuch W, Seymour CB, Macrae EA (1995) Tomato Endo- $\beta$ -1,4-Galactanase (Isolation, Changes during Ripening in Normal and Mutant Tomato Fruit, and Characterization of a Related cDNA Clone). *Plant Physiol* 108(3):1099–1107. <https://doi.org/10.1104/pp.108.3.1099>

28. Smith DJ, Gross KC (2000) A family of at least seven  $\beta$ -galactosidase genes is expressed during tomato fruit development. *Plant Physiol* 123(3):1173–1183. <https://doi.org/10.1104/pp.123.3.1173>

29. Fukuda H (2014) Plant cell wall patterning and cell shape. Wiley Blackwell, Japan

30. Reyes Silva AI, Nájera Palencia HG, Hernández Guzmán G, Alpuche-Solis AG, Garcidueñas Pina C, Morales Domínguez JF (2013) ADN: relaciones con la maduración del fruto de guayaba (*Psidium guajava* L.): Caracterización y análisis de expresión. *Rev Fitotec Mex* 36(2):117–125

31. Wang Y, Ahar S, Gandini R, Divine C, Ferrara I, Aspeborg H (2015) Biochemical characterization of the novel endo- $\beta$ -mannanase A1Man2-2 from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 241:151–163. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.10.002>

32. Hou CX, Dink IMA, Pattanasak S, Das NC, Matti B, Houtz RI, Williams MA (2007) Plant peptide deformylase: A novel selectable marker and herbicide target based on essential co-translational chloroplast protein processing. *Plant Biotechnol J* 5(7):775–781. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00238.x>

33. Hou CX, Dink IMA, Williams MA (2004) Inhibition of peptide deformylase in *Nicotiana tabacum* leads to decreased D1 protein accumulation, ultimately resulting in a reduction of photosystem II complexes. *Am J Bot* 91(9):1304–1311. <https://doi.org/10.1007/s12151-004-9130-4>

34. Shimosaka I, Makarova KS (2019) Identification of Dephospho-Coenzyme A (Dephospho-CoA) Kinase in *Thermococcus kodakarensis* and elucidation of the Entire CoA Biosynthesis Pathway in Archaea. *Am Soc Microbiol* 10(8):1–14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01146-19>

35. Bondada B (2014) Structural and compositional characterization of suppression of uniform ripening in grapevine: A paradoxical ripening disorder of grape berries with no known causative clues. *J Am Soc Hortic Sci* 139(5):567–581. <https://doi.org/10.21273/jash.139.5.567>

36. Bondada B, Harbertson E, Sheestha PM, Keller M (2017) Temporal extension of ripening beyond its physiological limits imposes physical and osmotic challenges perturbing metabolism in grape (*Vitis vinifera* L.) berries. *Sci Hortic* 219:135–143. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.03.002>

37. Zhou H, Yu Z, Ye Z, Su M (2018) Multiplex analyses of the changes of aromatic compounds during the development of peach fruit using GC-MS and iTRAQ proteomic techniques. *Sci Hortic* 236:96–105. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.03.009>

38. Liang Y, Yuan Y, Liu J, Mao W, Cheng Y, Li D (2014) Identification and computational annotation of genes differentially expressed in pulp development of *Cocos nucifera* L. by suppression subtractive hybridization. *BMC Plant Biol* 14:205. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0205-7>

39. Inés C, Parra Lobato MC, Paredes MA, Labrador J, Gallardo M, Saucedo García M, Gavilanes Ruiz M, Gómez Jiménez MC (2018) Sphingolipid distribution, content and gene expression during olive fruit development and ripening. *Front Plant Sci* 9:1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00028>

40. Parra Lobato MC, Paredes MA, Labrador J, Saucedo García M, Gavilanes Ruiz M, Gómez Jiménez MC (2017) Localization of sphingolipid enriched plasma membrane regions and long chain base composition during mature fruit abscission in olive. *Front Plant Sci* 8:1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01118>

41. Colquhoun IA, Schwietzman MI, Gilbert JJ, Jaworski JA, Langer KM, Jones CR, Rushing GV, Hunter IM, Olmstead J, Clark DG, Follis KM (2013) Light modulation of volatile organic compounds from petunia flowers and selects fruits. *Postharvest Biol Technol* 86:37–44. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.06.013>

42. Miedes F, Zama L, Hoson I, Herbers K, Sonnwald U, Lorenz FP (2011) Xyloglucan endotransglucosylase and cell wall extensibility. *J Plant Physiol* 168(3):196–203. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.06.079>

43. Ifigenia M, Krulmans J, Karolita A, Davey M (2012) Regulation of fruit ascorbic acid concentrations during ripening in high and low vitamin C tomato cultivars. *BMC Plant Biol* 12:239. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-239>

44. Phuikan U, Jeena GS, Shukla RK (2016) WRKY transcription factors: Molecular regulation and stress responses in plants. *Front Plant Sci*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00760>

45. Cheng MN, Huang ZJ, Hua QJ, Shan W, Kuang J, Lu WJ, Qin YH, Chen JY (2017) The WRKY transcription factor HqWRKY44 regulates CytP450 like-1 expression in red pitaya fruit (*Hylococcus polyrhizus*). *Hortic Res*. <https://doi.org/10.1038/hortres.2017.39>

46. Marcondes C, Gehring C, Thomas I (2014) Dynamic changes in the date palm fruit proteome during development and ripening. *Hortic Res*. <https://doi.org/10.1038/hortres.2014.39>

47. Liu M, Perello J, Chervin C, Rouslan JF, Bouayzen M (2015) Ethylene control of fruit ripening: Revisiting the complex network of transcriptional regulation. *Plant Physiol* 169(4):2380–2390. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01361>

48. Levy L, Shani Z, Shoseyov O (2002) Modification of polysaccharides and plant cell wall by endo-1,4- $\beta$ -glucanase and cellulase-binding domains. *Biomol Eng* 19(1):17–30. [https://doi.org/10.1016/S1389-0344\(02\)00007-2](https://doi.org/10.1016/S1389-0344(02)00007-2)

49. Mercado JA, Trainotti I, Jiménez Bermúdez I, Santiago Domínguez N, Posé S, Donelli R, Barceló M, Casado G, Pilego Millero I, Quesada MA (2010) Evaluation of the role of the endo- $\beta$ -(1,4)-glucanase gene FaL G3 in strawberry fruit softening. *Postharvest Biol Technol* 55(1):8–14. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.08.004>

50. Ilop-Ious L, Domínguez Patgjaner E, Palomer X, Vendrell M (1999) Characterization of two divergent endo- $\beta$ -1,4-glucanase cDNA clones highly expressed in the non-climacteric strawberry fruit. *Plant Physiol* 119(4):1415–1421. <https://doi.org/10.1104/pp.119.4.1415>

51. Lashbrook CC, Gonzalez Bosch C, Bennett AB (1994) Two divergent endo- $\beta$ -1,4-glucanase genes exhibit overlapping expression in ripening fruit and abscising flowers. *Plant Cell* 6(10):1485–1493. <https://doi.org/10.1105/pc.6.10.1485>

52. Salazar JA, Gamboa BA (2013) Importancia de las pectinas en la dinámica de la pared celular durante el desarrollo vegetal. *Rev Educ Bioquímica* 32(2):67–75

53. Yang H, Liu J, Dang M, Zhang B, Li H, Meng R, Qu D, Yang Y, Zhao Z (2018) Analysis of  $\beta$ -galactosidase during fruit development and ripening in two different texture types of apple cultivars. *Front Plant Sci*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00539>

**Publisher's Note**  
Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.