



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES**

**Centro de Ciencias Básicas**

**Departamento de Química**

**Maestría en Ciencias, área Biotecnología Vegetal**

**Identificación y análisis de expresión de los genes *CCSD1*, *CSD1*, *CSD2*  
y *ACC oxidasa* en guayaba (*Psidium guajava* L.) y su relación con la  
maduración del fruto**

**PRESENTA:**

**IBQ. María Fernanda Delgado Díaz**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS**

**TUTOR:**

**Dr. José Francisco Morales Domínguez**

**INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORAL:**

**Asesor Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch**

**Asesor Dr. Abraham Loera Muro**

**Asesor Dr. Isidoro Rubio Franchini**

**Aguascalientes, México, 16 junio del 2023**

## Voto aprobatorio del comité tutorial

CARTA DE VOTO APROBATORIO  
COMITÉ TUTORAL

M. EN C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ  
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

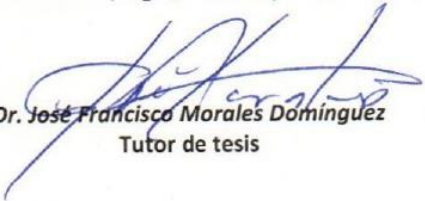
Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado del estudiante **MARÍA FERNANDA DELGADO DÍAZ** con ID **223902** quien realizó la tesis titulada: **IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES *CCSD1*, *CSD1*, *CSD2* Y *ACC OXIDASA* EN GUAYABA (*PSIDIUM GUAJAVA L.*) Y SU RELACIÓN CON LA MADURACIÓN DEL FRUTO**, 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 ella pueda 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 14 de junio de 2023.

  
Dr. José Francisco Morales Domínguez  
Tutor de tesis

  
Dr. Abraham Loera Muro  
Asesor de tesis

  
Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch  
Asesor de tesis

  
Dr. Isidoro Rubio Franchini  
Asesor 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 liberación académica



### DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: 19/06/2023

**NOMBRE:** María Fernanda Delgado Díaz **ID** 223902

**PROGRAMA:** Maestría en Ciencias área Biotecnología Vegetal o Toxicología **LGAC (del posgrado):** Biotecnología Vegetal

**TIPO DE TRABAJO:** (  ) Tesis (  ) Trabajo Práctico

**TÍTULO:** Identificación y análisis de expresión de los genes CCSD1, CSD1, CSD2 y ACC oxidasa en guayaba (*Psidium guajava* L.) y su relación con la maduración del fruto

**IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):** Identificación de algunos genes involucrados en el proceso de maduración, que ayudarán en un futuro a la aplicación de nuevas técnicas en el control de la maduración del fruto de guayaba.

INDICAR	SI	NO	N.A.	(NO APLICA)	SEGÚN	CORRESPONDA:
<i>Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:</i>						
<i>SI</i>						El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
<i>SI</i>						La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
<i>SI</i>						Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
<i>SI</i>						Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
<i>SI</i>						Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
<i>SI</i>						El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
<i>SI</i>						Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
<i>N.A.</i>						Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
<i>SI</i>						Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
<i>El egresado cumple con lo siguiente:</i>						
<i>SI</i>						Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
<i>SI</i>						Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
<i>SI</i>						Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
<i>SI</i>						Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
<i>SI</i>						Coincide con el título y objetivo registrado
<i>SI</i>						Tiene congruencia con cuerpos académicos
<i>SI</i>						Tiene el CVU del Conacyt actualizado
<i>N.A.</i>						Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)
<i>En caso de Tesis por artículos científicos publicados</i>						
<i>N.A.</i>						Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
<i>N.A.</i>						El estudiante es el primer autor
<i>N.A.</i>						El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
<i>N.A.</i>						En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
<i>N.A.</i>						Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
<i>N.A.</i>						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: Sí  No

#### FIRMAS

**Elaboró:**

\* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN: Yenny Adriana Gómez A. - Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO: Dra. Raquel Guerrero Alba

\* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano

**Revisó:**

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO: Dr. Juan Jautel Rincón

**Autorizó:**

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO: M. en C. Jorge Martín Alferez 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.

Elaborado por: D. Apoyo al Posg.  
 Revisado por: D. Control Escolar/D. Gestión de Calidad.  
 Aprobado por: D. Control Escolar/ D. Apoyo al Posg.

Código: DO-SEE-FO-15  
 Actualización: 01  
 Emisión: 28/04/20

**MARÍA FERNANDA DELGADO DÍAZ**  
**ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA**  
**EN CIENCIAS AREA DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL O TOXICOLOGÍA**  
**PRESENTE.**

Estimado Alumno:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o trabajo práctico titulado: **"IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES CCSD1, CSD1, CSD2 Y ACC OXIDASA EN GUAYABA (PSIDIUM GUAJAVA L.) Y SU RELACIÓN CON LA MADURACIÓN DEL FRUTO"**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

**ATENTAMENTE**  
**"SE LUMEN PROFERRE"**

Aguascalientes, Ags., 15 de junio del 2023



**EL DECANO**  
**M. en C. JORGE MARTIN ALFEREZ CHAVEZ**

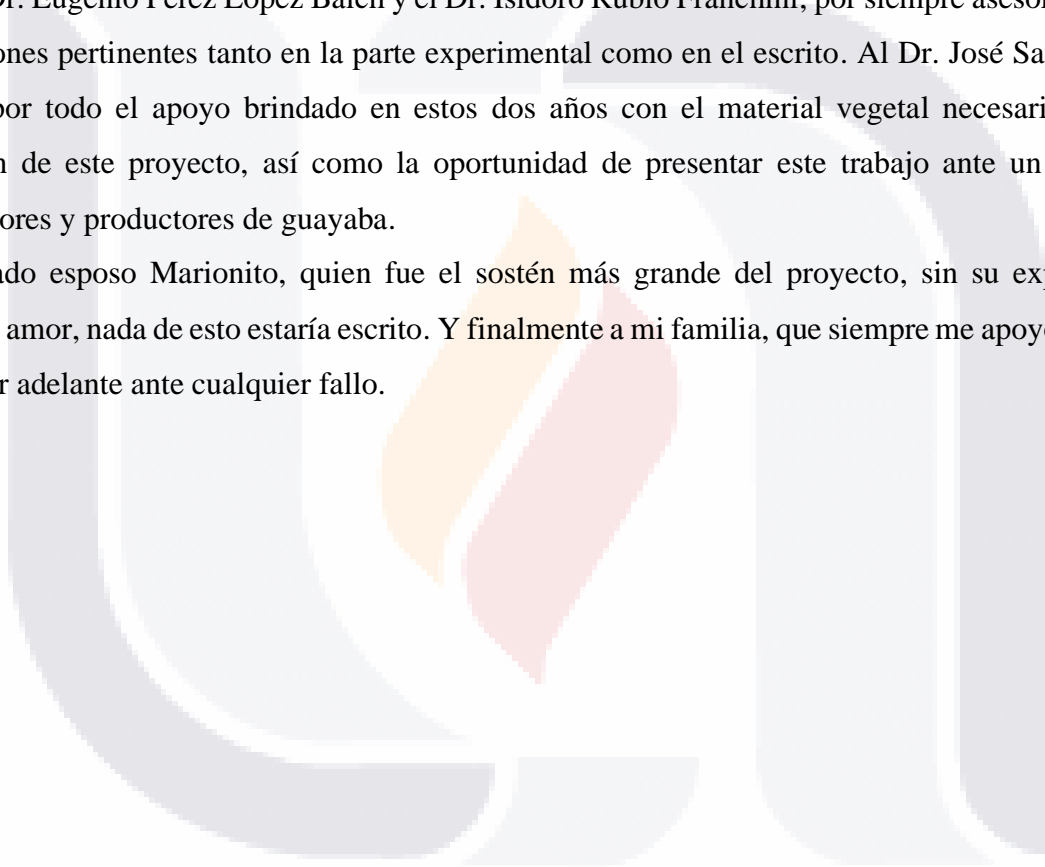


## **Agradecimientos**

El presente trabajo fue posible gracias al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT), por el apoyo otorgado para realizar mis estudios en la Maestría en Ciencias, área biotecnología vegetal; así como a la Universidad Autónoma de Aguascalientes, por la oportunidad de pertenecer a esta generación 2021-2023.

A mi tutor de tesis, el Dr. José Francisco Morales Domínguez, que gracias a su tutela se logró el inicio y conclusión de este trabajo. De igual forma se agradece a mi comité tutorial, el Dr. Abraham Loera Muro, el Dr. Eugenio Pérez López Balch y el Dr. Isidoro Rubio Franchini, por siempre asesorarme con observaciones pertinentes tanto en la parte experimental como en el escrito. Al Dr. José Saúl Padilla Ramírez por todo el apoyo brindado en estos dos años con el material vegetal necesario para la realización de este proyecto, así como la oportunidad de presentar este trabajo ante un panel de investigadores y productores de guayaba.

A mi amado esposo Marionito, quien fue el sostén más grande del proyecto, sin su experiencia, consejos y amor, nada de esto estaría escrito. Y finalmente a mi familia, que siempre me apoyó y animó para seguir adelante ante cualquier fallo.



## Dedicatorias

*A mi alma gemela, Marionito, por siempre estar conmigo haciéndome disfrutar todo el proceso del proyecto, mostrarme el sendero correcto y hacerme ver lo que realmente es importante en la vida; y a mi preciosa familia, por todo el amor y risas que me brindan cada vez que llego a casa. Y a mí, porque sí lo logré.*

## Índice general

Acrónimos	6
Resumen	8
Abstract	8
I. Introducción	9
II. Antecedentes	10
2.1 Guayaba	10
2.1.1 Taxonomía y morfología de la guayaba	11
2.1.2 Historia de la guayaba	11
2.1.3 Condiciones de crecimiento y cosecha de la guayaba	11
2.1.4 Características del fruto de la guayaba	12
2.1.5 Propiedades y usos de la guayaba	12
2.1.6 Producción e importancia económica de la guayaba	13
2.1.6.1 Importancia de la guayaba en México	14
2.1.6.2 Importancia de la guayaba en Aguascalientes	15
2.2 Maduración de frutos	15
2.2.1 Fruto climatérico	16
2.2.2 Producción de etileno	16
2.2.3 Cambios durante la maduración de la guayaba	18
2.2.3.1 Cambios físicos	18
2.2.3.2 Cambios químicos	19
2.2.3.3 Cambios bioquímicos	19
2.2.4 Estrés contra maduración	20
2.2.5 Estrés por Cu en frutos	21
2.3 Estudios moleculares en el fruto de guayaba	22
2.3.1 miRNA generalidades	23
2.3.2 miRNAs encontrados en frutos climatéricos durante el proceso de maduración	25
2.3.2.1 miRNA398	26
2.3.2.2 Genes objetivo del miRNA398	27
2.3.2.2.1 Chaperona Cu/Zn Superóxido Dismutasa-1 (CCSD1)	29
2.3.2.2.2 Cu/Z Superóxido Dismutasa-1 y -2 (CSD1 y CSD2)	30
III. Justificación	32
IV. Hipótesis	32
V. Objetivos	33

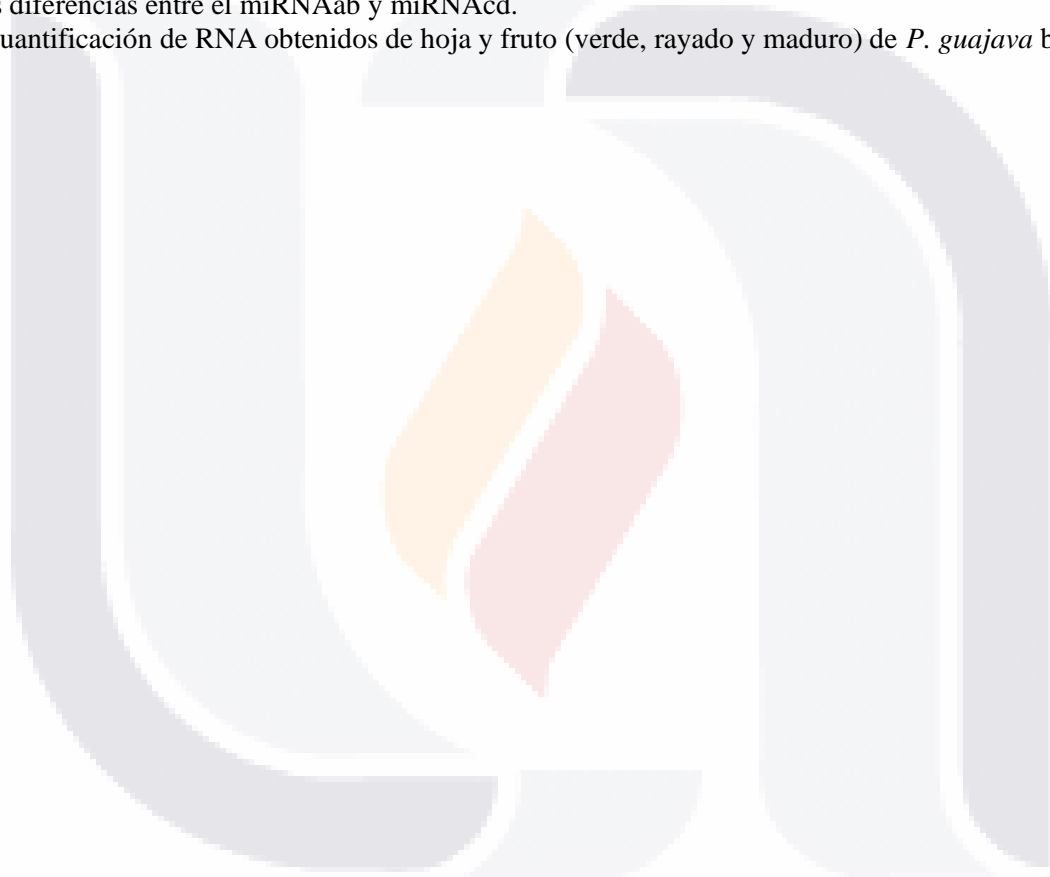
5.1 Objetivo general	33
5.2 Objetivos específicos	33
VI. Metodología	33
6.1 Análisis bioinformático	33
6.2 Diseño de oligonucleótidos	35
6.3 Recolección de material vegetal	37
6.4 Inducción de estrés por Cu	37
6.5 Cuantificación de marcadores de estrés	37
6.5.1 Actividad de catalasa	37
6.5.2 Cuantificación de clorofila	38
6.5.3 Cuantificación de antocianina	38
6.6 Extracción ácidos nucleicos	38
6.7 Síntesis de cDNA	39
6.8 PCR	39
6.9 Análisis de expresión por qPCR	40
6.10 Análisis estadísticos	40
VII. Resultados y discusión	41
7.1 Análisis bioinformático	41
7.1.1 CCSD1	43
7.1.2 CSD1 y CSD2	48
7.2 miRNA398 alineamiento con genes objetivo (CCSD1, CSD1 y CSD2)	53
7.3 Absorción de cobre en los tejidos vegetales	55
7.4 Marcadores del estrés oxidativo por cobre	58
7.4.1 Actividad enzimática de catalasa	59
7.4.2 Antocianina y clorofila	61
7.5 Extracción de ácidos nucleicos (RNA) y síntesis de cDNA	66
7.6 RT-PCR	69
7.6.1 RT-PCR de CCSD1 en cDNA	69
7.6.2 RT-PCR de CSD1 en cDNA	70
7.6.3 RT-PCR de CSD2 en cDNA	71
7.7 qPCR	72
7.7.1 Expresión relativa de CCSD1	72
7.7.2 Expresión relativa de CSD1 y CSD2	74
7.7.3 Expresión relativa de ACC oxidasa	78
VIII. Conclusión	79





## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Principales países exportadores de guayaba, mango y mangostanes, modificado de FAO (2021).	14
<b>Tabla 2.</b> Propiedades de los oligonucleótidos diseñados para los genes CCSD1, CSD1 y CSD2 de <i>P. guajava</i> .	35
<b>Tabla 3.</b> Oligonucleótidos para tiempo real de CCSD1, CSD1, CSD2 y ACC oxidasa de <i>P. guajava</i> .	36
<b>Tabla 4.</b> Identificación y características de las secuencias de CCSD1, CSD1 y CSD2 utilizadas para el alineamiento múltiple.	42
<b>Tabla 5.</b> Propiedades fisicoquímicas de la CCSD1 putativa de <i>P. guajava</i> .	48
<b>Tabla 6.</b> Propiedades fisicoquímicas de la CSD1 y CSD2 putativas de <i>P. guajava</i> .	53
<b>Tabla 7.</b> Secuencias de miRNA398 en frutos de guayaba estadio rayado y maduro de Mendoza (2022). En negritas las diferencias entre el miRNAab y miRNAd.	53
<b>Tabla 8.</b> Cuantificación de RNA obtenidos de hoja y fruto (verde, rayado y maduro) de <i>P. guajava</i> bajo estrés por cobre.	67



## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Principales países exportadores de guayaba, mango y mangostanes, modificado de FAO (2022). En la gráfica se presenta a México en el 2020 y 2021 como país líder en la exportación de guayaba.	15
<b>Figura 2.</b> Ciclo de Yang para la producción de etileno en arroz, modificado de Rzewuski y Sauter (2008).	17
<b>Figura 4.</b> Síntesis de miRNA, modificado de Morales et al. (2022).	25
<b>Figura 5.</b> Mecanismo de acción de las enzimas antioxidantes de plantas ante estrés oxidativo.	27
<b>Figura 6.</b> Transporte del Cu dentro de la célula.	29
<b>Figura 7.</b> Alineamiento de los cuatro isotipos del miRNA398 (a, b, c y d) con sus genes objetivo (CCSD1, CSD1 y CSD2).	36
<b>Figura 8.</b> Dendrograma de distancia evolutiva de la enzima CCSD1 de organismos pertenecientes de la familia <i>Myrtaceae</i> y otras. En colores se clasifican las familias <i>Myrtaceae</i> (morado), <i>Juglandaceae</i> (azul), <i>Rosaceae</i> (verde) y el orden de las <i>Fagaceae</i> (azul), donde en recuadro amarillo se destaca la <i>P. guajava</i> . El árbol fue diseñado en la herramienta de Jalview mediante un análisis de distancia promedio por PAM250.	44
<b>Figura 9.</b> Conservación de la CCSD1 en diferentes especies y estructura tridimensional de la CCSD1 de <i>P. guajava</i> .	45
<b>Figura 10.</b> Motivos conservados de la CCSD1. Las proteínas de los organismos <i>G. max</i> , <i>H. brasiliensis</i> , <i>J. regia</i> , <i>P. trichocarpa</i> , <i>P. alba</i> , <i>P. granatum</i> , <i>P. guajava</i> , <i>R. argentea</i> , <i>R. communis</i> , <i>R. chinensis</i> , <i>S. oleosum</i> y <i>Z. jujuba</i> tuvieron 12 motivos conservados, excepto en <i>G. max</i> con 9, <i>H. brasiliensis</i> y <i>S. oleosum</i> con 13 y <i>P. guajava</i> con 14 motivos conservados. En amarillo se resalta la <i>P. guajava</i> .	47
<b>Figura 11.</b> Dendrograma de distancia evolutiva de la enzima a) CSD1 y b) CSD2 de organismos pertenecientes a la familia <i>Myrtaceae</i> y otras. En colores se clasifican las familias <i>Myrtaceae</i> (morado), <i>Juglandaceae</i> (azul), <i>Rosaceae</i> (verde) y <i>Malvaceae</i> (rosa), donde en recuadro amarillo se destaca la <i>P. guajava</i> . El árbol fue diseñado en la herramienta de Jalview mediante un análisis de distancia promedio por PAM250.	49
<b>Figura 12.</b> Conservación de la CSD1 y CSD2 en diferentes especies y estructura tridimensional de la CSD de <i>P. guajava</i> .	50
<b>Figura 13.</b> Motivos conservados de las proteínas CSD1 y CSD2.	52
<b>Figura 14.</b> Construcciones de los fragmentos del gen CCSD1, CSD1 y CSD2 de <i>P. guajava</i> . La barra superior de cada CSD representa el tamaño completo del gen de cada enzima, mientras que la barra inferior se refiere al fragmento flanqueado por los oligonucleótidos diseñados. Los dominios conservados de cada proteína corresponden al dominio Cu/Zn SOD (morado) y dominio asociado a metales (verde). La región de alineamiento de los cuatro isotipos de miRNA398 (rosa) se encuentra en diferentes locaciones de cada CSD.	54
<b>Figura 15.</b> Estructura secundaria del miRNA398a en <i>E. grandis</i> .	55
<b>Figura 20.</b> Extracción de RNA de fruto verde de guayaba. Las dos bandas corresponden a las dos subunidades del RNAr. Se corrió 2 µL de RNA en un gel de agarosa 1 %.	66
<b>Figura 21.</b> RT-PCR de ACC oxidasa. Producto de RT-PCR de ACC oxidasa perteneciente a cDNA puro de fruto verde (FV), rayado (FR) y maduro (FM) y bajo estrés por cobre (4 h, 8 h y 12 h de absorción de CuSO <sub>4</sub> ). 1) Marcador de peso molecular de 100 pb; 2) FV control; 3) FV 4 h; 4) FV 8 h; 5) FV 12 h; 6) FR control; 7) FR 4 h; 8) FR 8 h; 9) FR 12 h; 10) FM control; 11) FM 4 h; 12) FM 8 h; 13) FM 12 h y 14) Marcador de peso molecular de 100 pb. Todos los cDNAs utilizados amplificaron una banda única de 200 pb, con excepción de FR 8h quien mostró contaminación por DNA al amplificar a 300 pb y F12 h quien no presentó bandedo.	68
<b>Figura 22.</b> Fragmento del gen <i>CCSD1</i> de fruto verde de guayaba.	70
<b>Figura 23.</b> Fragmento del gen <i>CSD1</i> en fruto verde de guayaba.	71
<b>Figura 24.</b> Fragmento del gen <i>CSD2</i> en fruto verde de guayaba.	72

### Índice de figuras de gráficos

<b>Figura 3.</b> Curva de crecimiento sigmoideal de la guayaba, modificado de Deepthi (2017). Se observa un incremento en la masa del fruto (peso fresco del fruto (g)).	18
<b>Figura 16.</b> Gráfico de absorción de cobre en distintos órganos de guayaba bajo estrés por cobre.	57
<b>Figura 17.</b> Gráfico de la actividad catalasa en distintos órganos de guayaba bajo estrés por cobre.	61
<b>Figura 18.</b> Gráfico de antocianina en frutos, hoja y tallo de guayaba bajo estrés por cobre.	63
<b>Figura 19.</b> Gráfico de clorofila en frutos, hoja y tallo de guayaba bajo estrés por cobre.	65
<b>Figura 25.</b> Expresión relativa del RNAm de <i>CCSD1</i> en frutos y hoja de guayaba bajo estrés por cobre.	74
<b>Figura 26.</b> Expresión relativa del RNAm de <i>CSD1</i> en frutos y hoja de guayaba bajo estrés por cobre.	75
<b>Figura 27.</b> Expresión relativa del RNAm de <i>CSD2</i> en frutos y hoja de guayaba bajo estrés por cobre.	77
<b>Figura 28.</b> Expresión relativa del RNAm de <i>ACC oxidasa</i> en frutos y hoja de guayaba bajo estrés por cobre	79



## Acrónimos

ACC: 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato  
 ACC oxidasa: 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato oxidasa  
 AFLP: polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (siglas en inglés)  
 Ai: índice alifático  
 ARF: factor de respuesta a auxinas  
 CAT: enzima catalasa  
 CCSD1: Chaperona Cu/Zn superóxido dismutasa-1  
 cDNA: DNA complementario (por sus siglas en inglés)  
 CIBNOR: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste  
 CPB: proteína de unión cap (por sus siglas en inglés)  
 CSD: Cu/Zn superóxido dismutasa  
 CSD1: Cu/Zn superóxido dismutasa-1  
 CSD2: Cu/Zn superóxido dismutasa-2  
 CTAB: bromuro de hexadeciltrimetilamonio  
 DCL1: enzima RNasa III, *dicer like-1*  
 DNA/ADN: ácido desoxirribonucleico  
 EIN2: proteína insensible al etileno  
 EROS: especies reactivas de oxígeno  
 ETR1: receptor de etileno-1  
 HEN1: enzima metiltransferasa *Hua Enhancer*  
 IGS: espaciadores intergénicos (siglas en inglés)  
 INIFAP: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias  
 ITS: espaciadores internos de transcripción (siglas en inglés)  
 mRNA: RNA mensajero  
 miRNA: micro RNA  
 miR: familia de micro RNA  
 MTA: 5-metiltoadenosina  
 MTR: 5-metiltiorribosa  
 NCBI: National Center of Biotechnology Information  
 ONU: Organización de Naciones Unidas  
 PCR: reacción en cadena de la polimerasa  
 Pi: punto isoeléctrico  
 POX: enzima peroxidasa  
 PRONACES: Programa Nacional Estratégico  
 qPCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (siglas en inglés)  
 RAN: proteína respondedora de antagonista-1  
 RAPD: DNA polimórfico amplificado al azar  
 RE: retículo endoplasmático  
 RNA/ARN: ácido ribonucleico  
 RISC: complejo de silenciamiento dirigido por ARN  
 rRNA: RNA ribosomal  
 RubisCO: enzima ribulosa bifosfato carboxilasa oxigenasa  
 SAM: S-adenosil-metionina  
 SDN: nucleasa degradadora de RNA (por sus siglas en inglés)  
 SOD: enzimas superóxido dismutasas  
 SODX: superóxido dismutasa X  
 SSR: secuencias simples repetitivas  
 tRNA: RNA de transferencia

## Resumen

La guayaba es un fruto de gran importancia económica y social a nivel nacional y estatal, dadas sus propiedades organolépticas y nutricionales. Debido a que el fruto tiene una sobre maduración en postcosecha genera grandes pérdidas económicas para sus productores. Se han realizado diferentes estudios bioquímicos y moleculares sobre la maduración en guayaba, entre estos destacan los transcriptómicos y los miRNAs. En estudios previos en el equipo de nuestro laboratorio sobre miRNAs en guayaba, se identificó el miRNA398 que regula negativamente la expresión de las *Cu/Zn superóxido dismutasas citosólica y cloroplástica (CSD1 y CSD2)* y su *chaperona (CCSD1)*, encargadas de eliminar el  $O_2^-$ . Por lo que el objetivo de este trabajo fue analizar la relación entre la maduración y la actividad del miRNA398 y sus genes objetivo y su análisis de expresión por estrés por cobre. Se realizó un estrés por cobre en hojas y frutos de guayaba en tres estadios de maduración: verde, rayado y maduro; el fruto unido al pedúnculo se puso en una solución de sulfato de cobre 50 mM. La cantidad de cobre en las muestras de hoja y fruto verde, rayado y maduro a las 12 h fue de 2.27, 1.38, 1.35 y 0.41 mg Cu/L respectivamente. El estrés oxidativo se confirmó por el decaimiento en la producción de clorofila, aumento de antocianinas en hoja y disminución en la actividad de la catalasa, proporcional a la exposición a Cu. La expresión relativa de los genes de la *CCSD1* fue constante desde las 8 h para todos los tejidos, para *CSD1* aumentó a las 8 y 12 h en hoja y fruto rayado, respectiva y finalmente para la *CSD2* aumentó a las 8 h en todos los tejidos, indicando que posiblemente el estrés por cobre fue atenuado principalmente por la *CSD2*. Por otra parte, el decaimiento en la expresión de la *ACC oxidasa* correspondiente al nivel de Cu demostraría que dicho estrés indujo el silenciamiento del miRNA398, la activación de sus genes objetivo y la disminución de la expresión de la *ACC oxidasa*. El análisis bioinformático de los genes y sus proteínas en estudio encontrados en el genoma de la guayaba mostró que contienen todas características de la familia de estas proteínas.

**Palabras clave:** guayaba, cobre, estrés oxidativo, microRNA398, maduración.

## Abstract

Guava is a fruit of great economic and social importance at national and state level, given its organoleptic and nutritional properties. Because the fruit overripens in post-harvest, it generates great economic losses for its producers. Different biochemical and molecular studies have been carried out on guava ripening, including transcriptomic and miRNA studies. In previous studies in our laboratory team on miRNAs in guava, miRNA398 was identified that negatively regulates the expression of *cytosolic and chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutases (CSD1 and CSD2)* and their *chaperone*



(*CCSD1*), responsible for eliminating  $O_2^-$ . Therefore, the aim of this work was to analyze the relationship between maturation and activity of miRNA398 and its target genes and their expression analysis by copper stress. Copper stress was performed on guava leaves and fruits at three ripening stages: green, breaker and ripe; the fruit attached to the peduncle was placed in a 50 mM copper sulfate solution. The amount of copper in the green, breaker and ripe leaf and fruit samples at 12 h was 2.27, 1.38, 1.35 and 0.41 mg Cu/L respectively. Oxidative stress was confirmed by the decay in chlorophyll production, increase in leaf anthocyanins and decrease in catalase activity, proportional to Cu exposure. The relative expression of *CCSD1* genes was constant from 8 h for all tissues, for *CSD1* it increased at 8 and 12 h in leaf and breaker fruit, respectively, and finally for *CSD2* it increased at 8 h in all tissues, indicating that possibly copper stress was attenuated mainly by *CSD2*. On the other hand, the decay in *ACC oxidase* expression corresponding to the Cu level would demonstrate that such stress induced silencing of miRNA398, activation of its target genes and decreased *ACC oxidase* expression. Bioinformatic analysis of the genes and their proteins under study found in the guava genome showed that they all contain characteristics of the family of these proteins.

**Key words:** guava, copper, oxidative stress, microRNA398, ripening.

## I. Introducción

El guayabo (*Psidium guajava* L.) es un árbol perenne tropical originario de América que se ha extendido en todos los continentes (Pérez et al., 2008), su fruto se encuentra dentro de las 50 especies frutales de mayor consumo a nivel mundial gracias a sus propiedades organolépticas, así como nutrimentales, como su alto contenido de vitamina C, fibra dietética y antioxidantes (siendo recomendado su consumo para disminuir el nivel de triglicéridos y colesterol) (Feng et al., 2020). En 2020 México ocupó el 3er lugar en producción a nivel mundial (FAO, 2021) y el primer lugar en exportación (FAO, 2022), mientras que, a nivel nacional, Aguascalientes se coloca en el 3er lugar en producción de guayaba variedad media china, siendo el cultivar Calvillo Siglo XXI su principal producto (SNIIM, 2021).

Además de lo económico, la guayaba es importante por su versatilidad, ya que cuenta con una amplia gama de productos en el mercado que van desde preparaciones farmacéuticas, hasta dulces típicos de la región como los ates, licores, pizza, entre otros (Fischer y Melgarejo, 2021). Sin embargo, existen grandes problemáticas del cultivo de *P. guajava*, la mayoría provocadas por la corta vida de anaquel del producto; ya que la guayaba al ser fruto climatérico, su maduración está dada por el nivel de respiración y producción de etileno (Fabi et al., 2010), lo que le permite a la guayaba madurar incluso

fuera de la planta madre, captando el etileno que desprenden frutos anexos, y por ende acelerando de forma desproporcionada su propia maduración, provocando la sobre maduración de los frutos (Deepthi, 2017) y dejándolos no aptos para la exportación. Es por esta razón que el entendimiento del proceso de maduración de la guayaba es de suma importancia para su posterior control.

La maduración es un proceso de senescencia que está desencadenado por la actividad de diversas enzimas, como la ACC oxidasa, quien es la encargada de catalizar la biosíntesis de etileno y las superóxido dismutasas (SOD), quienes suprimen las especies reactivas de oxígeno (EROS) que provocan la senescencia y maduración del fruto. Estas últimas son reguladas por el miRNA398 de manera transcripcional al inhibir el mRNA de la *chaperona Cu/Zn superóxido dismutasa (CCSD1)* y las *Cu/Zn superóxido dismutasa citoplásmica y cloroplástica (CSD1 y CSD2, respectivamente)* al momento de maduración del fruto, para evitar la mitigación de las EROS y favorecer la senescencia del fruto, además de participar ante otros estreses oxidativos como regulador de la producción de las SOD.

Esta investigación pretende identificar y analizar la expresión de los genes objetivo del miRNA398 (*CCSD*, *CSD1* y *CSD2*) y relacionarla con la expresión de la ACC oxidasa, en hoja y fruto de guayaba en tres estadios de maduración (fruto verde, rayado y maduro), previamente inducidos a estrés oxidativo por cobre.

## **II. Antecedentes**

### **2.1 Guayaba**

La guayaba (*Psidium guajava* L.) es un árbol perenne tropical y subtropical, originario de América, que se ha extendido por América del Sur, Europa, África y Asia por su capacidad de crecer en diferentes condiciones climáticas, principalmente en climas secos (Pérez et al., 2008).

Este fruto tiene una alta importancia económica para la industria alimenticia, ya que además de su palatabilidad, tiene un gran valor nutricional (Feng et al., 2020), es rico en vitamina C, A y B<sub>2</sub>, fibra dietética y minerales (Martínez, Molina y Boucourt, 1997; Feng et al., 2020). La hoja también tiene aplicación farmacéutica por sus propiedades antimicrobianas, siendo utilizada como tratamiento en infusiones para la diarrea, gastroenteritis y otras enfermedades causadas por bacterias patógenas (Pérez et al., 2008).

### **2.1.1 Taxonomía y morfología de la guayaba**

La *P. guajava* pertenece a la familia *Myrtaceae*, la cual involucra 121 géneros y 5800 especies, siendo 3500 de estas, frutas aromáticas (De Paulo et al., 2020; Feng et al., 2020). Dentro de la familia se incluye al eucalipto (*Eucalyptus grandis*), manzana de cera (*Syzygium samarangense*) y mirto rosa (*Rhodomyrtus tomentosa*) (Feng et al., 2020), siendo así, una familia con alto potencial agroindustrial (Fischer y Melgarejo, 2021). Aunque la especie *P. guajava* es la única variedad con importancia comercial significativa (Feng et al., 2020). Esta familia involucra al género *Psidium* con cerca de 150 especies, encontrando a los árboles frutales *P. cattleianum*, *P. molle*, *P. guineense*, *P. friedrichsthalianum*, *P. montanum* y *P. guajava*, siendo esta última la especie más cultivada (Fischer y Melgarejo, 2021), con 400 variedades alrededor del mundo, las cuales se diferencian en el color de piel, que puede variar desde el amarillo al rosa y en pulpa del blanco al rosa intenso, dependiente del cultivar, estación del año y madurez del fruto (Mittal et al., 2020).

El árbol de guayaba crece entre 5-9 m de altura en promedio (dependiendo de sus condiciones de humedad), tiene pocas ramificaciones, las hojas son aromáticas, pares, alargadas y de color verde pálido con aproximadamente 8-20 cm x 8 cm de longitud y ancho respectivamente (Yam Tzec et al., 2010). Sus flores son bisexuales, por lo que predomina la autopolinización (60-75 %) contra la polinización cruzada (35 %) (Fischer y Melgarejo, 2021); son blancas, con 2.5-3 cm de diámetro y dan un fruto carnoso con muchas semillas de color verde pálido, amarillo y blanco con pulpa roja; de forma y tamaño variable entre 2.5-10 cm de diámetro (Martínez et al., 1997; Fischer y Melgarejo, 2021).

### **2.1.2 Historia de la guayaba**

La guayaba se describió por primera vez en 1753 con las colecciones que se tenían en Asia por el botánico Linnaeus (Feng et al., 2020). A la fecha se tienen diferentes nombres dependiendo de la región; como guave o guavenbaum en Alemania; banjiro en Japón y goiaba, goiabeiro en Portugal (Pérez et al., 2008). Es originaria de Mesoamérica y Sudamérica (México a Perú), pero a lo largo de 400 años se distribuyó por todos los continentes, principalmente en los países de baja latitud (Pérez et al., 2008; Feng et al., 2020; Fischer y Melgarejo, 2021).

### **2.1.3 Condiciones de crecimiento y cosecha de la guayaba**

Las condiciones controladas de temperatura, hídricas y salinas son esenciales para el árbol de guayaba.

La temperatura óptima de crecimiento ronda entre 15-30 °C, aunque puede soportar hasta 11 y 51 °C. Las temperaturas bajas reducen la producción y favorecen la caída de las flores, con solo disminuir 3 °C se detiene la maduración. A temperaturas de 5-7 °C se paraliza el crecimiento y las hojas se vuelven moradas y a -4 a -2 °C se muere el árbol (Paul y Duarte, 2012; Fischer y Melgarejo, 2021). Es por ello que el guayabo se clasifica como una planta no resistente a bajas temperaturas, por lo que se debe de tener cuidado en las producciones invernales. Por el contrario, las altas temperaturas aumentan el contenido de azúcares, ácidos orgánicos y ácido ascórbico cuando se somete también a niveles elevados de humedad y con altitudes tropicales de 1570-1890 m sobre el nivel del mar (Fischer y Melgarejo, 2021).

El cultivo de guayaba comienza al año de vida del árbol, con una producción vigorosa a los 3-4 años (Fischer y Melgarejo, 2021). Se cosecha la fruta en estadio rayado (verde-amarillento), ya que la maduración y proceso de ablandamiento es alrededor de los 8 días próximos, tiempo en el cual se transporta el producto, almacenando la fruta a 8-10 °C (Yam Tzec et al., 2010).

Su cosecha puede ser mecánica (vibraciones) o manual, lo que depende de la calidad final del producto, por la perecibilidad y delicadeza del fruto; los daños mecánicos son más abrasivos, lo que deriva en una merma cerca del 20 % de la producción total. Debido a esto, al coste y efectividad, en México se opta por la recolección manual con transporte en camiones sobre cajas, que a pesar de ser más amable con el fruto, también es la peor fase de daño para las guayabas, pues involucra la compresión de las frutas al envasado y abrasión por rozamiento entre frutos (Yam Tzec et al., 2010).

#### **2.1.4 Características del fruto de la guayaba**

El fruto de la guayaba es una baya que se obtiene al año de crecimiento del árbol, con un ciclo de 100-150 días para las cosechas primaverales y 220 días en las invernales. La guayaba varía en forma y tamaño, generalmente es ovalada y con un diámetro de 2.5-10 cm (Yam Tzec et al., 2010). El fruto es agrídulce y carnoso, con abundantes semillas en la pulpa y su peso ronda entre 50-500 g (Yam Tzec et al., 2010; Fischer y Melgarejo, 2021). El color de su piel en estadio maduro puede ser verde ligero, amarillo y rosa; con pulpa blanca, crema y rosada, dependiendo de la especie (Yam Tzec et al., 2010).

#### **2.1.5 Propiedades y usos de la guayaba**

El fruto de guayaba tiene altos niveles de ácido ascórbico (0.6-6 g/kg fruta comestible), 6 veces superiores al total de la fresa y 5 veces más que el kiwi y naranja; además contiene vitamina A, ácido

fólico (vit. B<sub>9</sub>), niacina (vit. B<sub>3</sub>), piridoxina (vit. B<sub>6</sub>), tiamina, riboflavina, fibra dietética, antioxidantes naturales (antocianina, licopeno, fenoles y taninos) y minerales como el calcio, hierro, fósforo y potasio (Medina y Pagano, 2003; Feng et al., 2020; Fischer y Melgarejo, 2021). Su consumo reduce el estrés oxidativo y disminuye el nivel de triglicéridos y colesterol, por lo que se recomienda para reducir la presión arterial y colesterol sanguíneo (Marquina et al., 2008; Rai et al., 2010); además también se utiliza para la diabetes por los compuestos presentes en la fruta que inhiben la glicación de las proteínas (Bapat et al., 2019).

Sus hojas tienen efecto antimicrobiano, antiinflamatorio, antígenotóxico, además de propiedades hepatoprotectivas, siendo utilizadas desde tiempos indígenas para tratamiento de las infecciones intestinales y diarrea (Fischer y Melgarejo, 2021; Martínez, Molina y Boucourt, 1997). La actividad antibacteriana de las hojas se utiliza bajo extracciones acuosas, salinas e hidroalcohólicas para combatir *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhosa*, *Sarcina lutea*, *Neisseria gonorrhoea*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes*, entre otras bacterias y hongos (Martínez, Molina y Boucourt, 1997).

Dadas sus propiedades nutricionales, palatabilidad, producción barata y accesible, la industria alimenticia la utiliza para preparar una amplia gama de productos, como pulpas, jugos, puré, polvo para reconstituir como néctar, mermeladas, jaleas, conservas y dulces (Marquina et al., 2008; Yam Tzec et al., 2010; Fischer y Melgarejo, 2021).

### **2.1.6 Producción e importancia económica de la guayaba**

La guayaba es un fruto tropical de gran importancia económica para más de 60 países, incluido México (Fischer y Melgarejo, 2021). Tuvo una producción mundial en el 2020 alrededor de 54.83 M ton, encabezado por India (45.13 % del total de producción mundial), seguido de Indonesia (6.6 %), México (4.33 %), China (4.32 %) y Pakistán (4.28 %) (FAO, 2021).

La exportación de guayaba a nivel mundial en el 2021 se estima fue de 2.3 millones de ton, con un incremento del 3 % respecto a la producción del 2020 (75 mil toneladas) (FAO, 2022). En el 2020 y 2021 se destacó en primer lugar la exportación de México (Tabla 1) (Fig. 1), donde el 90 % de la producción tiene como destino Estados Unidos y el resto a Canadá (FAO, 2021).

**Tabla 1.** Principales países exportadores de guayaba, mango y mangostanes, modificado de FAO (2021).

	2016	2017	2018	2019	2020
Miles de toneladas					
<b>Asia</b>	<b>659.7</b>	<b>790.2</b>	<b>768</b>	<b>1014.1</b>	<b>949.4</b>
Tailandia	183.2	242.9	256.9	479	390.8
India	136	172.4	153.3	147.2	128
Pakistán	76.9	35.6	70.8	95.3	102.2
<b>África</b>	<b>162.3</b>	<b>196.6</b>	<b>186.7</b>	<b>178.7</b>	<b>184.2</b>
Egipto	36	61.7	65.9	67.9	77.8
<b>América Central y el Caribe</b>	<b>457.9</b>	<b>490.2</b>	<b>492</b>	<b>472.2</b>	<b>518.6</b>
México	408	431	435	410.7	465.1
<b>Sudamérica</b>	<b>381</b>	<b>403.6</b>	<b>441.6</b>	<b>476.2</b>	<b>550.7</b>
Brasil	154.4	179.7	170.6	216	243.5
Perú	157.1	162.7	209.3	200.9	239.6
<b>Norte América</b>	<b>14.2</b>	<b>11</b>	-	-	-
Estados Unidos	14.2	10.9	-	-	-
<b>Oceanía</b>	<b>7.4</b>	<b>8.1</b>	<b>8.6</b>	<b>7.1</b>	<b>6.2</b>
Australia	7.4	8.1	8.6	7	6.2
<b>Mundo</b>	<b>1683</b>	<b>1900</b>	<b>1897</b>	<b>2148</b>	<b>2209</b>

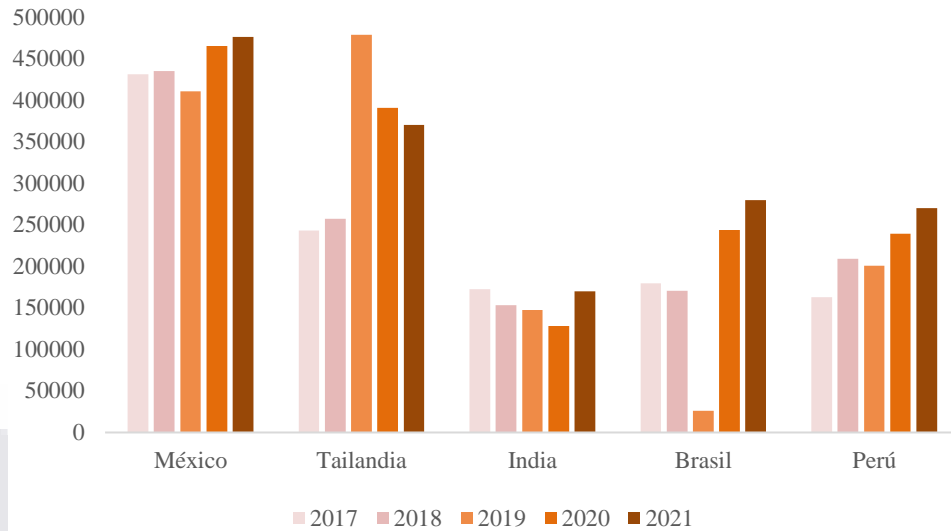
### 2.1.6.1 Importancia de la guayaba en México

La guayaba es un fruto económica y culturalmente importante para México, desde tiempos prehispánicos se tienen registros de su consumo y uso medicinal para contrarrestar los malestares estomacales por parte de los indígenas mayas, náhuatl, zapotecas y popolucas (Pérez et al., 2008). Actualmente su uso medicinal sigue promocionándose en preparados farmacéuticos como QG5®, sin embargo, su consumo en México es principalmente el fruto fresco y como dulces tradicionales de guayaba.

El área cultivada entre el 2012-2015 en el país fue de 21.15 ton ha, con una producción de 297.65 miles de ton, que dejó un valor económico de 645,978.81 miles de millones de pesos (Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas, 2017); destacando principalmente Michoacán que aportó el 46.4 % del área de los cultivos, seguido de Aguascalientes y Zacatecas con 30.6 y 16.5 % respectivamente (Borja-Bravo et al., 2019).

En producción, México ocupa el 3er lugar a nivel mundial (FAO, 2021). Mientras que en exportación, México ha mantenido desde el 2016 alrededor de 400,000 ton de guayabas exportadas, posicionándose en 2020 y 2021 como líder mundial en exportación de guayaba (Fig. 1) (FAO, 2022).





**Figura 1.** Principales países exportadores de guayaba, mango y mangostanes, modificado de FAO (2022). En la gráfica se presenta a México en el 2020 y 2021 como país líder en la exportación de guayaba.

### 2.1.6.2 Importancia de la guayaba en Aguascalientes

El estado de Aguascalientes ocupa el 3er puesto de los estados con mayor producción de guayabas a nivel nacional (Borja-Bravo et al., 2019), produciendo principalmente la variedad media china origen Calvillo (SNIIM, 2021). El municipio de Calvillo es el responsable de la alta producción de guayaba, con 6,269 hectáreas sembradas que producen alrededor de 90 mil toneladas de guayaba por año (Ramos-Sandoval et al., 2017).

## 2.2 Maduración de frutos

La maduración de los frutos es un proceso coordinado que tiene como objetivo la dispersión de las semillas maduras a través del consumo del fruto. Está involucrado en muchos cambios físicos, químicos y bioquímicos para la obtención de un fruto de color, textura, sabor y aroma agradables para los organismos dispersadores de semillas (Maduwanthi y Marapana, 2017; Payasi y Sanwal, 2008; Goulao y Oliveira, 2008).

Es importante determinar la madurez de los frutos, especialmente de los frutos climatéricos, como la guayaba, ya que es determinante para la calidad y tiempo de vida final del fruto (Deepthi, 2017). La firmeza del fruto de guayaba es perdida conforme avanza la madurez del fruto, para los frutos de dos variedades de guayaba blanca y rosa, el decremento de la firmeza se dio en una proporción de 8 veces desde el fruto verde (inmaduro) hasta su etapa madura (amarilla y rosada), la cual se alcanza en 10 días (Abu-Bakr et al., 2003).

### **2.2.1 Fruto climatérico**

Los frutos se pueden dividir en dos grupos dependiendo de su patrón de respiración, en climatéricos y no climatéricos. Los frutos climatéricos son aquellos que dependen de la respiración y producción de etileno, pudiendo madurar fuera de la planta madre (Fabi et al., 2010; Prasanna et al., 2007), dentro de esta clasificación se encuentra la guayaba, jitomate, plátano, papaya, aguacate, mango, melón, durazno, pera, entre otros (Deepthi, 2017; Payasi y Sanwal, 2008). Por contrario, los frutos no climatéricos no presentan concentraciones elevadas de etileno en su maduración, por lo que su maduración no depende del etileno, lo que imposibilita que madure el fruto una vez es separado de su planta madre (Payasi y Sanwal, 2008).

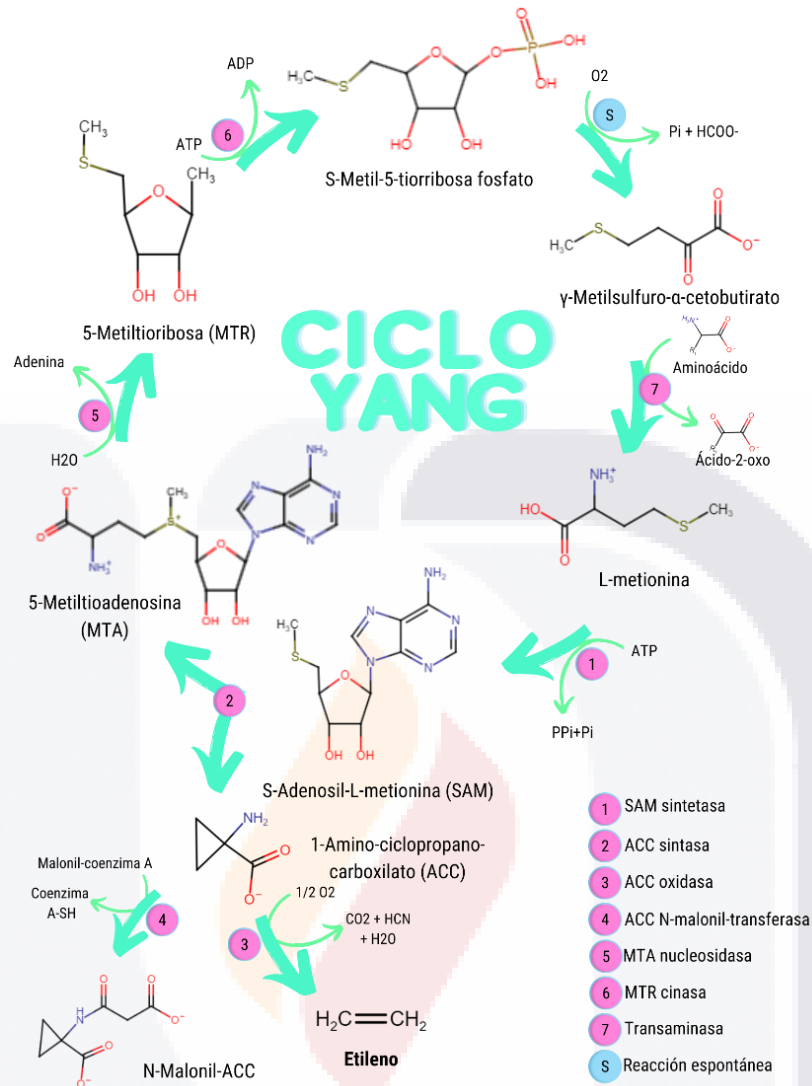
El etileno no solo controla el proceso de maduración de frutos, ya que, es una fitohormona de señalización que se distribuye a través de la célula ante una amplia gama de estímulos internos y ambientales (Li et al., 2015), regulando la germinación, senescencia, abscisión, así como respuesta ante estrés biótico/abiótico, como inundaciones, alta salinidad o compactación del suelo (Binder, 2020). Debido a esto, el etileno también puede reconocerse de manera exógena, acelerando la respuesta a este, que, en frutos climatéricos, deriva en una aceleración de la maduración, lo que resulta en un fruto con pérdida de calidad y susceptible a patógenos y desórdenes fisiológicos (Deepthi, 2017).

### **2.2.2 Producción de etileno**

El etileno es un gas producido por las plantas que se clasifica como fitohormona, ya que, regula distintos procesos de la planta como la germinación, floración, senescencia, maduración de las frutas y señalización ante algún estrés (Rzewuski y Sauter, 2008).

Su biosíntesis está dada por el ciclo de yang (Fig. 2), a partir de una molécula de metionina, que se activa con ATP por la SAM sintetasa, produciendo S-adenosil-metionina (SAM). Seguido se convierte en 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato (ACC) con subproducto de 5- metiltioadenosina (MTA), catalizada por la ACC sintasa. Por último, para la generación de etileno, se metaboliza la ACC con dióxígeno por acción de la ACC oxidasa que produce etileno, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y cianuro (Rzewuski y Sauter, 2008).

Para la regeneración de metionina, en una reacción de hidratación, la MTR nucleosidasa transforma la MTA en 5-metiltiorribosa (MTR), que se fosforila y por acción de la MTR cinasa produce S-metil-5-tiorribosa fosfato. Finalmente, este compuesto se convierte en  $\gamma$ -metilsulfuro- $\alpha$ -cetobutirato de forma espontánea al estar en contacto con oxígeno, el cual regenera por una transaminasa la metionina (Rzewuski y Sauter, 2008).



**Figura 2.** Ciclo de Yang para la producción de etileno en arroz, modificado de Rzewuski y Sauter (2008).

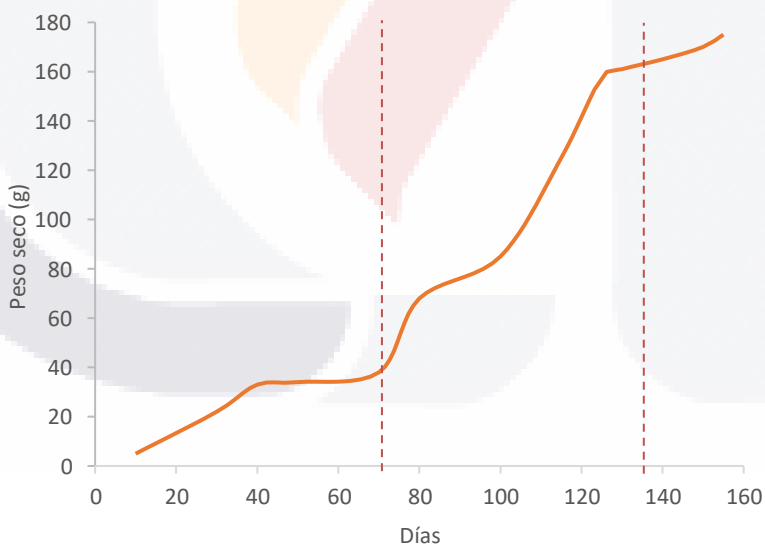
El etileno se produce y distribuye hasta reconocerse mediante receptores localizados en el retículo endoplasmático (RE), como el receptor transmembranal insensible al etileno (EIN2), el cual se mantiene conservado en todas las plantas terrestres desde las algas verdes y cianobacterias que dieron paso a los cloroplastos (Binder, 2020) y activa dos factores de transcripción EIN3 y su homólogo EIN3-LIKE 1 (EIL1), los cuales regulan la expresión génica del etileno (Li et al., 2015), aunque también se encuentran los receptores membranales del RE de etileno, donde *Arabidopsis* cuenta con cinco isoformas, el receptor de respuesta a etileno 1 (ETR1) y ETR2, sensor de respuesta a etileno 1 (ERS1), ERS2 y EIN4; proteínas de triple respuesta (CTR1), factores de transcripción como EIN3, EIN3-like y factores de respuesta al etileno (ERFs) (Binder, 2020).

### 2.2.3 Cambios durante la maduración de la guayaba

Hay muchos cambios respecto la maduración del fruto de guayaba, dentro de los cuales se destaca la degradación del almidón y otros polisacáridos, producción de azúcares, degradación de clorofila, síntesis de pigmentos y compuestos volátiles y solubilización parcial de la pared celular (Fabi et al., 2010; Prasanna et al., 2007) que modifican las características organolépticas y de calidad nutricional (Goulao y Oliveira, 2008).

#### 2.2.3.1 Cambios físicos

Entre los cambios físicos que ocurren por la maduración de los frutos, está el crecimiento y aumento de peso y la pérdida de turgencia del fruto. En el caso de la guayaba este crecimiento se da en forma de curva sigmoideal (Fig. 3), la cual se divide en tres etapas. La fase inicial (0-75 días), tiene un crecimiento rápido con ligero aumento de peso; en la segunda fase (75-135 días) se almacenan nutrientes, por tanto, incrementa el gramaje del fruto hasta casi el que tendrá en su etapa final y la tercera fase (135-155 días) solo tendrá un pequeño aumento en el peso, disminuyendo al final (datos no mostrados) por la deshidratación del fruto (Selvarajet al., 1999; Deepthi, 2017).



**Figura 3.** Curva de crecimiento sigmoideal de la guayaba, modificado de Deepthi (2017). Se observa un incremento en la masa del fruto (peso fresco del fruto (g)).

Por otra parte, el ablandamiento del fruto involucra cambios enzimáticos en la pared celular (Maduwanthi y Marapana, 2017). La pared celular de las plantas contiene altas cantidades de pectina ramificada, por lo que conforme avanza la maduración se activa la pectin-metil-esterasa que participa

liberando los grupos metilo de la pectina de la matriz y acidificando el pH al generar protones, lo que a su vez activa hidrolasas de la pared celular. Aunado a estas enzimas, también se activa la poligalacturonasa, celulasa y  $\beta$ -galactosidasa para el ablandamiento de la pared celular (Deepthi, 2017) y la  $\alpha$ - y  $\beta$ -amilasa para la ruptura del almidón en enlaces  $\alpha$ -(1-4) y  $\beta$ -(1,6) respectivamente, la cual está involucrada en conjunto con la degradación de la pared celular para el ablandamiento del fruto (Feng et al., 2020).

### **2.2.3.2 Cambios químicos**

Los cambios químicos que efectúan los frutos al madurar son la modificación del aroma y sabor, que en las guayabas blancas está dado por la transformación de los aldehídos (E)-2-hexenal y (Z)-3-hexenal en los ésteres, E-3-hexenil acetato y Z-3-hexenil acetato, además de la producción de sesquiterpenos cariofilenos como  $\alpha$ -humuleno y  $\beta$ -bisaboleno (Fabi et al., 2010). Aunque también se involucran otras 270 moléculas que incluyen compuestos diferentes de hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos, ésteres, compuestos sulfúricos, éteres, furanos y epóxidos (Deepthi, 2017).

### **2.2.3.3 Cambios bioquímicos**

Los cambios bioquímicos son las principales modificaciones que sufren los frutos en su maduración, desde la biosíntesis de etileno, degradación de almidón, producción de sacarosa, fibra dietética y vitaminas, modificación del color del fruto, etc. (Deepthi, 2017).

La biosíntesis del etileno está dada por el ciclo de yang, el cual tiene principal actividad en las etapas de maduración de los frutos (Rzewuski y Sauter, 2008). La hidrólisis del almidón por la  $\alpha$ - y  $\beta$ -amilasa producen glucosa y fructosa, que por acción de una invertasa se convierte en sacarosa. Estos azúcares producen compuestos volátiles responsables del dulzor y aroma de la guayaba (Feng et al., 2020). Por otro lado, la fibra dietética proviene posiblemente por la ruptura de la hemicelulosa, celulosa y lignina de la pared celular (Deepthi, 2017).

El ablandamiento de la pared celular está regulado por la solubilización y despolimerización de los polisacáridos de la pared celular y de sus rearrreglos posteriores, que cambian la fuerza mecánica de la pared y adhesión célula-célula. En esta actividad participan las pectinaesterasas quienes liberan las moléculas de xiloglucano-celulosa embebidas en la matriz de pectina (Goulao y Oliveira, 2008). Los oligosacáridos derivados de pectina promueven la producción de etileno de forma potenciada; este al aumentar la síntesis de poligalacturonasa que por su acción apoplástica genera oligosacáridos, promueve la biosíntesis de más etileno, repitiendo continuamente el ciclo (Bennett y Labavitch, 2008). El cambio de color verde a amarillo, blanco a crema y rosa-amarillento-rosa a salmón-rojo de las frutas de la guayaba está dado por dos procesos, el primero comienza con el decaimiento de la clorofila, junto

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

con la disgregación de los aparatos fotosintéticos, dada la activación de las clorofilasas, clorofiloxidasas y peroxidasas (Jain et al., 2001; Selvaraj et al., 1999). El segundo proceso es la biosíntesis de los pigmentos como carotenoides ( $\beta$ - caroteno), ésteres de xantofila y xantófilos (Prasanna et al., 2007).

#### **2.2.4 Estrés contra maduración**

La madurez de los frutos y los estreses bióticos y abióticos (excepto la temperatura) son procesos oxidativos que producen en su desarrollo especies reactivas de oxígeno (EROS), como el radical superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxilo ( $OH^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Huan et al., 2016). Las EROS son consideradas señales metabólicas y productos básicos de los procesos metabólicos normales, produciéndose incluso en el transporte de electrones de la fotosíntesis; no obstante, por ser radicales, al sobrepasar ciertas concentraciones producen un efecto tóxico en las células, causando la peroxidación de lípidos, daño en las membranas y la oxidación de carbohidratos, proteínas y DNA que resultan en la muerte celular (Huan et al., 2016; Batista et al., 2018).

Por otra parte, el estrés por altas temperaturas no produce EROS, sin embargo, demora varios aspectos de la maduración, como la pigmentación, ablandamiento, producción de volátiles y producción y señalización de etileno. La biosíntesis de etileno es reversiblemente inhibida a altas temperaturas, pudiendo recuperar su capacidad sintética al regresar a las condiciones normales de incubación de los frutos; esto se debe a que se disminuye el mRNA de la ACC oxidasa, evitando sintetizar más proteínas que conviertan el ACC a etileno, ya que la transcripción es susceptible a temperaturas  $>35^\circ C$  en un 75 %. El ACC acumulado reduce la producción de etileno para las frutas de jitomate y manzana, aunque no ocurre en frutas sujetas a altas temperaturas por un periodo prolongado (Paull y Jung, 2000).

Dada la toxicidad de los EROS, la célula utiliza enzimas y moléculas antioxidantes como defensa contra el exceso. Dentro de las enzimas se destacan las superóxido dismutasas (SOD), que son la primer defensa, sintetizando  $H_2O_2$  y disminuyendo el  $O_2^-$ . La catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX) descomponen al peróxido y  $ROOH^-$  en agua y  $O_2$ , finalizando con el estrés oxidativo (Huan et al., 2016), no obstante, también se activan la glutatión S transferasa y enzimas del ciclo asorbato-glutatión, así como la producción de moléculas antioxidantes como glutatión, tioredoxinas y cupredoxinas (Zheng et al., 2022), siendo estas últimas las proteínas encargadas de estabilizar el cobre (I) (InterPro, 2022).



### 2.2.5 Estrés por Cu en frutos

El cobre es un metal esencial para las plantas, participa en el transporte de electrones de la cadena respiratoria y compuestos fotosintéticos, en la señalización del etileno, metabolismo de la pared celular, en el desarrollo de las semillas, en la biogénesis de lignina que contribuye en la fuerza de los brotes y tallos; y lo más importante para esta investigación, en la protección del estrés oxidativo (Yruela, 2008). En condiciones normales el contenido de Cu en hojas es de 10-20 ppm en peso seco (Fidalgo et al., 2013), donde al sobrepasar los 20-30 ppm de Cu en la mayoría de las especies, la planta entra en estado de toxicidad, aunque se ha reportado tolerancia hasta 100-180 ppm en hoja de eucalipto (Lombardi y Sebastiani, 2005) y 131-190 ppm en peso seco en raíces y hojas de *Solanum nigrum*, respectivamente (Fidalgo et al., 2013). Ante el exceso de este metal, la planta atrofia el crecimiento de sus raíces para evitar la captura de más iones cobre, ayudado de micorrizas y exudados como fitoquelatinas, metalotioneinas, aminoácidos, ácidos orgánicos y proteínas de choque térmico que propician la quelación metálica de los iones Cu, además compartimentalizan aquellos iones internos en vacuolas para favorecer su salida, utilizando péptidos pequeños que actúan de ligandos (Fidalgo et al., 2013).

El estrés oxidativo generado por exceso de cobre induce la formación de EROS en las plantas, afectando la fisiología vegetal al tener un efecto perjudicial en el nitrógeno y por tanto en la producción de proteínas (Lombardi y Sebastiani, 2005). Asimismo, el cobre puede afectar la toma y transporte de otros metales como el Mn, Zn y Fe e incluso llega a sustituir el átomo de Mg en la estructura de la clorofila (Zhang et al., 2019), atrofiando la elongación de raíces, por ser el órgano de captura de estos iones (Fidalgo et al., 2013); además de afectar otras proteínas cloroplásticas como la ribulosa bifosfato carboxilasa oxigenasa (RubisCO) (Brahim y Mohamed, 2011). Además, los radicales libres inducidos generan daño a las proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos (DNA y RNA) y lípidos de membranas, peroxidándolos. A nivel macromolecular, el cobre tiene un efecto depresivo en la elasticidad de la pared celular, lo que termina en una reducción de la elongación celular de raíces y hojas, así como perturbar la integridad de las membranas de los tilacoides, generando necrosis y clorosis en el tejido vegetal (Posmyk et al., 2008).

La acumulación de EROS produce estrés oxidativo en las células que como defensa producen compuestos antioxidantes como glutatona, vitamina C, antocianinas, carotenoides, aminoácidos, principalmente prolina, así como enzimas antioxidantes (Zhang et al., 2019; Fidalgo et al., 2013). En plantas de tabaco se ha encontrado que al aumentar la dosis de 20 a 125 mg Cu/L se genera un incremento en la producción de las SOD de hasta un 260 % sin embargo, en altas dosis (500 mg/L) la actividad de la SOD disminuye hasta 63.14 %, ya que la producción de EROS en la planta excede

su capacidad de respuesta (López-Vargas et al., 2018; Ban et al., 2011).

El efecto del cobre en guayaba es muy variable, se ha reportado que la aplicación de una solución de sulfato de cobre al 0.4 % con la mitad de la cal hidratada a un árbol de cinco años de guayaba var. Allahabad Safeda indujo un incremento en la extensión de las raíces y número de hojas por brote, así como un aumento en el contenido de azúcares, vitamina C y pectina en el fruto de guayaba (Arora y Singh, 1971; Suman et al., 2017); de forma similar Kundo y Mitra demostraron que la aplicación de cobre con bromo y zinc en árboles de guayaba var. L-49 indujo la floración, aumentó el rendimiento y adelantó la madurez del fruto (Suman et al., 2017). Por contrario, se encontró que el uso de fungicidas como el mix bordeaux y los que utilizan oxiclورو de cobre (como CupraVit) reaccionan desfavorablemente en el fruto de guayaba, reduciendo su tamaño y propiciando el color rojizo en la fruta, disminuyendo la calidad del producto. Aunque los fungicidas carbendazim, benomyl y mancozeb no presentaron esta reacción fitotóxica (Gaikwad y Nimbalkar, 2005).

### **2.3 Estudios moleculares en el fruto de guayaba**

Ya que el árbol de guayaba está limitado a la propagación vegetativa por cortes, injertos, deposiciones y acodos aéreos, métodos lentos y de baja efectividad, se han hecho investigaciones para producir propagación clonal de células, tejido y cultivo de órganos, en medios apropiados que favorezcan su crecimiento y eviten la oxidación de los explantes (Rai et al., 2010). Se ha hecho uso de técnicas de micropropagación para la regeneración de brotes que puedan ser cultivados después en las huertas de guayaba; como la organogénesis en plántulas de guayaba variedad Safeda (Shah et al., 2008), embriogénesis somática para la variedad Barnarasi (Manoj et al., 2007) y la producción de semillas sintéticas al encapsular propágulos embriogénicos de guayaba en una matriz de 3 % alginato de sodio y 100 mM cloruro de calcio (Manoj et al., 2008).

Por otra parte, se han identificado fragmentos de genes como la  $\beta$ -1,4-endoglucanasa 17 y la  $\beta$ -galactosidasa 1 en frutos de guayaba las cuales son enzimas modificadoras de la pared celular activadas durante la maduración (Mendoza, 2022), así como la caracterización y perfilamiento de los miRNAs expresados durante diferentes estadios de maduración del fruto (Mendoza, 2022). De forma reciente, en 2020 y 2021 se secuenció el transcriptoma y genoma de la guayaba variedad Allahabad Safeda, originario de Uttar Pradesh, India y el cultivar New Age, originario de la Provincia Guangdong, China, respectivamente. El transcriptoma fue realizado por parte de Mittal et al. (2020) y el genoma por Feng y colaboradores (2021) el cual contiene anotaciones de 25,601 genes. Estas

investigaciones han sido esenciales para mejorar el entendimiento del delicado proceso de regulación de los genes y procesos involucrados en la maduración.

También se han utilizado marcadores moleculares para la identificación de diferentes variedades de guayaba, como el 18S rRNA, espaciadores internos de transcripción (ITS por sus siglas en inglés) los cuales se basan en el tamaño del intrón localizado entre la secuencia de las subunidades 18S y 28S ribosomal; espaciadores intergénicos trnL y trnF (IGS por sus siglas en inglés) que son las secuencias intergénicas de tres tRNAs cloroplásticas y DNA polimórfico amplificado al azar (RAPD por sus siglas en inglés) para identificar 18 especies de guayaba comerciales de Taiwán (Chen et al., 2007). Así mismo se han utilizado RAPDs para evaluar el germoplasma de frutos mexicanos (Padilla-Ramírez et al., 2002) y para identificar marcadores asociados a la alta acumulación de quercetina en hojas de guayaba mexicana, ya que tiene actividad farmacológica gastrointestinal (Feria-Romero et al., 2009). También se ha hecho uso de secuencias simples repetitivas (SSR por sus siglas en inglés) y de polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP por sus siglas en inglés) para la identificación de cultivares y mapeo de vínculos de 48 cultivares mexicanos (Rai et al., 2010).

### 2.3.1 miRNA generalidades

Los miRNAs son fragmentos de RNA no codificantes de 18-24 nucleótidos dentro del genoma de todas las células eucariontes (Li et al., 2019; Morales et al., 2022), regulan la expresión génica en niveles transcripcional, post-transcripcional y traduccional, evitando la síntesis del mRNA, degradándolo o reprimiendo la traducción del RNA mensajero de los genes objetivo del miRNA, respectivamente (Bi et al., 2015).

Los miRNAs de plantas son sintetizados de un precursor de RNA (pri-miRNA) no codificante por la RNA polimerasa II (RNA pol II) con la ayuda de los cofactores NOT2, CDK, CPL y CDCS (Fig. 4), el transcrito se modifica por la proteína de unión Cap (CPB por sus siglas en inglés) en su extremo 5' y por la RNA pol II quien pliega la hebra de RNA, formando la estructura característica hairpin o de bucle, estabilizada por la proteína DAWDLE (DDL). Seguido se acoplan los factores PRL1 y SE que favorecen el plegamiento de la enzima RNasa III, *Dicer Like-1* (DCL1) al pri-miRNA, formando complejos llamados cuerpos D. Los extremos 5' y 3' de la cadena son fosforilados por la enzima HLY1 para activar el corte por la DCL1 (líneas punteadas). El restante de la cadena pasa a nombrarse pre-miRNA, la cual por acción de la metiltransferasa *Hua Enhancer* (HEN1), es metilada en sus extremos. Posteriormente, el pre-miRNA es exportado al citoplasma con ayuda de la enzima HASTY, donde se pierde el grupo metilo de la cadena complementaria (3'-5') y es degradada por la nucleasa

degradadora de RNA (SDN por sus siglas en inglés). La hebra restante, es nombrada como miRNA maduro que forma el complejo de silenciamiento dirigido por RNA (RISC por sus siglas en inglés) al unirse a una proteína argonauta AGO1 (Li et al., 2019; Morales et al., 2020; Moxon et al., 2008). El complejo RISC ya formado también puede sintetizarse en el núcleo y después transportarse al citoplasma (Wahid et al., 2010). Este complejo se dirige hasta el RNA mensajero del gen objetivo para su regulación negativa, guiado por la cadena del miRNA, por una complementariedad casi perfecta con la secuencia del mRNA objetivo (Li et al., 2019; Morales et al., 2020; Moxon et al., 2008). La regulación del transcrito de los genes objetivo puede ser por tres posibles mecanismos, el primero es mediante la obstrucción en la transcripción del RNA objetivo, al acoplarse el complejo RISC a la cadena de ADN y, por tanto, evitando la transcripción del gen por la RNA pol II; el segundo es por corte del mRNA del gen objetivo como una enzima de restricción (Morales et al., 2022) y el tercer mecanismo ocurre en la traducción, en menor medida que los dos anteriores (Sablok, 2019). Se sugiere que involucra la disociación del ribosoma, sin embargo, diversos estudios sugieren que se debe a la unión del complejo RISC con la región de unión de la estructura cap 5' del mRNA, evitando el inicio de la traducción, por el momento este último mecanismo permanece desconocido (Wahid et al., 2010).

Los miRNAs regulan diferentes funciones dentro de la célula, ya sea animal o vegetal, como la proliferación celular, muerte celular, metabolismo de grasas, inmunidad, patrones neuronales, control de desarrollo de hojas, brotes, raíces y flores, maduración de frutos, respuesta a auxinas, respuesta contra estrés, entre otras (Wahid et al., 2010). Debido a la tecnología de secuenciación, miles de miRNAs de diferentes especies de plantas se han identificado y registrado en la base de datos miRBase21.0 (Bi et al., 2015).

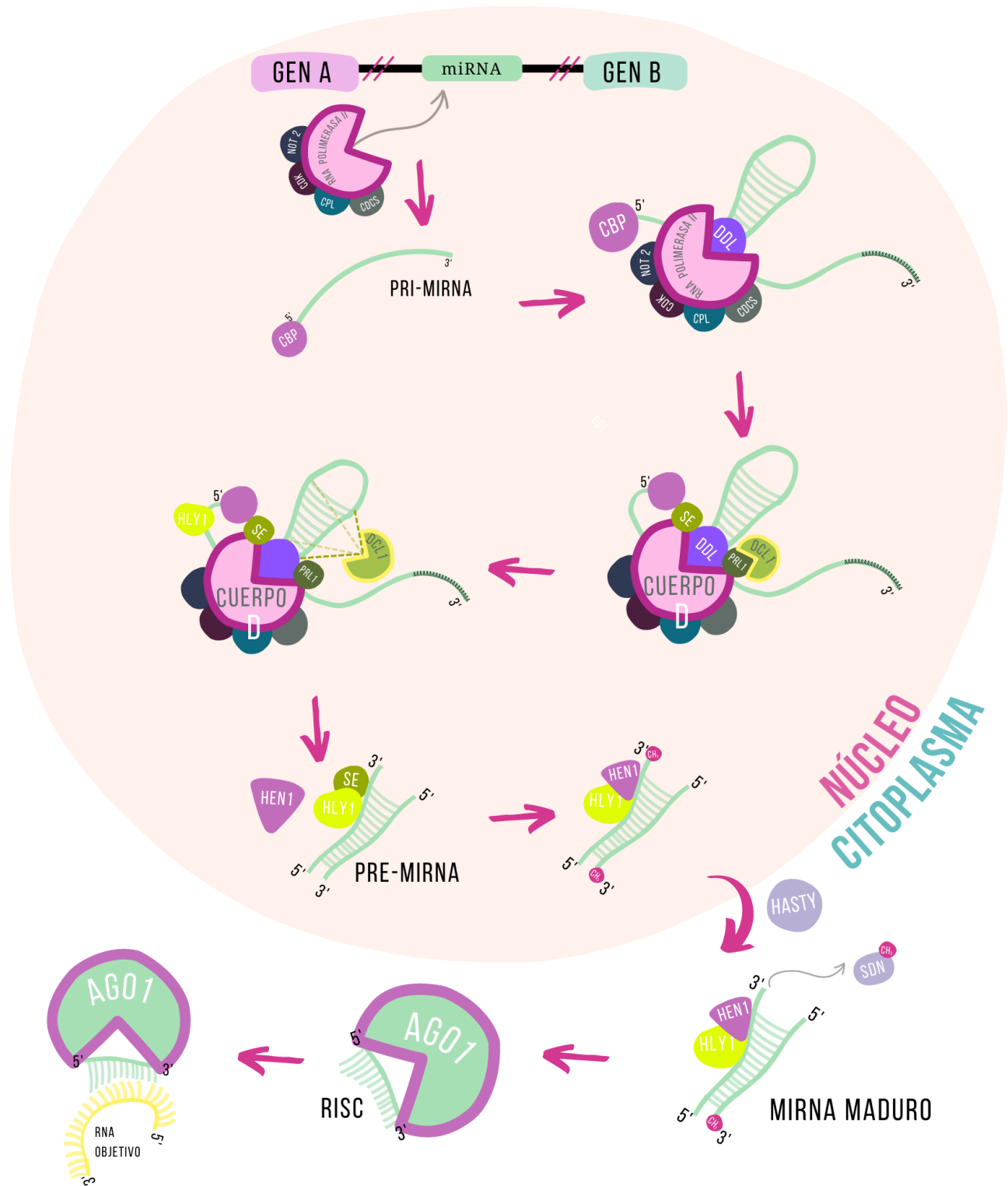


Figura 4. Síntesis de miRNA, modificado de Morales et al. (2022).

### 2.3.2 miRNAs encontrados en frutos climatéricos durante el proceso de maduración

Algunos miRNAs se han encontrado como reguladores del desarrollo y maduración de los frutos, por

ejemplo, el miRNA160 en jitomate (*Solanum lycopersicum*) regula la biosíntesis de auxinas, involucradas en el desarrollo de la planta, inducción de floración y maduración del fruto. El miRNA160 regula el factor de transcripción 22 del factor de respuesta a auxinas (ARF por sus siglas en inglés), además de los genes *SIGLK2* y *LeT6/TKn2*, los cuales aumentan la actividad fotosintética y la acumulación de azúcares del jitomate, por lo que al activarse el miRNA160 los frutos se mantienen verdes incluso en estadios más avanzados de maduración (Cedillo-Jimenez et al., 2020). El miRNA1917 está reportado como un regulador negativo del etileno y su expresión predomina especialmente en frutos, por ejemplo, en jitomate regula el gen *ctr4* que codifica para la proteína transportadora de residuos fosforilados en ausencia de etileno y además inhibe la proteína insensible al etileno EIN2, lo que evita la síntesis de genes relacionados con la producción de etileno (Cedillo-Jimenez et al., 2020). El miRNA398 suprime la expresión del gen de las SOD y por tanto elevan el contenido de EROS en los frutos que provocan la senescencia y maduración del fruto (Cohu et al., 2009).

Por otro lado, además del miRNA398, se han encontrado 20 miRNAs con 14 genes objetivo de SOD en algodón (*Gossypium hirsutum*), los cuales tienen 33 sitios posibles de unión al miRNA (Su et al., 2021), no obstante, se eligió el miRNA398, ya que se cuenta con la secuencia de los isotipos de miRNA398*a*, *b*, *c* y *d* en guayaba.

### 2.3.2.1 miRNA398

Se ha encontrado que los miRNAs también ayudan al crecimiento de las plantas bajo estrés metálico, mediante señalización sistemática, activando genes o factores de transcripción que disminuyen el efecto tóxico del metal, generando a la planta portadora del miRNA, una tolerancia ante el estrés metálico (Sablok, 2019). El cobre en altas concentraciones actúa de manera tóxica en las plantas, propiciando un estrés oxidativo, además inactiva la actividad del miRNA398, que regula de manera postranscripcional la expresión de las Cu/Zn superóxido dismutasa-1 y -2 (CSD1 y CSD2), resultando en una sobreacumulación de ambas enzimas (Cohu et al., 2009), mientras que en deficiencia de Cu, se reduce la transcripción de las CSD (Cu/Zn superóxido dismutasa), permitiendo la liberación del Cu a la plastocianina, cuproproteína involucrada en la cadena de transporte de electrones, para continuar con el crecimiento de la planta. Por lo que el miRNA398 actúa como un modulador de la homeostasis del Cu en las células vegetales, aunque también participan otras familias de miRNAs (miR) en este proceso, como la familia miR397, miR408 y miR857, que funcionan como represores que afectan a la lacasa y plastocianina en bajas concentraciones de Cu y en

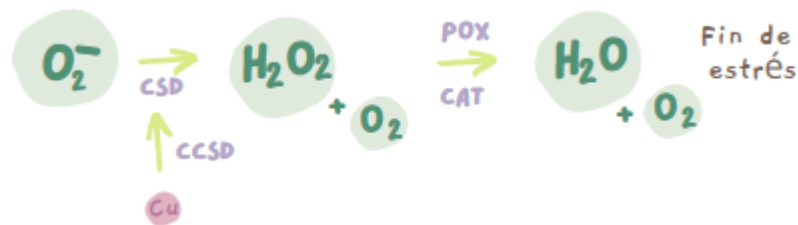


concentraciones tóxicas, mediante la regulación del miR857 en *Arabidopsis* (Sablok, 2019).

Hay tres diferentes isoformas de miR398 en *Arabidopsis*. Las secuencias del miR398b maduro y miR398c son idénticas, mientras que el miR398a maduro tiene una U en el final 3' donde el miR398b y miR398c tienen una G. Es posible que estas diferencias en el apareamiento de las bases tengan un decaimiento en la complementariedad y sensibilidad del objetivo (Cohu et al., 2009). En un estudio de guayaba, realizado en 2019 se realizó un perfilado de las familias de miRNAs relacionadas con la maduración del fruto, entre los estadios rayado y maduro y se encontraron 4 secuencias de miRNA398a, b, c y d (Tabla 5) (Mendoza, 2022). Entre estas secuencias, el miRNA398a y miRNA398c comparten una alta similitud, apareándose en la misma región de sus genes objetivo, mientras que el miRNA398b y miRNA398d comparten alta similitud, sin embargo, tienen una región diferente de unión a sus genes objetivo, con estos resultados se comprueba la existencia de este miRNA398 en el fruto de guayaba variedad Siglo XXI, el cual puede ser flanqueado partiendo de la secuencia del miRNA398 en el genoma/transcriptoma de guayaba.

### 2.3.2.2 Genes objetivo del miRNA398

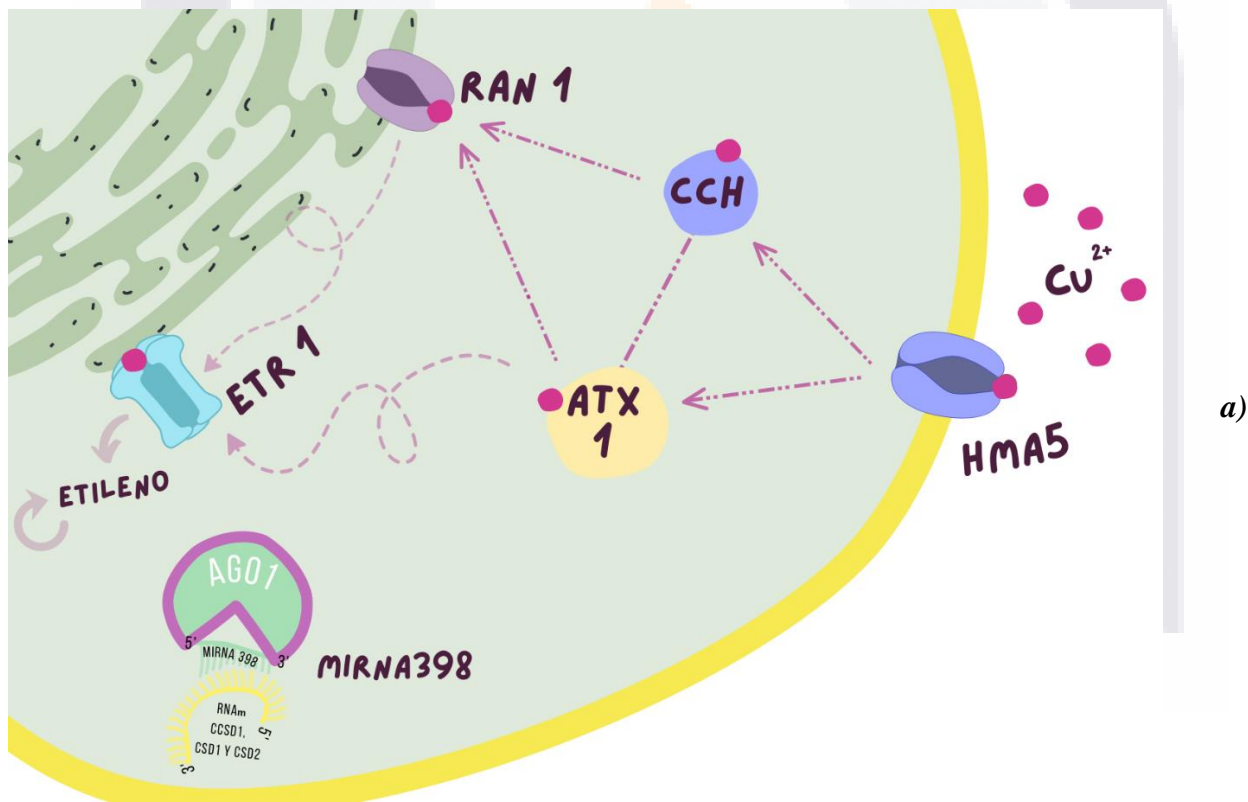
El miRNA398 tiene como objetivo los genes de la chaperona Cu/Zn superóxido dismutasa 1 (CCSD1), Cu/Zn superóxido dismutasa-1 y -2 (CSD1 y CSD2) y superóxido dismutasa X (SODX) en *Arabidopsis*. Estas enzimas funcionan de manera activa en las células que presentan estrés de tipo sequía, frío, heridas, oxidativo, estrés salino; aunque también regulan la resistencia a la enfermedad vegetal contra patógenos y maduración (Li et al., 2019), primero la CCSD1 recoge un ion de  $\text{Cu}^{+2}$ , el cual cede a las CSD1 y CSD2, activándolas, seguido estas enzimas reconocen el radical  $\text{O}_2^-$ , generado por el estrés oxidativo y lo convierten en  $\text{H}_2\text{O}_2$  adicionando agua, el peróxido generado será catalizado por la catalasa y peroxidasa, finalizando el estrés oxidativo (Fig. 5) (Cohu et al., 2009).

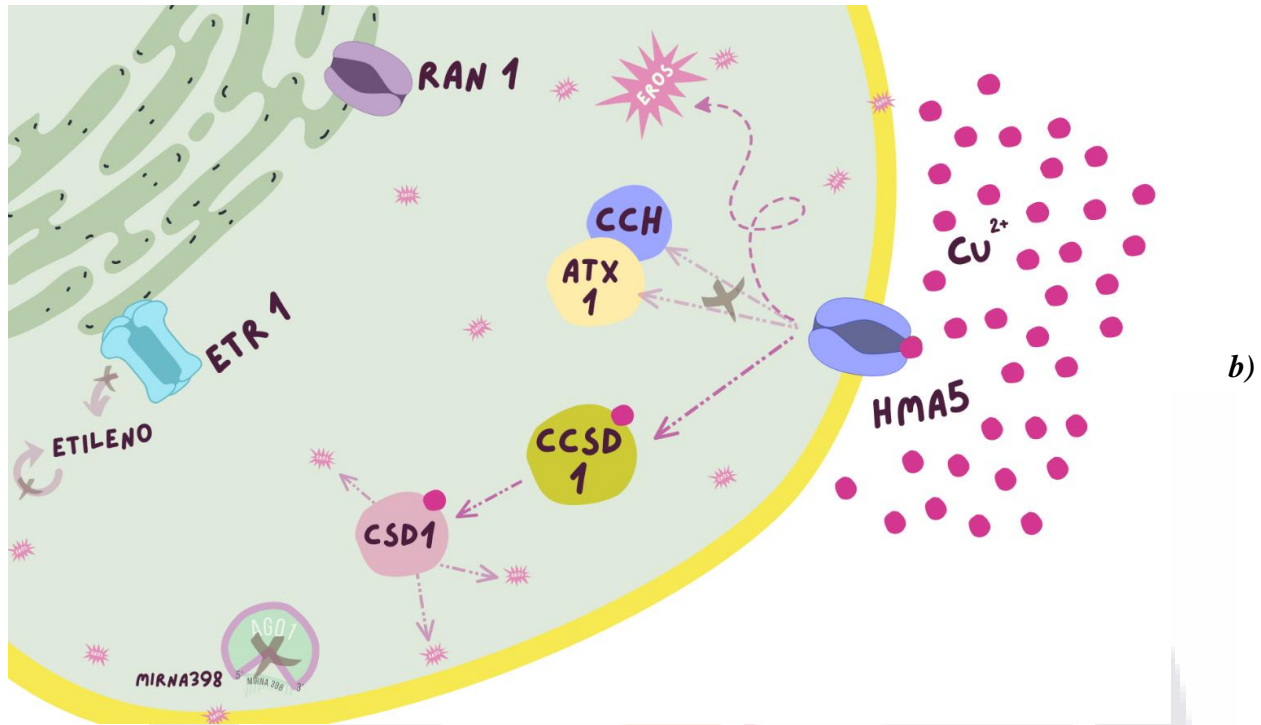


**Figura 5.** Mecanismo de acción de las enzimas antioxidantes de plantas ante estrés oxidativo.



Debido a su función, estas enzimas son las principales que actúan ante cualquier estrés oxidativo, como la maduración. Sin embargo, cuando se activa el miRNA398 en frutos de estadios rayado-maduro se reprime la síntesis de sus genes objetivo (Mendoza, 2022) y, por tanto, el Cu al no ser transportado por la CCSD1, lo captura la chaperona ATX1, quien se lo transfiere a la proteína respondedora antagonista-1 (RAN1) en el RE, donde se encuentra el receptor de etileno ETR1 (Hoppen et al., 2019); posteriormente el ion de Cu se reconoce a través del receptor ETR1, activando la cadena de señalización de etileno y por tanto autocatalizando la fitohormona, que propicia la maduración del fruto (Fig. 6a). Debido a esto, la estrategia propuesta en esta investigación requiere la inducción de un estrés por cobre a diferentes estadios de maduración de la guayaba, con la finalidad de silenciar el miRNA398 y sobreexpresar las enzimas CCSD1, CSD1 y CSD2, que se necesitan para disminuir la concentración letal de EROS, dado el estrés oxidativo inducido (Fig. 6b).





**Figura 6.** Transporte del Cu dentro de la célula. *a)* Transporte del Cu dentro de la célula por parte de la enzima HMA5, una vez dentro el cobre lo transportan las proteínas ATX1 y/o CCH hacia la RAN1 en el RE, que lo desplaza a la ETR1, al obtener el Cu la ETR1 activa la cascada de señalización del etileno, produciendo más fitohormona. *b)* Hipótesis propuesta en esta investigación, donde el estrés metálico por cobre sobreexpresa las CCSD1, CSD1 y CSD2, inactivando al miRNA398 y, por tanto, las EROS presentes en el fruto debido la maduración y el estrés oxidativo inducido, serán catalizadas por las CSD1 y CSD2. Además, se limita la acción de las ATX1, CCH y RAN1, al tomar la CCSD1 el Cu cedido por la HMA5 y evitando así el transporte a las otras chaperonas, decayendo con esto la cadena de reconocimiento y señalización del etileno, evitando la sobreproducción de etileno y, por tanto, la maduración del fruto.

### 2.3.2.2.1 Chaperona Cu/Zn Superóxido Dismutasa-1 (CCSD1)

La CCSD1 es uno de los genes objetivo del miRNA398 y es la encargada de la traslocación del Cu a las Cu/Zn superóxido dismutasa-1 y -2 (CSD1 y CSD2), por lo que es necesaria para el buen funcionamiento de las CSD1 y 2 en la mayoría de los organismos eucariontes (Boyd et al., 2018). Esta metalo-chaperona adquiere el cobre por transportadores membranales, como el ATX y CTR1, ya que, al ser un metal de transición, su movimiento a través de la célula está mediado por proteínas transportadoras (Wenlong et al., 2021) (Fig. 6a). El ion cobre lo transporta fuera de la membrana para prevenir la oxidación de los lípidos membranales (Boyd et al., 2019), entregando el cobre a las CSD1 y CSD2, en el citoplasma y cloroplasto, respectivamente (Cohu et al., 2009), además que oxida el enlace disulfuro de las dos CSD (Wenlong et al., 2021).

La CCSD1 contiene tres dominios conservados en su estructura, el primer dominio N-terminal

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

contiene el motivo de unión de cobre MXCXXC que se encarga en la captura e inserción del ion en el sitio de entrada de la CSD, pasando después al sitio activo por su afinidad termodinámica; el segundo dominio posee la secuencia y estructura homológica con la CSD y se encarga de enlazar físicamente la apo-CSD, para que actúe el tercer dominio C-terminal, que contiene el motivo CXC quien oxida la unión disulfido intrasubunitario conservado en la CSD (Wenlong et al., 2021).

La metalo-chaperona ha reportado presentar una versión citosólica y cloroplástica en *Arabidopsis*, ya que su gen tiene dos fragmentos de inicio ATG que flanquean a la secuencia de unión cloroplástica (Cohu et al., 2009).

#### **2.3.2.2.2 Cu/Z Superóxido Dismutasa-1 y -2 (CSD1 y CSD2)**

El miRNA398 tiene como gen objetivo además de la CCSD1, la Cu/Zn superóxido dismutasa-1 y -2 (CSD1 y CSD2), que tienen actividad en el citosol y cloroplasto, respectivamente (Cohu et al., 2009); ya que son genes conservados que cuentan con el mismo fragmento de secuencia que el miRNA398. Estas enzimas se encargan de disminuir los EROS de las células, incluyendo a los producidos por estreses bióticos y abióticos, para evitar la senescencia de las células, aunque en frutos se disminuye su actividad para favorecer la senescencia o maduración del fruto (Cohu et al., 2009; Huan et al., 2016). Ya que estas enzimas se encargan de eliminar el radical superóxido y convertirlo en peróxido de hidrógeno, este último regula su expresión, al igual que el cianuro (Hernández-Nistal et al., 2002).

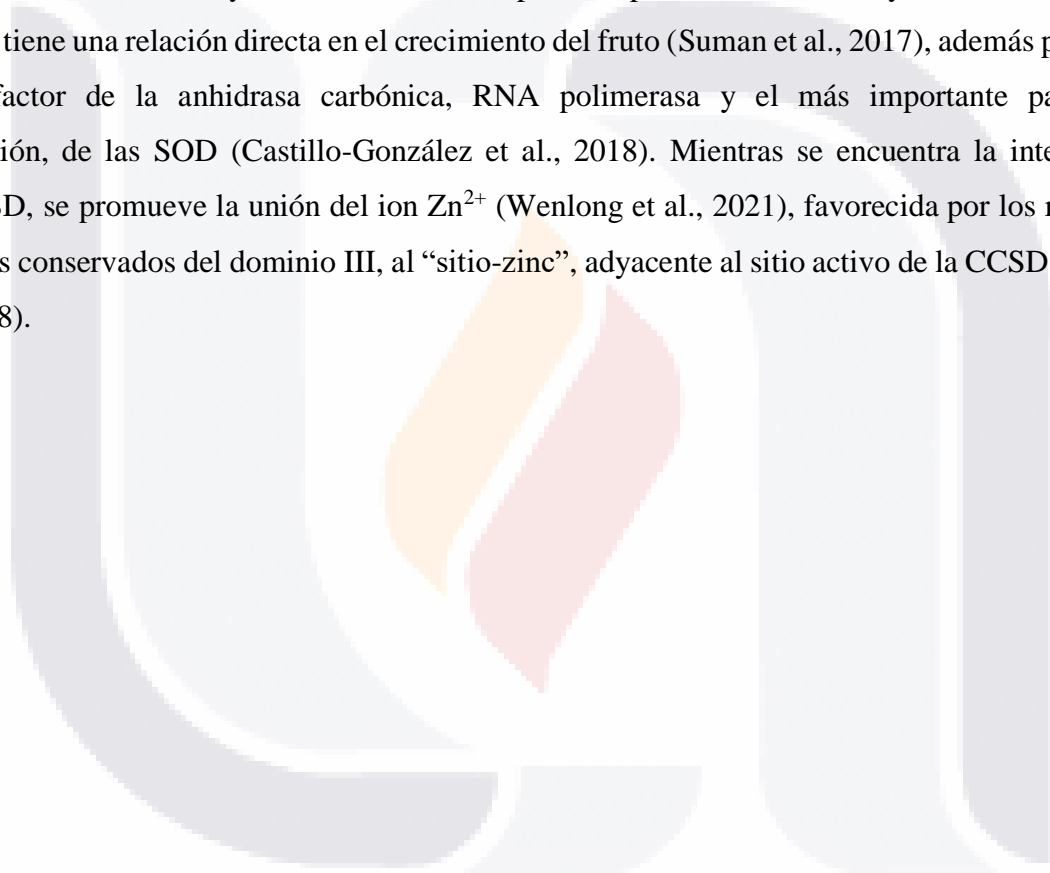
La CSD1 se encuentra en el citosol, mitocondria, peroxisomas y plastidios de las bacterias, levaduras y mamíferos (Pilon et al., 2011) en plantas también se encuentra en cloroplastos, glioxisomas, espacio extracelular y en la savia del floema, probablemente para aliviar el estrés producido de forma inmediata (Hernández-Nistal et al., 2002); sin embargo, está ausente en las primitivas células eucarióticas fotosintéticas. Mientras que la CSD2 únicamente se encuentra en cloroplastos.

Los genes codificantes para estas dos enzimas se encuentran en el núcleo, por lo que para la generación de la CSD2 es necesario que se transporte el mRNA en ribosomas 80S hasta el estroma, pasando por la maquinaria de importación de proteínas al cloroplasto via TOC/TIC de la membrana, donde el péptido de tránsito cloroplástico, codificado en el transcrito de la CSD2 se une a la peptidasa de secuencia de tránsito estromal, logrando con esto insertarse al cloroplasto (Pilon et al., 2011).

La CCSD1 cloroplástica tiene una secuencia más larga que la citoplasmática, ya que incluye en su secuencia el péptido de tránsito cloroplástico, para poder ingresar al cloroplasto y activar a la CSD2. En caso de una mala transcripción, la CCSD1 cloroplástica no podrá acceder y por tanto fungirá como CCSD1 citosólica (Pilon et al., 2011).

Una vez traducidas a apo-proteínas, tanto la CSD1 como la CSD2 necesitan un ion de  $\text{Cu}^{2+}$ , así como de la unión disulfuro para activarse. El ion  $\text{Cu}^{2+}$  se transporta por la HMA5 en el citosol (Hoppen et al., 2019) (Fig. 6a) y por la transportadora Cu PAA1 en el estroma del cloroplasto y lo cede a la CCSD1, quien lo toma e inserta en la CSD1 y CSD2 (Pilon et al., 2011).

Por otra parte, el zinc al igual que el Cu, es cofactor de las CSD, sin embargo, no actúa dentro del sitio catalítico de la enzima. El Zn se adquiere de suelos ácidos ( $\text{pH} < 5$ ) que eviten la lixiviación y solubilización de los metales presentes en este para evitar que disminuyan su disponibilidad. Una vez dentro de la célula, el  $\text{Zn}^{2+}$  ayuda a la síntesis de triptófano, precursor de auxina y ácido indolacético, por lo que tiene una relación directa en el crecimiento del fruto (Suman et al., 2017), además participa como cofactor de la anhidrasa carbónica, RNA polimerasa y el más importante para esta investigación, de las SOD (Castillo-González et al., 2018). Mientras se encuentra la interacción CCSD-CSD, se promueve la unión del ion  $\text{Zn}^{2+}$  (Wenlong et al., 2021), favorecida por los residuos aromáticos conservados del dominio III, al “sitio-zinc”, adyacente al sitio activo de la CCSD1 (Boyd et al., 2018).



### III. Justificación

La guayaba es un fruto de gran importancia económica y cultural en México y sobre todo en Aguascalientes, este es comercializado y exportado en diversas presentaciones como: fruto, en jaleas, dulces, licores, hasta concentrados farmacéuticos. No obstante, por ser un fruto climatérico y al ser su maduración dependiente de la respiración del etileno, problemáticas como la sobre maduración la hace propensa a sufrir daños de tipo mecánico y al ataque de varios patógenos, provocando grandes pérdidas económicas para los productores. Por lo cual el entendimiento de la maduración del fruto de guayaba es de suma importancia.

La producción de etileno se ve promovida por diversas enzimas, como la ACC oxidasa y las superóxido dismutasas (SOD), estas últimas encargadas de disminuir las especies reactivas de oxígeno que provocan la senescencia y maduración del fruto. Debido a esto, esta investigación pretende identificar y analizar la expresión en tiempo real de los tres genes objetivo del miRNA398: la chaperona Cu/Zn superóxido dismutasa-1 (CCSD1), Cu/Zn superóxido dismutasa-1 y -2 (CSD1 y CSD2), además de la ACC oxidasa en hoja y frutos de guayaba en tres diferentes estadios de maduración, previamente inducidos a estrés oxidativo por cobre.

Este trabajo será de gran relevancia para la comprensión del mecanismo de activación del miRNA398, su actividad reguladora en las SOD y su rol durante la maduración de la guayaba. Este proyecto se centra en el marco del objetivo 8 (trabajo y crecimiento económico) del desarrollo sostenible de la Organización de las Naciones Unidas (ONU) y en la meta número 2 (soberanía alimentaria, producción de alimentos sanos y agroecología campesina con énfasis en el cuidado del suelo, las semillas criollas y nativas y el sistema milpa) del Programa Nacional Estratégico (PRONACES). Además, es de gran interés para la Maestría de Ciencias Área Biotecnología Vegetal, ya que se tendrían colaboraciones con el INIFAP y CIBNOR.

### IV. Hipótesis

El fruto de guayaba expuesto a un estrés de cobre inducirá la expresión de los genes objetivo del miRNA398 (*chaperona Cu/Zn superóxido dismutasa-1 (CCSD1)*, *Cu/Zn superóxido dismutasa-1 y -2 (CSD1 y CSD2)*) y disminuirá la expresión de la *ACC oxidasa*.

## V. Objetivos

### 5.1 Objetivo general

Identificar los genes *CCSD1*, *CSD1*, *CSD2* y *ACC oxidasa* y analizar su expresión en diferentes órganos y estadios de maduración de la guayaba.

### 5.2 Objetivos específicos

- Caracterizar y analizar bioinformáticamente los genes *CCSD1*, *CSD1*, *CSD2* y *ACC oxidasa* y el miRNA398 *in silico* en especies pertenecientes a la familia *Myrtaceae* y otras relacionadas.
- Inducir estrés por cobre a los tejidos de guayaba (fruto, hoja y tallo).
- Medir marcadores de estrés: actividad de catalasa y concentración de antocianina y clorofila, haciendo relación con la producción de EROS en los tejidos con y sin estrés por cobre.
- Analizar la expresión de los genes *CCSD1*, *CSD1*, *CSD2* y *ACC oxidasa* en tiempo real en la hoja, tallo y frutos (verde, rayado y maduro) bajo estrés por cobre y sin estrés.

## VI. Metodología

### 6.1 Análisis bioinformático

Se realizó un análisis bioinformático de las proteínas putativas de *CCSD1*, *CSD1*, *CSD2* y *ACC oxidasa* de *P. guajava* L., obtenidas mediante una traducción de las secuencias putativas encontradas en el transcriptoma de *P. guajava* L. (GGPP00000000) en NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), mediante la herramienta Expasy translate (Gasteiger et al., 2003). Su secuencia nucleotídica (*CCSD1* (GGPP01025194.1), *CSD1* (GGPP01015210.1), *CSD2* (GGPP01015209.1) y *ACC oxidasa* (GGPP01053953.1)) se comparó con las proteínas homólogas de las especies *Actinidia deliciosa* (ASL04622.1), *Betula luminifera* (AKG50122.1), *Carya illinoensis* (XP\_042948475.1), *Citrus sinensis* (XP\_006477334.1), *Corymbia citriodora* (KAF8027436.1), *Eucalyptus grandis* (XP\_010055575.2), *Fragaria vesca* (XP\_004298717.1), *Glycine max* (NP\_001235441.1), *Hevea brasiliensis* (XP\_021663965.1), *Juglans regia* (XP\_018847248.2), *Populus trichocarpa* (XP\_002304450.1), *Prosopis alba* (XP\_028762786.1),



*Punica granatum* (XP\_031391999.1), *Rhodamnia argentea* (XP\_030538162.1), *Ricinus communis* (XP\_002509655.1), *Rosa chinensis* (XP\_024168786.1), *Syzygium oleosum* (XP\_030441559.1) y *Ziziphus jujuba* (XP\_015900348.1) para CCSD1; *A. chinensis* (PSR92657.1), *Arachis ipaensis* (XP\_016205468.1), *Beta vulgaris* (XP\_010674951.1), *Coffea arabica* (AXQ39586.1), *C. citriodora* (KAF7851728.1), *Durio zibethinus* (XP\_022742981.1), *E. grandis* (XP\_010041954.2), *Jatropha curcas* (XP\_012089157.1), *Litchi chinensis* (ABY65355.1), *Pistacia vera* (XP\_031259230.1), *P. tormentosa* (KAG6775157.1), *P. alba* (XP\_028770795.1), *P. granatum* (XP\_031405382.1), *R. argentea* (XP\_030520591.1), *S. oleosum* (XP\_030460681.1) y *Theobroma cacao* (XP\_017977636.1) para CSD1; *Arachis hypogaea* (XP\_029152107.1), *B. vulgaris* (XP\_010693815.1), *C. illinoisensis* (XP\_042946052.1), *D. zibethinus* (XP\_022718878.1), *E. grandis* (XP\_039161939.1), *Gossypium arboretum* (KHG04372.1), *H. brasiliensis* (XP\_021686055.1), *J. regia* (XP\_018820088.1), *Morus notabilis* (XP\_024024681.1), *P. vera* (XP\_031264773.1), *P. trichocarpa* (XP\_002319157.1), *P. alba* (XP\_028761275.1), *Prunus persica* (XP\_007202705.1), *P. granatum* (XP\_031394378.1), *Ricinus communis* (XP\_002525417.2), *R. argentea* (XP\_030520093.1), *S. oleosum* (XP\_030452835.1), *Vitis vinifera* (XP\_002281571.1) y *Z. jujuba* (XP\_015899364.1) para CSD2 y *A. chinensis* (PSS05950.1), *A. duranensis* (XP\_015973684.1), *Camellia sinensis* (XP\_028119787.1), *C. illinoisensis* (XP\_042971621.1), *C. arabica* (XP\_027062073.1), *C. citriodora* (KAF8008157.1), *E. grandis* (XP\_010035507.2), *H. brasiliensis* (XP\_021661849.1), *J. curcas* (XP\_012080647.1), *J. regia* (XP\_018840784.2), *M. alba* (AGN74918.1), *P. trichocarpa* (XP\_002320487.1), *P. persica* (AGF95124.1), *P. guajava* (AEC32837.1), *P. granatum* (XP\_031384128.1), *R. argentea* (XP\_030544344.1), *S. lycopersicum* (NP\_001234024.2), *S. oleosum* (XP\_030442421.1) y *Z. jujuba* (AEP19803.1) para ACC oxidasa; mediante un análisis filogenético y alineamiento múltiple, realizado con la herramienta Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>); para determinar el porcentaje de conservación de la proteína. Las propiedades fisicoquímicas (peso molecular, punto isoeléctrico, índice alifático, escala de valor GRAVY y características aminoacídicas) de las proteínas putativas de *P. guajava* fueron determinadas con la herramienta ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>). La búsqueda de dominios conservados se hizo en la plataforma de Prosite (<https://prosite.expasy.org/>; Sigrist et al., 2012). El modelado de estructura tridimensional se realizó utilizando la secuencia putativa de *P. guajava* en herramienta Swissmodels (Waterhouse et al., 2018), tomando como referencia los modelos: A0A218XT91.1.A

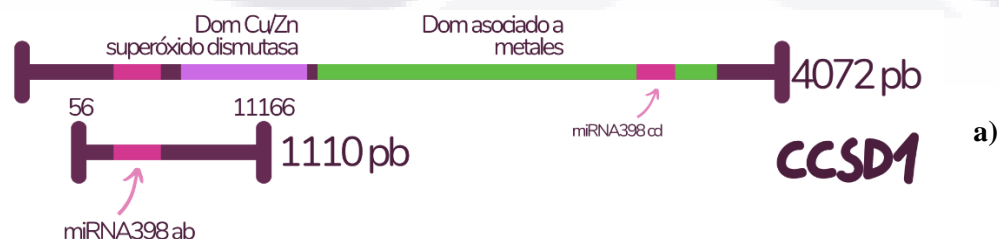
de *P. granatum* (CCSD1 73.93 % similitud) y 3km2.2.A de *S. lycopersicum* (CSD1 y CCSD2 67.33 % similitud) que fueron observados y modificados para resaltar la región del dominio con el programa UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004).

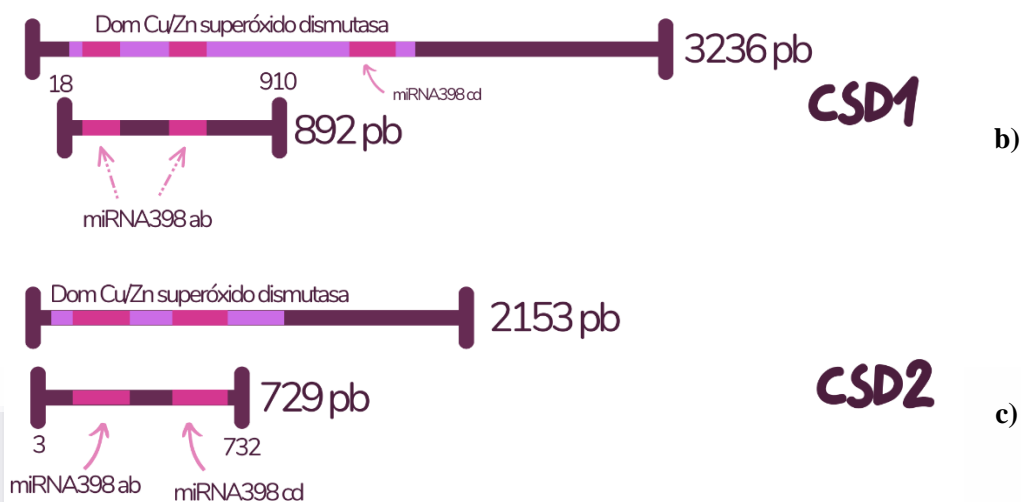
### 6.2 Diseño de oligonucleótidos

El diseño de los oligonucleótidos para CCSD1, CSD1 y CSD2 (Tabla 2) se realizó con el programa Primer3 input (versión 0.4.0) (Untergasser et al., 2012; Koressaar y Remm, 2007). Estos fueron diseñados para tomar la mayor parte de los dominios de cada gen, además de que flanquearan las secuencias objetivo de los miRNA398*a, b, c* y *d* marcadas con rosa (Fig 4).

**Tabla 2.** Propiedades de los oligonucleótidos diseñados para los genes CCSD1, CSD1 y CSD2 de *P. guajava*.

Oligonucleótido	Gen	Long. primer	Tm	% GC	Ta
GGGCCTGACCACTGTTTCTC	CSD1	20	61	60	53
AGTGAAGTAGACAGTTCCGCA		21	58	48	
GGAAAGATGGTGAAGGCTGTTG		22	59	50	54
TTGCCAAGATCATCAGGGTCTC		22	59	50	
ACAAC TAGAGACTACGGAGCA	CSD2	21	57	48	52
CTGCGCATCCACGATAGAAAC		21	59	52	
TTCTATCGTGGATGCGCAGG		20	60	55	54
TTGCGCAACTCAATACGCTG		20	59	50	
GAAGAGGGAAAATGGGGTTC	CCSD1	20	55	50	50
TCTGGCAAACCTTGGCCTAT		20	59	50	
AATATCTGCCGCTGTAGTGGA		21	58	48	53
CTCGTAGCTTCTCTTTGACGC		21	58	52	





**Figura 7.** Alineamiento de los cuatro isotipos del miRNA398 (*a, b, c y d*) con sus genes objetivo (*CCSD1, CSD1 y CSD2*). **a) CCSD1, b) CSD1 y c) CSD2.** La barra violeta superior indica al fragmento completo del gen de ADN, mientras que la inferior al fragmento flanqueado por los oligonucleótidos diseñados. Los rectángulos morado y verde corresponden a los dominios conservados del gen, siendo el dominio Cu/Zn superóxido dismutasa (morado) y al dominio asociado a metales (verde), mientras que los de color rosa indican la región de unión del miRNA398 en sus cuatro isotipos, *a, b, c y d*.

Los oligonucleótidos en tiempo real se diseñaron con la herramienta Primer3 input (versión 0.4.0) (Untergasser et al., 2012; Koressaar y Remm, 2007) de las regiones más conservadas de la secuencia nucleotídica de los genes *CCSD1, CSD1 y CSD2* de *R. argentea* (XM\_030682302.2, XM\_048281158.1 y XM\_030664233.2), *E. grandis* (XM\_010057273.3, XM\_010043652.3 y XM\_039306005.1) y *S. oleosum* (XM\_030585699.1, XM\_030604821.1 y XM\_030596975.1). Los fragmentos de 194, 163 y 212 pb, respectivamente, se compararon con el transcriptoma de guayaba (GGPP00000000), los cuales mostraron una similitud del 99 %, las diferencias se marcan en negritas en la Tabla 3. Para la *ACC oxidasa* se diseñó el par de oligonucleótidos utilizando la misma herramienta y partiendo de la secuencia de *ACC oxidasa* de *P. guajava* (HM124456.1), con un amplicón de 198 pb.

**Tabla 3.** Oligonucleótidos para tiempo real de *CCSD1, CSD1, CSD2* y *ACC oxidasa* de *P. guajava*.

Oligonucleótido	Gen	Long. primer	Tm	% GC	Ta
AGCCTGGACTTCACGGTTTC	<i>CSD1</i>	20	60.7	55	55
CCATCGTCACCCACATTCAC		20	60.3	55	
GTGAAAGGGAGGATCACC	<i>CSD2</i>	18	55.7	55.6	52
CCACGATAGAGACCTCAGCA		20	59.4	55	

AGACTTTGACTGAAGCGTTG	<i>CCSD1</i>	20	56.2	45	53
CCCAGGAGACAACCCACTAA		20	59.6	55	
GCGGCATCATCCTACTCTTC	<i>ACC</i>	20	59.5	55	54
TGGACATCCTGTTCCCATCT	<i>oxidasa</i>	20	59.2	50	

### 6.3 Recolección de material vegetal

Durante el mes de diciembre del 2021 se recolectó el material vegetal (hojas y fruto verde, rayado y maduro), de un árbol de *P. guajava* de la variedad media china, Siglo XXI, localizado en el campo experimental “Cañones” INIFAP en el municipio de Huanusco, Zacatecas, México (latitud 21 °44’43.6’’N; longitud 102°58’0.20’’W), envasándose en bolsas de plástico hasta su uso.

### 6.4 Inducción de estrés por Cu

Con la finalidad de sobre expresar las enzimas antioxidantes (*CCSD1*, *CSD1* y *CSD2* (*CSD*)) se sometieron los materiales vegetales a un estrés por cobre; para esto, se tomaron tres muestras de cada órgano (hoja y fruto en diferente estadio de maduración) y su pedúnculo se sumergió en un frasco de 100 mL con solución de  $\text{CuSO}_4$  50 mM durante 15, 30, 45 y 60 min, 2, 4, 8 y 12 h, con control inicial. Pasado el tiempo se diseccionaron en 1 g para la cuantificación de Cu y el resto se pulverizó con nitrógeno líquido y mantuvo a -80 °C hasta su uso.

Para la cuantificación de cobre, se tomó 1 g de muestra de cada tratamiento y control (por triplicado) y se secó por 48 h a 75 °C. Se pesaron 10 mg de cada muestra y transfirieron a un tubo eppendorf con 1 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado, se mantuvo la digestión hasta eliminar sólidos en suspensión por 5 días, pasado el tiempo se incubó a 63-65 °C por 1 h. La digestión se transfirió a un tubo de vidrio con tapa de rosca, estéril y previamente lavado con  $\text{HNO}_3$  y aforó el volumen de la disolución a 10 mL con agua desionizada, para tener 1 mg de tejido vegetal/mL. Las muestras se analizaron mediante espectrofotometría de absorción atómica en el laboratorio de fisicoquímica del ISSEA utilizando un espectrofotómetro Analyst AS-90Plus.

### 6.5 Cuantificación de marcadores de estrés

#### 6.5.1 Actividad de catalasa

El tejido pulverizado previamente con nitrógeno líquido se transfirió hasta la marca de 0.1 mL en

un tubo eppendorf y se mezcló con 1 mL de buffer de extracción (100 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8 y 0.2 % tritón) y recuperó el extracto acuoso. Para determinar la concentración proteica, se utilizó el método espectrofotométrico Bradford midiendo a 595 nm, utilizando como estándar albúmina sérica de bovino. Se tomó 200  $\mu$ L del extracto proteico con 800  $\mu$ L de buffer de reacción de catalasa (buffer fosfatos 0.05 M pH 7 y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1 mM) y midió su absorbancia a 240 nm a los 10, 40 y 70 s después de hacer la mezcla, utilizando como blanco buffer de fosfatos. La actividad de catalasa se calculó con la ecuación 1, donde  $\epsilon$  representa al coeficiente de extinción, el cual es 0.12:

$$\text{Actividad de catalasa} = \frac{\Delta Abs_{240}}{\epsilon [Prot]} \quad \text{Ecuación 1}$$

### 6.5.2 Cuantificación de clorofila

Para la determinación de clorofila, se incubó 5 mg de la hoja y 50 mg de la cáscara y pulpa de los frutos con y sin estrés por Cu (por triplicado), en 1 mL de etanol al 96 % (v/v) a 4 °C y oscuridad por tres días. Después se midió la absorbancia del sobrenadante a 649 y 665 nm en cada una de las muestras. El cálculo de la clorofila total se realizó con las siguientes tres ecuaciones:

$$\text{Clorofila } a = 13.95 \times Abs_{665} - 6.88 \times Abs_{649} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$\text{Clorofila } b = 24.96 \times Abs_{649} - 7.32 \times Abs_{665} \quad \text{Ecuación 3}$$

$$\text{Clorofila total } (\mu g/g) = Cla + Clb \quad \text{Ecuación 4}$$

### 6.5.3 Cuantificación de antocianina

Se incubó 5 mg de la hoja y 50 mg de los frutos con y sin estrés por Cu (por triplicado), con 1 mL de metanol/HCl en relación 99:1 a 4 °C y oscuridad por un día. Después se midió la absorbancia del sobrenadante a 530 y 657 nm. El cálculo de las unidades relativas de antocianina (URA) se hizo con la siguiente ecuación:

$$URA/g = Abs_{530} - 0.25 \times Abs_{657} \quad \text{Ecuación 5}$$

### 6.6 Extracción ácidos nucleicos

Se extrajeron los ácidos nucleicos de todos los materiales vegetales (hoja, fruto verde, rayado y maduro) con diferentes tratamientos de estrés por Cu en diferentes tiempos con el método de

bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) modificado de Doyle & Doyle (1987). El material previamente pulverizado con N<sub>2</sub> líquido se pasó a un tubo eppendorf hasta la marca de 0.1 mL y adicionó 700 µL de buffer de lisis (CTAB 3%, PVP 2 %, EDTA 25 mM pH 8, Tris-HCl 100 mM pH 8, NaCl 2 M, aforado con agua destilada a 10 mL) precalentado a 65 °C, se mezcló vigorosamente en vórtex e incubó a 65 °C/5 min con agitación intermitente. Seguido, se agregó 700 µL de cloroformo-alcohol isoamílico 49:1 y agitó hasta emulsificar, la mezcla se centrifugó a 13,000 rpm/10 min y recuperó la fase acuosa. Se agregó un volumen de fenol-cloroformo 1:1, emulsificó y centrifugó a 13,000 rpm/10 min; se recuperó la fase acuosa y agregó un tercio del volumen de LiCl 8 M para la precipitación de RNA o 1 volumen de etanol absoluto y 0.3 volúmenes de acetato de potasio 1.8 M para la precipitación de DNA; esto se incubó a 20 °C por toda la noche o a -80 °C por 30 min. Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm/15 min para la obtención de la pastilla; se decantó y enjuagó con 1 mL de etanol al 70 %. La pastilla se centrifugó a 10,000 rpm/5 min, decantó, dejó secar y resuspendió en 20 µL de agua DEPC. La pastilla se almacenó a -80 °C hasta su uso.

### **6.7 Síntesis de cDNA**

El cDNA se sintetizó con el kit comercial Taqman miRNA assays de Thermo Fisher Scientific®, bajo la reacción de 1.72 µL de buffer RT 10X, 0.17 µL de dNTPs mix 100 mM, 1.14 µL de la enzima RT, 0.22 µL del inhibidor de RNasa y 4.75 µL de agua inyectable, con un volumen final de 8 µL, el cual se mezcló con 7 µL de RNA, seguido esto se corrió bajo las condiciones de 16 °C por 30 min, 42 °C por 30 min y 85 °C por 5 min. La veracidad de la reacción se verificó mediante una prueba PCR de actina y/o ACC oxidasa.

### **6.8 PCR**

Para la PCR se utilizó el kit de la marca comercial Agilent de Thermo Fisher Scientific®, bajo la reacción de 5 µL del master mix, 0.5 µL de cada oligonucleótido, 1 µL de cDNA y 3 µL de agua libre de nucleasas. Los oligonucleótidos utilizados para cada gen de interés se describen en el Tabla 2.

El programa utilizado en el termociclador para la PCR inició con una desnaturalización a 95 °C/10



min, seguido 35 ciclos: desnaturalización a 95 °C/1 min, alineamiento a 52 °C (*CCSD1*), 53 °C (*CSD1*) y 54 °C (*CSD2*) durante 1 min y una extensión a 72 °C/1.5 min; con una extensión final a 72 °C/10 min. Para los primers de tiempo real las condiciones utilizadas fueron 94 °C/4 min, seguido 35 ciclos: desnaturalización a 94 °C/30 s, alineamiento a 49 °C (*CSD1*) y 59 °C (*ACC oxidasa*) durante 30 s y una extensión a 72 °C/40 s y una extensión final a 72 °C/7 min.

### **6.9 Análisis de expresión por qPCR**

La qPCR se utilizó el kit Radiant™ Green Lo-ROX qPCR kit, bajo la reacción de 5 µL del Radiant green 2X qPCR mix Lo-ROX, 0.4 µL de cada oligonucleótido (400 mM concentración final), 1 µL de cDNA (< [100 ng/µL]) y 3.3 µL de agua libre de nucleasas. Los oligonucleótidos utilizados para cada gen de interés se describen en el Tabla 3. El gen de referencia fue *25S*, utilizando como oligonucleótidos de *S. lycopersicum* forward 5' CGTAAGGCGTAAGGAAGCTG 3' y reverse 5' TCGGAGGGAACCAGCTACTA 3'.

El programa utilizado en el termociclador para la PCR inició con una desnaturalización a 95 °C/2 min, seguido 35 ciclos: desnaturalización a 95 °C/ 5 s, alineamiento y extensión a 60 °C durante 20 s y finalmente a 95 °C/5 min. La reacción se corrió en una placa de 96 pozos en un termociclador CFX96™ Real-Time System y los resultados se analizaron con el programa Bio-Rad CFX Maestro.

### **6.10 Análisis estadísticos**

Los resultados de los marcadores de estrés se realizaron por triplicado, mientras que el análisis de expresión por qPCR fue por duplicado. Los datos se analizaron en GraphPad Prism 7.0, calculando la media y desviación estándar de cada tratamiento. Para el análisis de los datos se realizó un ANOVA de dos vías con prueba de significancia Tukey,  $\alpha$  0.05.

## VII. Resultados y discusión

### 7.1 Análisis bioinformático

Los análisis de similitud BLASTn y BLASTp en conjunto con el dendrograma de distancia evolutiva de la proteína CCSD1, CSD1 y CSD2 se realizaron utilizando las secuencias arrojadas del transcriptoma de guayaba (GGPP00000000) al alinear la secuencia nucleotídica de las proteínas del mirto blanco (*R. argentea*), ya que se encuentra mayor relación evolutiva contra la guayaba (Fig. 8 y 9 (CCSD1), 10 y 11 (CSD1) y 12 y 13 (CSD2)), además de los organismos presentados en la Tabla 4. Estos resultados indican que la proteína se encuentra conservada entre las especies pertenecientes a la familia *Myrtaceae* y otras especies relacionadas, con un porcentaje de similitud mínimo de 70 % (Tabla 4). Estas Cu/Zn superóxido dismutasas se encuentran conservadas en el genoma de una gran variedad de procariontes y eucariontes en una o varias copias, sin embargo, existen pocos estudios de la evolución en la secuencia de las Cu/Zn SOD (Zhou et al., 2022). El análisis más reciente se realizó por parte de Zhou et al. (2022) en 21 especies diferentes que van desde algas verdes hasta plantas superiores, incluyendo un miembro de la familia *Myrtaceae* (*E. grandis*), donde se mostró una alta conservación del gen de las Cu/Zn SOD entre los linajes *Charophyte*, *Bryophyte*, *Pteridophyta* y angiospermas. Por otra parte, se agruparon las especies cuya secuencia aminoacídica contenía el dominio de asociación a metales pesados, además del dominio Cu/Zn SOD, en el cual no se incluye la proteína de *E. grandis*. Estos resultados contrastan con los obtenidos, pues en el alineamiento múltiple (Fig. 9 y 12) la región conservada entre las especies de la familia *Myrtaceae* y de frutos climatéricos corresponde al dominio de asociación de metales y el dominio parcial de Cu/Zn SOD (95-230 aa), donde se incluye además de la CCSD1 de *E. grandis* y *P. guajava*.

Respecto a su tamaño, todas las especies indicaron una longitud promedio de 326.5, 153.7 y 160.8 aa, para CCSD1, CSD1 y CSD2, respectivamente; excepto las proteínas putativas de *P. guajava* quienes, al no estar caracterizadas, no se conoce su tamaño exacto, sin embargo, al realizar una traducción de las secuencias putativas encontradas en el transcriptoma de *P. guajava* L., se obtuvo una secuencia putativa de 330 aa (marco de lectura 3 de 3'5'), 152 aa (marco de lectura 2 de 5'3') para CSD1 y de 156 aa (marco de lectura 1 de 5'3') para CSD2, concordando con el tamaño anteriormente reportado.

**Tabla 4.** Identificación y características de las secuencias de CCSD1, CSD1 y CSD2 utilizadas para el alineamiento múltiple.

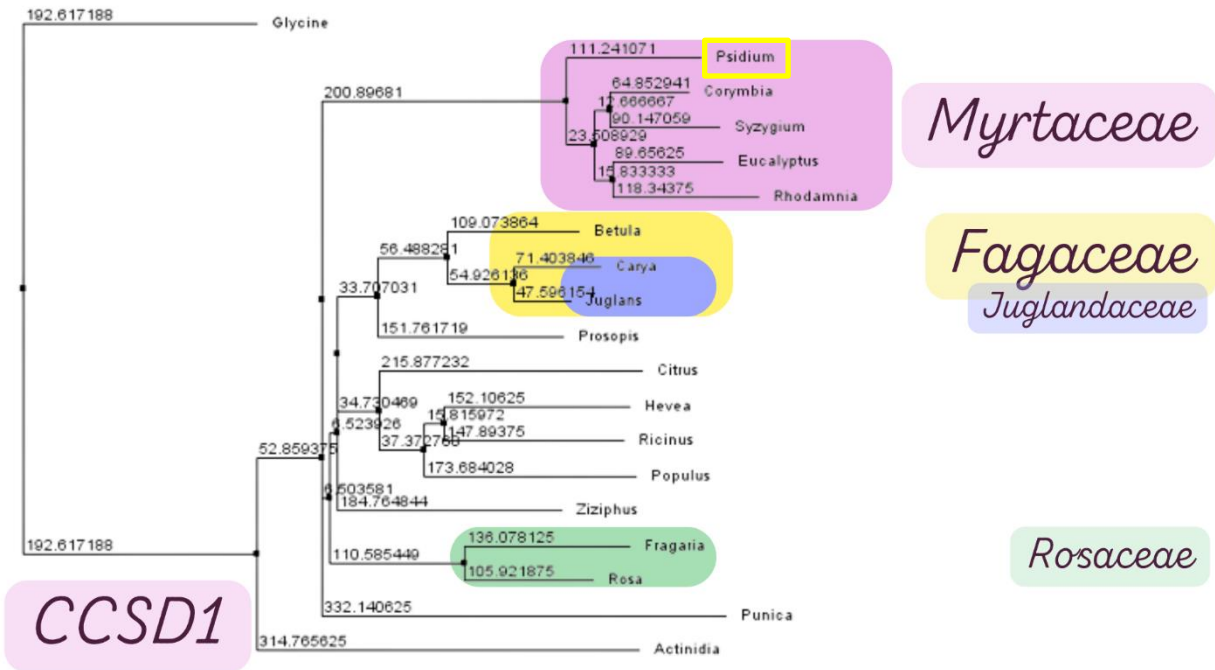
Gen	Organismo	ID	Longitud (aa)	% Similitud
CCSD1	<i>Psidium guajava</i>	GGPP01025194.1	330	100
	<i>Actinidia deliciosa</i>	ASL04622.1	315	73
	<i>Betula luminifera</i>	AKG50122.1	323	80
	<i>Carya illinoensis</i>	XP_042948475.1	323	80
	<i>Citrus sinensis</i>	XP_006477334.1	325	77
	<i>Corymbia citriodora</i>	KAF8027436.1	335	90
	<i>Eucalyptus grandis</i>	XP_010055575.2	340	90
	<i>Fragaria vesca</i>	XP_004298717.1	325	70
	<i>Glycine max</i>	NP_001235441.1	304	80
	<i>Hevea brasiliensis</i>	XP_021663965.1	324	79
	<i>Juglans regia</i>	XP_018847248.2	323	80
	<i>Populus trichocarpa</i>	XP_002304450.1	323	77
	<i>Prosopis alba</i>	XP_028762786.1	325	76
	<i>Punica granatum</i>	XP_031391999.1	333	71
	<i>Rhodammia argentea</i>	XP_030538162.1	343	92
	<i>Ricinus communis</i>	XP_002509655.1	330	78
	<i>Rosa chinensis</i>	XP_024168786.1	323	70
	<i>Syzygium oleosum</i>	XP_030441559.1	335	85
	<i>Ziziphus jujuba</i>	XP_015900348.1	328	75
CSD1	<i>Psidium guajava</i>	GGPP01015210.1	152	100
	<i>Actinidia chinensis</i>	PSR92657.1	152	91
	<i>Arachis ipaensis</i>	XP_016205468.1	152	86
	<i>Beta vulgaris</i>	XP_010674951.1	152	88
	<i>Coffea arabica</i>	AXQ39586.1	152	89
	<i>Corymbia citriodora</i>	KAF7851728.1	152	95
	<i>Durio zibethinus</i>	XP_022742981.1	152	89
	<i>Eucalyptus grandis</i>	XP_010041954.2	152	96
	<i>Jatropha curcas</i>	XP_012089157.1	152	88
	<i>Litchi chinensis</i>	ABY65355.1	152	91
	<i>Pistacia vera</i>	XP_031259230.1	152	89
	<i>Populus tormentosa</i>	KAG6775157.1	171	90
	<i>Prosopis alba</i>	XP_028770795.1	160	90
	<i>Punica granatum</i>	XP_031405382.1	152	89

	<i>Rhodamnia argentea</i>	XP_030520591.1	152	94
	<i>Syzygium oleosum</i>	XP_030460681.1	152	88
	<i>Theobroma cacao</i>	XP_017977636.1	152	88
	<b><i>Psidium guajava</i></b>	<b>GGPP01015209.1</b>	<b>156</b>	<b>100</b>
	<i>Arachis hypogaea</i>	XP_029152107.1	181	84
	<i>Beta vulgaris</i>	XP_010693815.1	157	79
	<i>Carya illinoensis</i>	XP_042946052.1	156	81
	<i>Durio zibethinus</i>	XP_022718878.1	161	82
	<i>Eucalyptus grandis</i>	XP_039161939.1	156	92
	<i>Gossypium arboreum</i>	KHG04372.1	161	84
	<i>Hevea brasiliensis</i>	XP_021686055.1	165	82
	<i>Juglans regia</i>	XP_018820088.1	156	81
	<i>Morus notabilis</i>	XP_024024681.1	156	80
	<i>Pistacia vera</i>	XP_031264773.1	163	84
	<i>Populus trichocarpa</i>	XP_002319157.1	158	84
	<i>Prosopis alba</i>	XP_028761275.1	160	82
	<i>Prunus persica</i>	XP_007202705.1	156	81
	<i>Punica granatum</i>	XP_031394378.1	185	86
	<i>Ricinus communis</i>	XP_002525417.2	159	82
	<i>Rhodamnia argentea</i>	XP_030520093.1	156	92
	<i>Syzygium oleosum</i>	XP_030452835.1	156	91
	<i>Vitis vinifera</i>	XP_002281571.1	156	83
	<i>Ziziphus jujuba</i>	XP_015899364.1	158	81

CSD2

### 7.1.1 CCSD1

Para la proteína CCSD1, se utilizaron 18 especies dicotiledóneas, pertenecientes a la clase *Magnoliópsida* en las que se incluyeron cinco especies de la familia *Myrtaceae*, dos de la *Rosaceae* y *Juglandaceae* y tres especies del orden de los *Fagales* (Fig. 8). Las secuencias aminoacídicas de las CCSD1 mostraron una alta similitud entre su secuencia en la región 95-230, con una diferencia entre 7-54 aa para la mayoría de las especies (Fig. 9a), ya que la región abarca en su totalidad al dominio de asociación de metales y de forma parcial al dominio de SOD, incluyendo la secuencia intermedia entre estos dominios, por lo cual el alineamiento múltiple muestra una secuencia aminoacídica no completamente conservada entre las especies probadas, con excepción de la región de los dominios.



**Figura 8.** Dendrograma de distancia evolutiva de la enzima CCSD1 de organismos pertenecientes de la familia *Myrtaceae* y otras. En colores se clasifican las familias *Myrtaceae* (morado), *Juglandaceae* (azul), *Rosaceae* (verde) y el orden de las *Fagaceae* (azul), donde en recuadro amarillo se destaca la *P. guajava*. El árbol fue diseñado en la herramienta de Jalview mediante un análisis de distancia promedio por PAM250.

A pesar de que la CCSD1 contiene en su estructura tres dominios conservados, la secuencia aminoacídica de CCSD1 de *P. guajava* únicamente presentó dos dominios (Fig. 9b). El primer dominio (97-160 aa) asociado con metales pesados, responsable de la captura del ion de Cu mediante dos residuos aminoacídicos de cisteína (108 y 111 aa) encargados de la unión al metal (Sigrist et al., 2012), así como de insertarlo en el sitio activo de las CSD1 y CSD2. El segundo dominio (186-287) corresponde al sitio activo Cu/Zn superóxido dismutasas, que comparte con la CSD1 y CSD2, por lo que se encarga del enlazamiento entre estas dos enzimas para dar seguimiento al tercer dominio, que oxida el disulfuro estructural de la CSD (Wenlong et al., 2021).

La estructura tridimensional (Fig. 9b) se construyó utilizando la plataforma Swiss model (Waterhouse et al., 2018), introduciendo la secuencia aminoacídica traducida de la CCSD de *P. guajava*, utilizando como plantilla la CCSD de *Punica granatum*. La similitud entre las estructuras de estas dos proteínas es aproximadamente 73.93 %, por lo que en el empalme entre las proteínas CCSD putativa de *P. guajava* y CCSD de *P. granatum* genera una estructura casi idéntica a la putativa de guayaba (Fig. 9c).



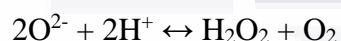
**Figura 9.** Conservación de la CCSD1 en diferentes especies y estructura tridimensional de la CCSD1 de *P. guajava*. **a)** Alineamiento múltiple de CCSD1 en diferentes especies de la familia *Myrtaceae* y otras especies. La región conservada (95-230 aa, recuadro rojo) corresponde al dominio asociado con metales pesados y al dominio de Cu/Zn superóxido dismutasa. En amarillo se indica *P. guajava*. La barra amarilla indica que el aminoácido se encuentra en todos los organismos, conforme se achica y opaca la barra menos conservado se encuentra su secuencia aminoacídica. **b)** Estructura tridimensional de la CCSD putativa de *P. guajava* (negro), utilizando como templado la CCSD de *Punica granatum* (A0A218XT91). Dominio asociado con metales pesados correspondiente a la secuencia 97-160 aa (morado) y dominio cobre/zinc superóxido dismutasa entre el aminoácido 186-287 (azul). **c)** Empalme de las estructuras 3D de CCSD de *P. guajava* (negro y dominios morado y azul) y CCSD de *P. granatum* (blanco).

El dominio Cu/Zn superóxido dismutasa (segundo dominio) se comparte entre las tres CSD (CCSD1, CSD1 y CSD2), ya que este dominio, como el sitio de unión a  $\text{Cu}^{2+}$ , se encuentra conservado desde las proteínas CuSOD provenientes de algas verdes (Zhou et al., 2022), como entre las CuSOD extracelulares exclusivas de hongos de la roya y oomicetos, que están ancladas a glucolípidos de la superficie celular para la eliminación de las EROS producidas por patógenos (Zheng et al., 2020). En cuanto a las plantas, se ha reportado que la proteína CCSD1 de *A. thaliana* que recibe el nombre de AtCCS, contiene tres dominios, el dominio N-terminal ATX1-like que contiene el sitio de unión a Cu, que corresponde al dominio de unión a metales pesados, el dominio



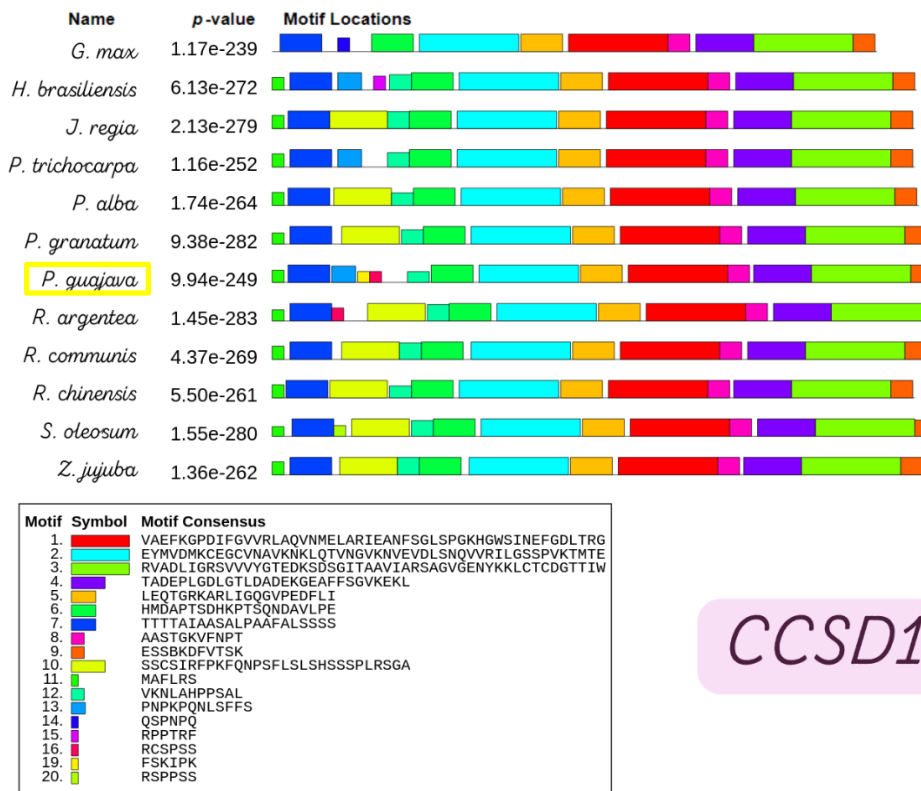
central que tiene homología con las dos CSD (dominio Cu/Zn superóxido dismutasa) y el dominio C-terminal que participa en la transferencia del cobre; siendo los primeros dos dominios aquellos que comparte con las Cu/Zn CSD citosólica y cloroplástica, mientras que el último, es característico de la chaperona (CCSD) (Chiung-Chih et al., 2005), aunque ausente para la CCSD1 de *P. guajava* (Fig. 9b).

La estructura tridimensional de la CCSD1 (Fig. 9b) comprende una proteína dimérica, ya que para la catálisis de la CSD1 y CSD2 se necesitan iones superóxido (Ecuación 6), por lo que se necesitan dos estructuras monoméricas activadas por dos iones de  $\text{Cu}^{2+}$  (Pilon et al., 2011).



**Ecuación 6**

Por otro lado, la búsqueda de motivos conservados de la CCSD1 (Fig. 10) se realizó tomando cuatro especies de la familia *Myrtaceae*, encontrando 11 motivos conservados en la secuencia aminoacídica de CCSD1 de las 12 especies, incluyendo a los miembros de la familia *Myrtaceae*, mientras que, para *G. max* se encontraron 9; *H. brasiliensis* y *S. oleosum* 13 y en *P. guajava* 14 motivos conservados. No obstante, entre estos motivos conservados no se incluye el MXCXXC, el cual está conservado dentro del primer dominio N-terminal en las CCSD1 (Wenlong et al., 2021).



CCSD1

**Figura 10.** Motivos conservados de la CCSD1. Las proteínas de los organismos *G. max*, *H. brasiliensis*, *J. regia*, *P. trichocarpa*, *P. alba*, *P. granatum*, *P. guajava*, *R. argentea*, *R. communis*, *R. chinensis*, *S. oleosum* y *Z. jujuba* tuvieron 12 motivos conservados, excepto en *G. max* con 9, *H. brasiliensis* y *S. oleosum* con 13 y *P. guajava* con 14 motivos conservados. En amarillo se resalta la *P. guajava*.

Por otra parte, la longitud del transcrito del gen de la CCSD1 de *P. guajava* (GGPP01025194.1) es de 2551 pb, que codifican a una proteína putativa de 330 aa, con un peso molecular de 34.694 kDa (Tabla 5). Sus propiedades fisicoquímicas indican que es una proteína de carácter ácido, lo cual está indicado por su punto isoeléctrico (pI) que es 6.01, ya que el pI mide el pH en el que la proteína no tiene carga, tomando como valor neutral un pI de 7. El índice alifático (Ai) mide la termoestabilidad de las proteínas, tomando los valores arriba de 66.5-84.33 correspondientes a una alta cantidad de aminoácidos hidrofóbicos, como indicadores de la termoestabilidad de la proteína (Panda y Chandra, 2012), por lo que la CCSD1 (87.03) se clasifica como una proteína termoestable, que concuerda al tener 52.17 % de aa hidrofobos (R<sup>-</sup>). Finalmente, el valor GRAVY clasifica a las proteínas como hidrofobas o hidrofílicas mediante un valor positivo y negativo respectivamente. La CCSD1 con un GRAVY de -0.058, se clasifica como hidrofílica.

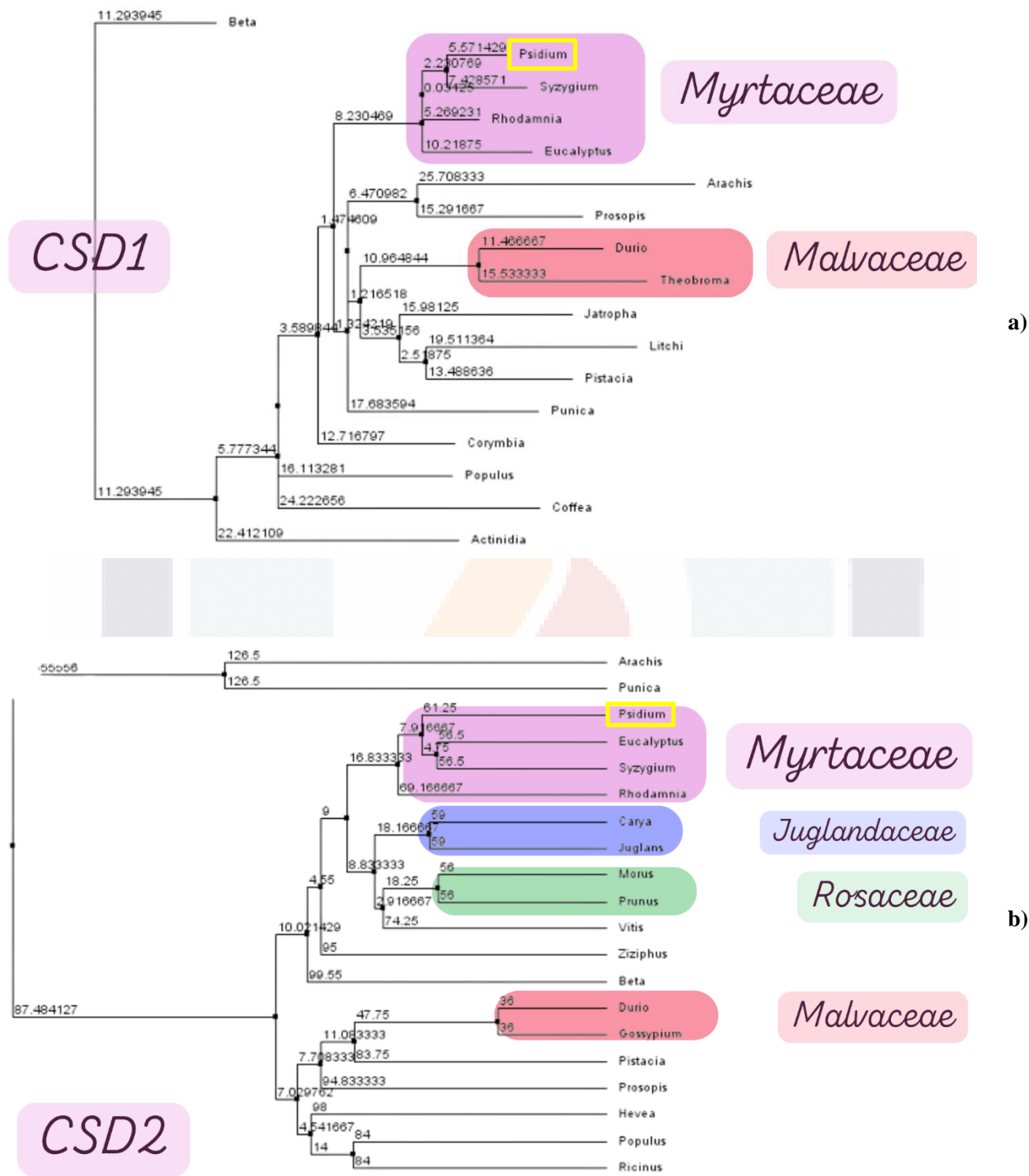
**Tabla 5.** Propiedades fisicoquímicas de la CCSD1 putativa de *P. guajava*.

CCSD1	
Organismo	<i>P. guajava</i>
Longitud (aa)	330
PM (kDa)	34.7
pI	6.01
Ai	87.03
GRAVY	-0.058
R+	33
R-	36

### 7.1.2 CSD1 y CSD2

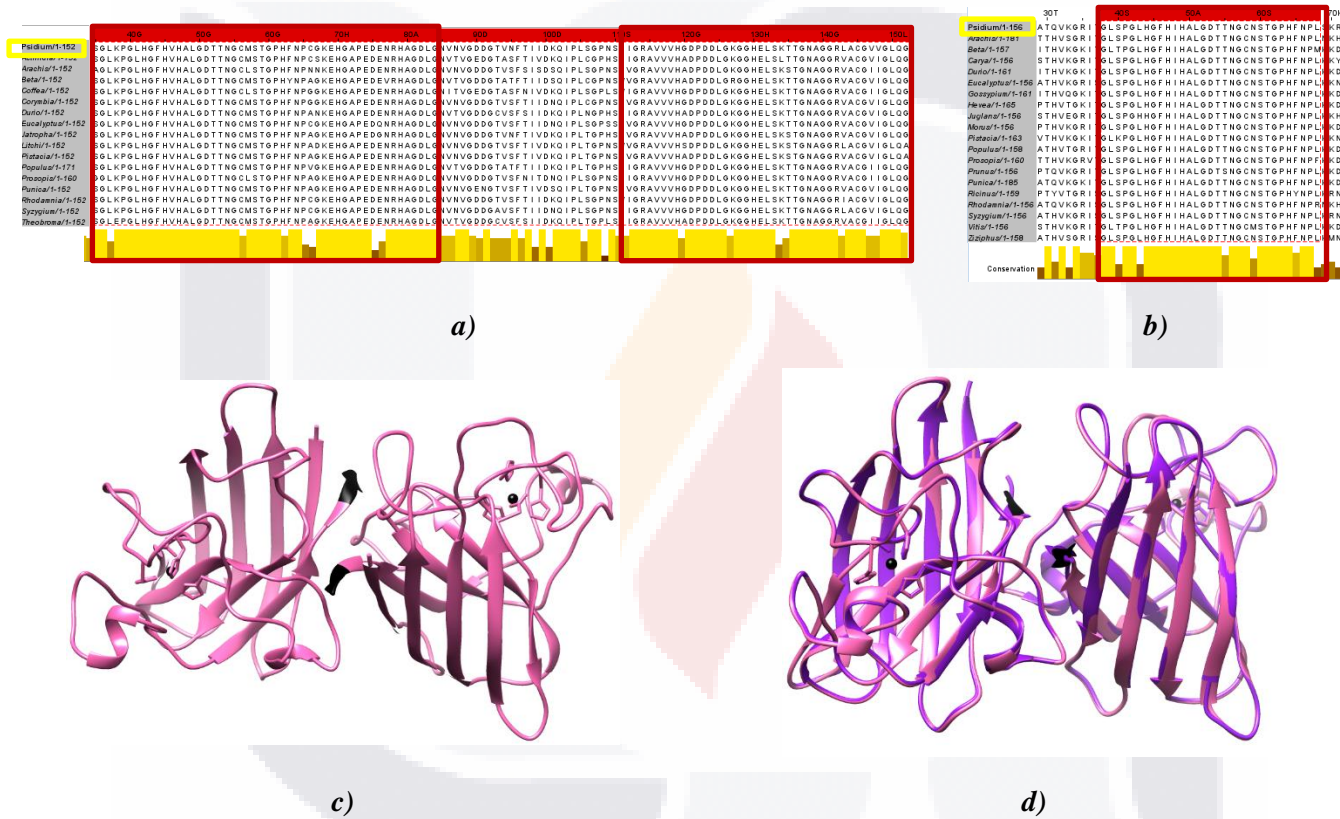
El análisis de similitud para la CSD1 se generó con 17 especies dicotiledóneas, cuatro de estas pertenecientes a la familia *Myrtaceae* y dos a la *Malvaceae* (Fig. 11a). Para la CSD2 se tomaron 20 especies dicotiledóneas en las que se incluyeron cuatro especies de la familia *Myrtaceae* y dos especies de la familia *Malvaceae*, *Rosaceae* y *Juglandaceae* (Fig. 11b).

Los resultados indican una alta conservación en la secuencia del dominio Cu/Zn superóxido dismutasa (35-152 aa) en la CSD1 con una diferencia del 5.22-16.42 % (7-22 aa), sin embargo, estas diferencias podrían ser debidas a que la secuencia mostrada corresponde al 66 % de la secuencia completa, faltante de 94 aa. De forma contraria, para la CSD2 se obtuvo una baja conservación entre las proteínas de las 16 especies (Fig. 12c), donde la región del 38|68 aa es la más conservada de toda la secuencia, con un 13 % de variaciones, que corresponden al residuo 86, 91 y 97 aa de las especies *P. persica*, *V. vinífera* y *R. communis*, respectivamente. Estos resultados concuerdan con Pilon et al. (2011), quienes mediante análisis filogenéticos sugirieron que la CSD citoplasmática está más conservada entre especies que su versión cloroplástica, posiblemente debido a que la CSD2 actúo en conjunto con la evolución de las plantas superiores, lo que pudo conferir mayores diferencias entre las secuencias por la divergencia de las enzimas.



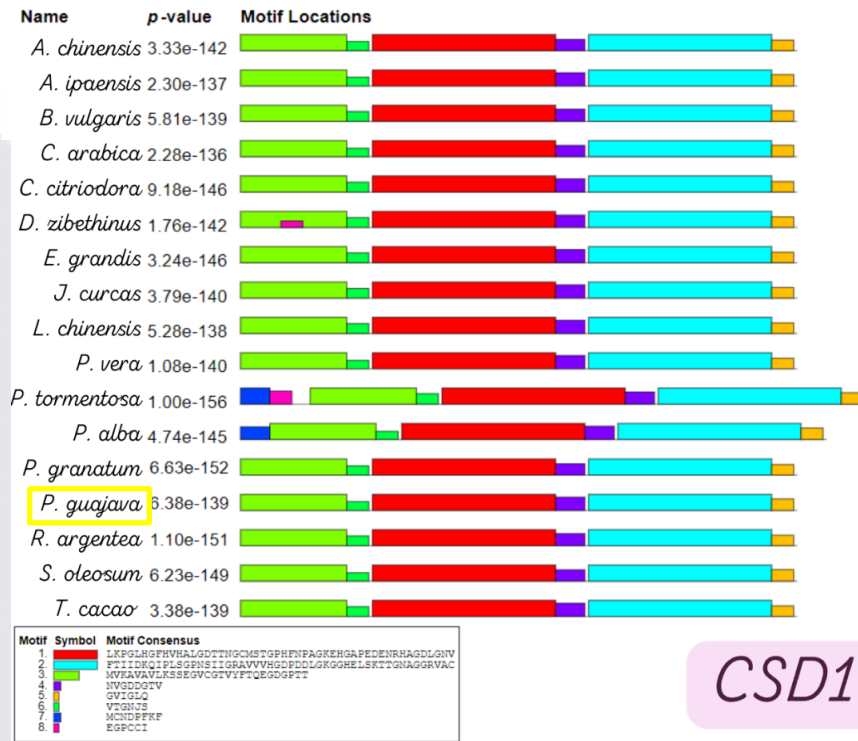
**Figura 11.** Dendrograma de distancia evolutiva de la enzima *a)* CSD1 y *b)* CSD2 de organismos pertenecientes a la familia *Myrtaceae* y otras. En colores se clasifican las familias *Myrtaceae* (morado), *Juglandaceae* (azul), *Rosaceae* (verde) y *Malvaceae* (rosa), donde en recuadro amarillo se destaca la *P. guajava*. El árbol fue diseñado en la herramienta de Jalview mediante un análisis de distancia promedio por PAM250.

La proteína CSD1 de *P. guajava* tiene como único dominio, al cobre/zinc superóxido dismutasa (Fig. 12c), el cual comparte con la CSD2 y CCSD1 (Fig. 12b y 9b) aunque esta última en diferente posición (2-149 aa, 4-152 aa y 185-287 aa respectivamente). Esto es de esperarse, ya que el dominio Cu/Zn SOD se encuentra conservado entre los eucariontes, incluyendo levaduras, mamíferos y plantas (Pilon et al., 2011). Además, entre los residuos aminoacídicos 43-53 y 45-55 se encuentra la unión al cobre de la CSD1 y 2, respectivamente.



**Figura 12.** Conservación de la CSD1 y CSD2 en diferentes especies y estructura tridimensional de la CSD de *P. guajava*. **a)** Alineamiento múltiple de CSD1 en diferentes especies de la familia *Myrtaceae* y otras especies. En amarillo se resalta a *P. guajava*. La región conservada (35-84 y 111-152 aa, recuadros rojos) corresponden al dominio cobre/zinc superóxido dismutasa. **b)** Alineamiento múltiple de CSD2 en diferentes especies de la familia *Myrtaceae* y otras especies. En amarillo se resalta a *P. guajava*. La región conservada (76-99 aa) corresponde al dominio cobre/zinc superóxido dismutasa 2. En amarillo se resalta a *P. guajava*. La barra amarilla indica que el aminoácido se encuentra en todos los organismos, conforme se achica y opaca la barra, menos conservada se encuentra su secuencia aminoacídica. **c)** Estructura tridimensional de la CSD de *P. guajava* (negro), utilizando como templado la CSD2 de *S. lycopersicum* (SMTL ID: 3km2.2). Dominio cobre/zinc superóxido dismutasa (rosa), entre el aminoácido 2-149 para CSD1 y 4-152 aa para CSD2. **d)** Empalme de las estructuras 3D de CSD de *P. guajava* (negro y dominio rosa) y CSD2 de *S. lycopersicum* (morado).

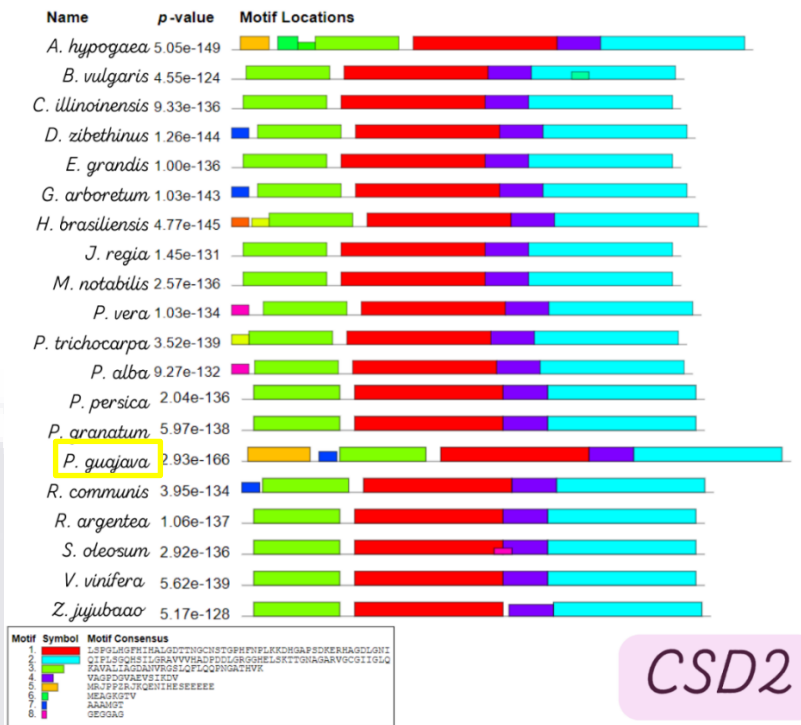
De forma similar, se encontraron 6 y 4 motivos conservados para la CSD1 y CSD2, respectivamente, excepto para *D. zibethinus* y *P. alba* quienes presentaron 7 y *P. tormentosa* 8 motivos conservados en CSD1 (Fig. 13a). Estos resultados con correspondientes al porcentaje de conservación de los dominios entre estas dos enzimas.



a)

CSD1





b)

**Figura 13.** Motivos conservados de las proteínas CSD1 y CSD2. **a)** CSD1 de *A. chinensis*, *A. ipaensis*, *B. vulgaris*, *C. arabica*, *C. citriodora*, *D. zibethinus*, *E. grandis*, *J. curcas*, *L. chinensis*, *P. vera*, *P. tormentosa*, *P. alba*, *P. granatum*, *P. guajava*, *R. argentea*, *S. oleosum* y *T. cacao* con 6 motivos conservados, excepto en *D. zibethinus* y *P. alba*, con 7 y *P. tormentosa* 8 motivos conservados. Resaltado en recuadro amarillo se destaca la *P. guajava*. **b)** CSD2 de *A. hypogaea*, *B. vulgaris*, *C. illinoensis*, *D. zibethinus*, *E. grandis*, *G. arboretum*, *H. brasiliensis*, *J. regia*, *M. notabilis*, *P. vera*, *P. trichocarpa*, *P. alba*, *P. persica*, *P. granatum*, *P. guajava*, *R. communis*, *R. argentea*, *S. oleosum*, *V. vinifera* y *Z. jujuba* tuvieron 4 motivos conservados en todas las especies, mientras que *D. zibethinus*, *G. arboretum*, *P. vera*, *P. trichocarpa*, *P. alba* y *R. communis* con 5; *H. brasiliensis* y *P. guajava* con 6 y *A. hypogaea* con 7 motivos conservados. Resaltado en recuadro amarillo se destaca la *P. guajava*.

El mRNA de la CSD1 (GGPP01015210.1) y CSD2 (GGPP01015209.1) de *P. guajava* analizados, son de 2396 y 1077 pb y se traducen a 152 y 156 aa, respectivamente, según Expasy protparam (Gasteiger et al., 2003). Debido a su longitud tan próxima entre estas, se puede aseverar que el transcrito del gen CSD2 putativo de *P. guajava* no contiene el péptido señal para el cloroplasto, el cual para la AtCCS (versión de CSD1 de *A. thaliana*) tiene una longitud de 66 a adicionales al tamaño de la secuencia de la CSD1 (Chiung-Chih et al., 2005).

Sus propiedades fisicoquímicas indican que la CSD1 (Tabla 6) es ácida (pI: 5.65) e hidrofílica (GRAVY: -0.212), además de ser termoestable (Ai: 75.59) con 61.54 % de aa hidrofóbicos. Mientras que la CSD2 mostró ser hidrofílica (GRAVY: -0.083), termoestable (Ai: 89.36) con 52 % de aa hidrofóbicos y ácida (pI: 6.74), correspondiente a lo reportado por Karpinska et al. (2001)

quienes mencionan que las superóxido dismutasa citosólica (CSD1) y cloroplástica (CSD2) son ácidas con un pI de 5.5, llegando a ser igual o menor a 7 en sus isoformas.

**Tabla 6.** Propiedades fisicoquímicas de la CSD1 y CSD2 putativas de *P. guajava*.

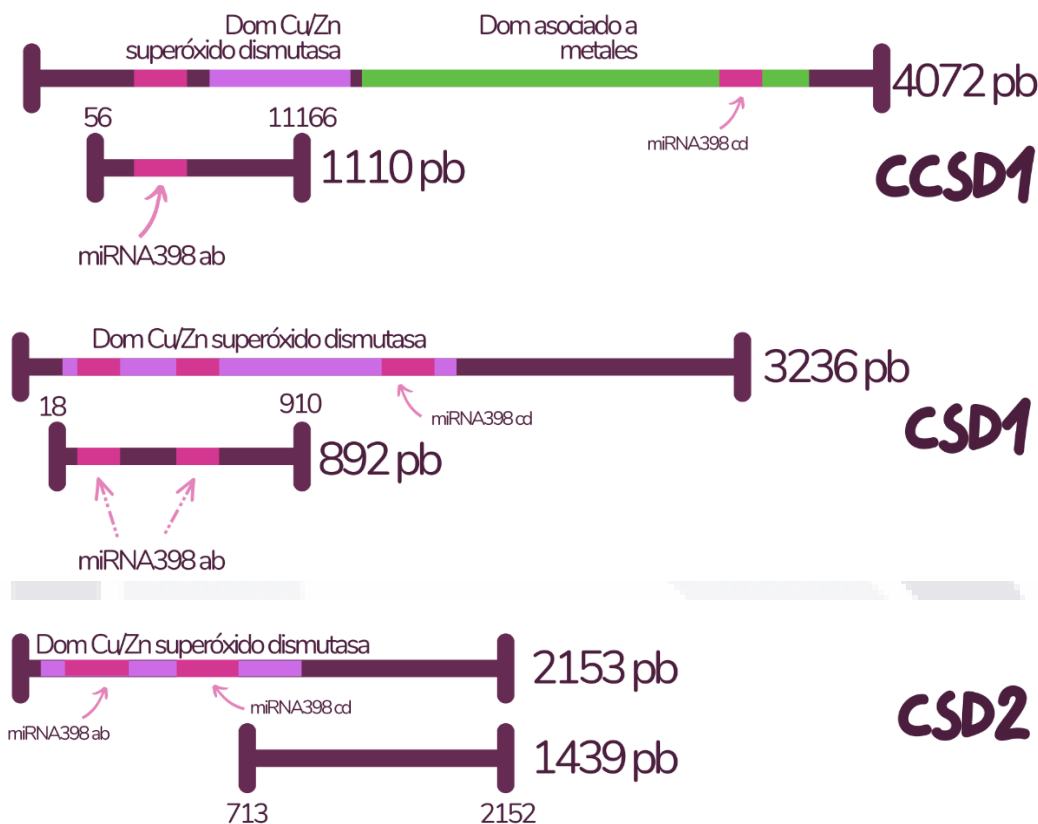
	<b>CSD1</b>	<b>CSD2</b>
<b>Organismo</b>	<i>P. guajava</i>	<i>P. guajava</i>
<b>Longitud (aa)</b>	152	156
<b>PM (kDa)</b>	15.3	15.7
<b>pI</b>	5.65	6.74
<b>Ai</b>	75.59	89.36
<b>GRAVY</b>	-0.212	-0.083
<b>R+</b>	10	11
<b>R-</b>	16	12

### 7.2 miRNA398 alineamiento con genes objetivo (CCSD1, CSD1 y CSD2)

Las secuencias del miRNA398 obtenidas por Mendoza (2022) en el fruto de guayaba en estadio rayado y maduro (Tabla 7) se utilizaron para el diseño de oligonucleótidos de los genes objetivo del miRNA398, la CCSD1, CSD1 y CSD2 de *P. guajava* ubicando y flanqueando su región complementaria a los genes objetivo con los oligonucleótidos diseñados (Fig. 14).

**Tabla 7.** Secuencias de miRNA398 en frutos de guayaba estadio rayado y maduro de Mendoza (2022). En negritas las diferencias entre el miRNA $ab$  y miRNA $cd$ .

<b>MiRNA</b>	<b>Secuencia</b>
miRNA398 $a$	TGTGTTCTCAGGTCGCCCCCG
miRNA398 $b$	TGTGTTCTCAGGTCACCCCTT
miRNA398 $c$	TTTGGATTGAAGGGAGCTCCT
miRNA398 $d$	TTTGGATTGAAGGGAGCTCTA

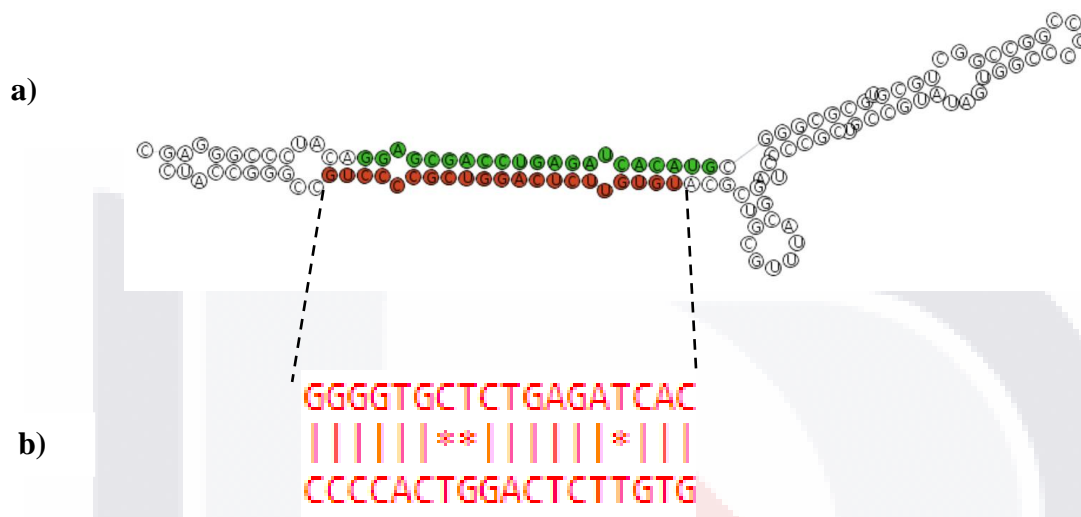


**Figura 14.** Construcciones de los fragmentos del gen *CCSD1*, *CSD1* y *CSD2* de *P. guajava*. La barra superior de cada CSD representa el tamaño completo del gen de cada enzima, mientras que la barra inferior se refiere al fragmento flanqueado por los oligonucleótidos diseñados. Los dominios conservados de cada proteína corresponden al dominio Cu/Zn SOD (morado) y dominio asociado a metales (verde). La región de alineamiento de los cuatro isotipos de miRNA398 (rosa) se encuentra en diferentes locaciones de cada CSD.

Los cuatro isotipos obtenidos por Mendoza (2022) difieren en 3 (miRNA398a y b) y 2 nucleótidos (miRNA398c y d) (Tabla 7). La secuencia de los isotipos miRNA398a y b concuerda con los isotipos miRNA398a, b y c de *Arabidopsis*, los cuales comparten la mayoría de la secuencia, con 3 diferencias en el nucleótido 15, 20 y 21 (5'-3') para el isotipo a y una en el nucleótido 21 para el miRNA398b de guayaba, comparándolo con el miRNA398b y c de *Arabidopsis*. Sin embargo, los isotipos c y d de guayaba tienen una secuencia completamente diferente tanto para los isotipos a y b de guayaba, como con los tres isotipos de *Arabidopsis* (Ramanjulu et al., 2006).

De los cuatro isotipos (a/b/c/d) del miRNA398, la única estructura disponible en la base de datos sRNAanno fue la del miRNA398a perteneciente a *E. grandis*, especie evolutivamente cercana a *P. guajava* (Chen et al., 2021) (Fig. 15a). El alineamiento del miRNA398a con la superóxido

dismutasa de *E. grandis* (Eucgr.B01760.1) (Fig. 15b) obtenida con la herramienta de alineamiento del portal comTAR (Chorostecki y Palatnik, 2014) muestra una complementariedad del 83.33 %, con la secuencia del gen objetivo, conteniendo solo tres diferencias, las dos primeras en el residuo 7 y 8 y la última en el residuo 15.



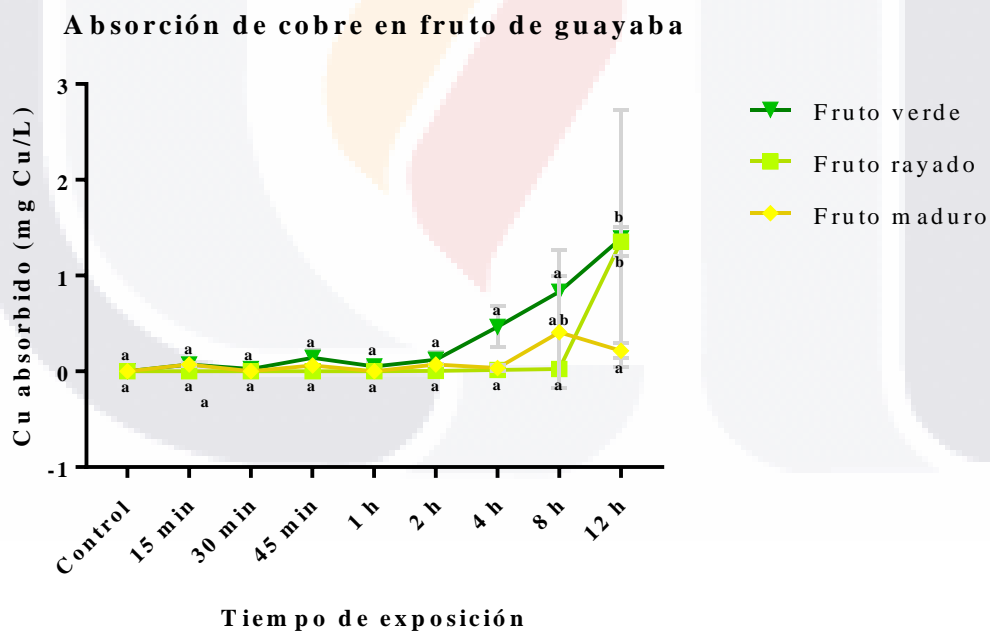
**Figura 15.** Estructura secundaria del miRNA398a en *E. grandis*. a) Estructura secundaria. Zona verde: región 5' no complementaria al gen objetivo. Zona roja: región 3' complementaria de unión al gen objetivo por el programa sRNAanno. b) Alineamiento del miRNA398 con la superóxido dismutasa de *E. grandis* por el programa comTAR.

### 7.3 Absorción de cobre en los tejidos vegetales

Se observó la acumulación de cobre en los tres estadios de maduración de los frutos de guayaba (Fig. 16a), siendo mayor en el fruto verde con 1.3844 mg Cu/L a las 12 h. En el estadio verde los valores obtenidos entre los tiempos de 15 min – 1 h se encuentran alrededor de 0.0734 mg Cu/g, después de este tiempo, a las 2 h la absorción aumentó a 0.1217 mg Cu/g, siendo el estadio con absorción de cobre más temprana. Por otra parte, el estadio rayado solamente presentó absorción de cobre a las 12 h, con un valor de 1.3499 mg Cu/L, mismo que absorbió el fruto verde. Finalmente, el estadio maduro mostró un promedio de 0.0376 mg Cu/L durante los primeros 6 tiempos de absorción (hasta las 4 h), comenzando y obteniendo su máximo de absorción a las 8 h con 0.4118 mg Cu/L, posteriormente disminuyó a 0.2148 mg Cu/L; por lo que donde se esperaba obtener respuesta diferencial sería a las 12 h en fruto verde y rayado y a las 8 en fruto maduro, debido a que únicamente para estos tratamientos la diferencia en la absorción de cobre fue significativa.

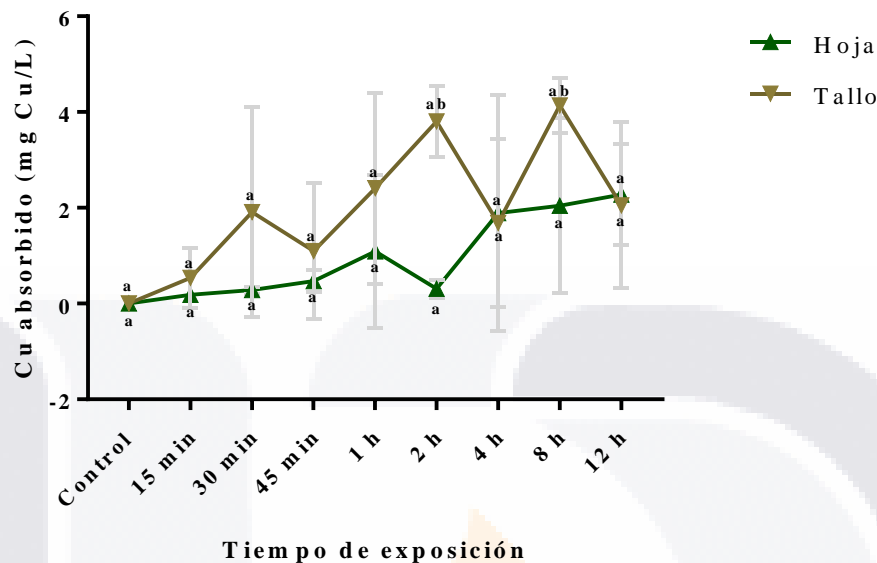
Los valores obtenidos para cada estadio superan por 16, 16 y 5 veces, respectivamente, a los reportados para el fruto de guayaba crecida por un año en un suelo contaminado con metales pesados, que anteriormente comprendía una mina de Enyigba, Nigeria (Otu, 2015), por lo que el método utilizado, de inducción de iones de cobre mediante la absorción de la solución de sulfato de cobre por parte del pedúnculo de la fruta, permite tener elevadas concentraciones del metal dentro de la célula, propiciando el estrés por cobre en el tejido a las 8-12 h.

El decaimiento de cobre entre los estadios de maduración del fruto está probablemente relacionado con la prevalencia del conducto del xilema, ya que, en frutos climatéricos, el conducto decae debido el estiramiento de la planta madre, causando la destrucción del xilema; esto ocasiona que el suministro de agua en los frutos de mayor maduración sea únicamente por el floema, disminuyendo la conductancia hidráulica (Keller et al., 2014). Lo que provoca que conforme avance la madurez del fruto, la absorbancia de agua disminuya, presentando menor concentración de cobre absorbido en los estadios rayado y maduro, respectivamente.



a)

**Absorción de cobre en hoja y tallo de guayaba**



b)

**Figura 16.** Gráfico de absorción de cobre en distintos órganos de guayaba bajo estrés por cobre. *a)* Fruto de guayaba en diferente estadio de maduración verde (verde), rayado (verde-amarillo), maduro (amarillo). *b)* Hoja (verde oscuro) y tallo (café) de guayaba. Las líneas grises indican la desviación estándar, y las letras la diferencia significativa ( $\alpha$  0.05) cada tratamiento.

Los valores iniciales de Cu encontrados en los tres estadios (alrededor de 0.07 mg Cu/g) son ligeramente superiores a los indicados por Fry et al. (2002), los cuales oscilan entre 0.003-0.03 mg Cu/g para los tallos, hojas, frutos y raíces de las plantas, independientemente de la concentración de este metal el suelo; y a los reportados por García-Rivera et al. (2016) (0.001 mg Cu/g tejido vegetal) en guayaba-piña (*Acca sellowiana*). Este aumento puede deberse a la presencia del fungicida Cupravit® que contiene oxiclورو de cobre al 85 %, que es usado como estrategia de control del picudo (*Conotrachelus psidii Marshall*) en el Campo experimental Cañones-INIFAP y se aplica en toda la parte aérea del árbol y en el suelo.

Por su parte, la hoja y tallo (Fig. 16b) tuvieron una concentración de cobre superior a los frutos, comenzando su absorción desde los 15 minutos con 0.1844 y 0.5344 mg Cu/g, respectivamente. Estos valores son superiores incluso con los encontrados en hojas de guayaba (0.058 mg Cu/g) crecida en zonas altamente contaminadas con metales pesados (Naqvi et al., 2014). Sin embargo, ante la capacidad de los metales pesados de penetrar el tallo como la cutícula de la hoja (Lepp, 1970), es de esperarse que al sumergir mayor tejido (tallo) en la solución de sulfato de cobre (datos



no mostrados), se incrementa la concentración de cobre tanto en tallo como en hoja a comparación del fruto.

La absorción del cobre en hoja y tallo se mantuvo oscilante y contraria, observándose un incremento en la concentración de cobre en el tallo hasta los primeros 30 min, que después disminuye, posiblemente por transportarse a las hojas, lo que genera un aumento en la concentración de Cu en hoja. Esto ocurre hasta alcanzar el máximo de concentración a las 2 h en tallo (3.7969 mg Cu/g) y a las 4 h para la hoja (1.8916 mg Cu/g), donde el tallo obtuvo el doble de concentración de cobre que la hoja, sin embargo, la concentración de cobre dentro del tallo y hoja no fue significativa a pesar del tiempo de exposición al metal, pudiendo ser causado por la volatilidad del metal precipitado en el tallo y hoja, el cual se liberaba al seccionar el tejido para la toma de muestra, aumentando la varianza entre datos.

Por otro lado, este comportamiento entre tallo y hoja concuerda con los estudios de la capacidad de fitorremediación de la guayaba (Mitra y Kumar, 2019), donde la acumulación de metales pesados como el Cd, Pb y Cr se da principalmente en brotes>raíz>hoja (Kumar, et al., 2014), ya que la traslocación del Cu en los tejidos vegetales se da pobremente, atrofiando su transporte a los brotes y hojas (Fidalgo et al., 2013).

Finalmente, la concentración de cobre acumulada se mantuvo entre 3.8 y 1.89 mg Cu/g, en tallo y hoja, respectivamente, ya que a pesar de que la guayaba tiende a acumular los metales pesados (Kumar, et al., 2014; Kairiah et al., 2009), los iones de cobre dañan las células vegetales, propiciando su senescencia, por lo que su captura debe ser moderada.

Estos resultados sugieren que existe una alta disponibilidad de Cu dentro de las células de los tejidos expuestos, por lo que la actividad de las SODs se vería inducida, ya que estas enzimas son dependientes de la concentración del cobre en la célula (Zheng et al., 2020), como se ha reportado en pepino con el aumento de la expresión de los genes Cu/Zn SOD después de la aplicación de nanopartículas de cobre (Su et al., 2021).

#### **7.4 Marcadores del estrés oxidativo por cobre**

Después de la inducción de los iones  $\text{Cu}^{2+}$  a los frutos, tallo y hoja de guayaba, se midieron tres marcadores de estrés, la actividad enzimática de la catalasa y concentración de clorofila y antocianina, ya que el cobre tiene un efecto negativo en todos ellos. Después de la inducción del

estrés oxidativo, la célula comienza a producir EROS, los cuales son procesados por tres enzimas antioxidantes, la CSD, catalasa y peroxidasa, las cuales atacan al radical  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  y  $OH^-$  respectivamente, produciendo  $H_2O_2$  (por acción de la CSD), que es catalizado por la catalasa y peroxidasa, produciendo agua y oxígeno (Brahim y Mohamed, 2011; Huan et al., 2016). Por lo que la cuantificación de la actividad de la catalasa funge como un marcador del estrés inducido a los órganos. De forma similar, ante la presencia de EROS la célula induce la expresión de moléculas antioxidantes que faciliten la eliminación de estos, como las antocianinas.

Por otro lado, el cobre tiene un efecto negativo en las proteínas encargadas de la síntesis de clorofila, que aunado al remplazo del ion  $Mg^{2+}$  por el  $Cu^{2+}$  en la estructura central de la clorofila, termina en una reducción de la clorofila, atrofiando la fotosíntesis (Zhang et al., 2019).

#### **7.4.1 Actividad enzimática de catalasa**

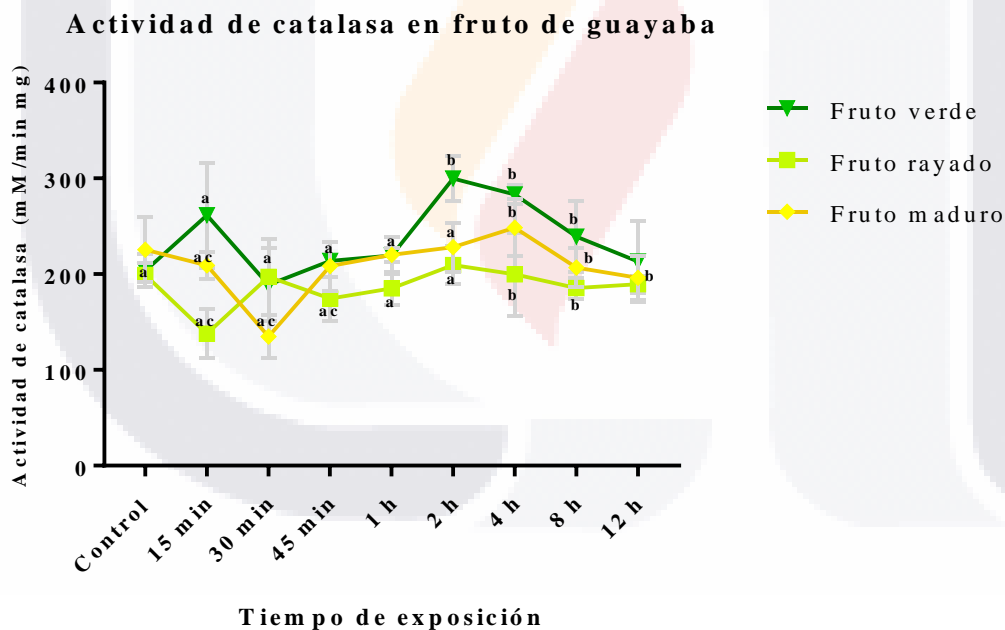
Es importante remarcar que se descarta la producción de EROS debida la madurez alcanzada en el proceso de absorción de Cu, presentando así todas las muestras las mismas condiciones, pues al permanecer sujeto el pedúnculo al fruto, este puede actuar como un sumidero de las hormonas producidas en la fruta, como el etileno (Tingwa y Young, 1975). Por lo que el aumento/reducción de la actividad de la catalasa sería causado por el estrés de cobre y no por el nivel de maduración del fruto.

La actividad de la catalasa se mantuvo oscilante (Fig. 17a) conforme aumentó la concentración de cobre en fruto (Fig. 16a). En el estadio verde aumentó a los primeros 15 min 57.78 mM/minmg, seguida de un decremento de 72.55 mM/minmg, provocado por la rápida absorción de la solución de cobre por parte del fruto, debido al estrés hídrico causado por el corte y transporte del fruto cosechado hasta el laboratorio, misma condición que se observa en los otros dos estadios. La concentración de cobre en fruto verde (Fig. 17a) comenzó a las 4 h, sin embargo, la máxima actividad de la catalasa de forma significativa se presentó a las 2 h (299.995 mM/minmg), indicando que el cobre absorbido a las 2 h por el fruto fue metabolizado, aumentando la producción y, por tanto, actividad enzimática de la catalasa para mitigar el estrés inducido. La constante acumulación de cobre en el tejido potenciaría en mayor medida la producción de EROS, sobrepasando la capacidad de la catalasa y reduciendo su actividad enzimática (Brahim y Mohamed, 2011), terminando con 213.011 mM/minmg a las 12 h. Esto concuerda con el estudio

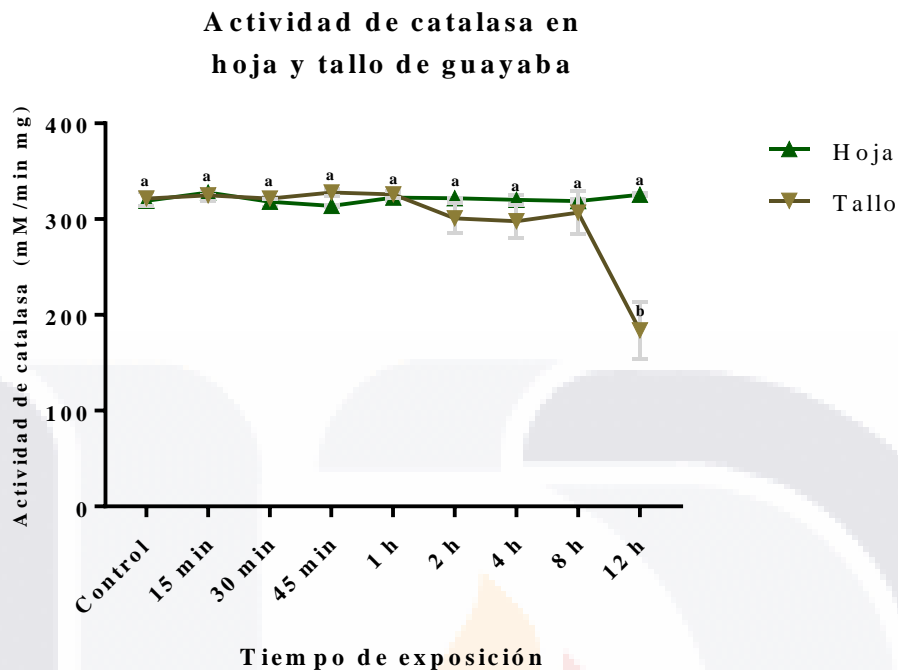
de Brahim y Mohamed (2011) quienes encontraron un aumento en la actividad de la superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa al inducir estrés por Cu en *Atriplex hallmus*, debido al mecanismo de protección de la planta.

Para los estadios rayado y maduro, el aumento de la actividad de la catalasa se dio hasta las 4 h, un tratamiento posterior al fruto verde, ya que, en frutos climatéricos, se inhibe la producción de las enzimas antioxidantes, como la catalasa al comenzar el proceso de la maduración, para favorecer la senescencia del fruto (Mohamed et al., 2011).

Por último, la hoja y tallo (Fig. 17b) no mostraron diferencias significativas en la actividad de catalasa respecto a los tratamientos realizados, al igual que en el trabajo de Drazkiewicz et al. (2004) donde se observó que el estrés causado por cobre en las hojas de *A. thaliana* fue metabolizado por las enzimas superóxido dismutasas y peroxidasas; mientras que la catalasa no se involucró en el sistema defensivo de la planta.



a)



b)

**Figura 17.** Gráfico de la actividad catalasa en distintos órganos de guayaba bajo estrés por cobre. **a)** Fruto de guayaba en diferente estadio de maduración verde (verde), rayado (verde-amarilla), maduro (amarillo). **b)** Hoja (verde oscuro) y tallo (café) de guayaba. Las líneas grises indican la desviación estándar, y las letras la diferencia significativa ( $\alpha$  0.05) cada tratamiento.

#### 7.4.2 Antocianina y clorofila

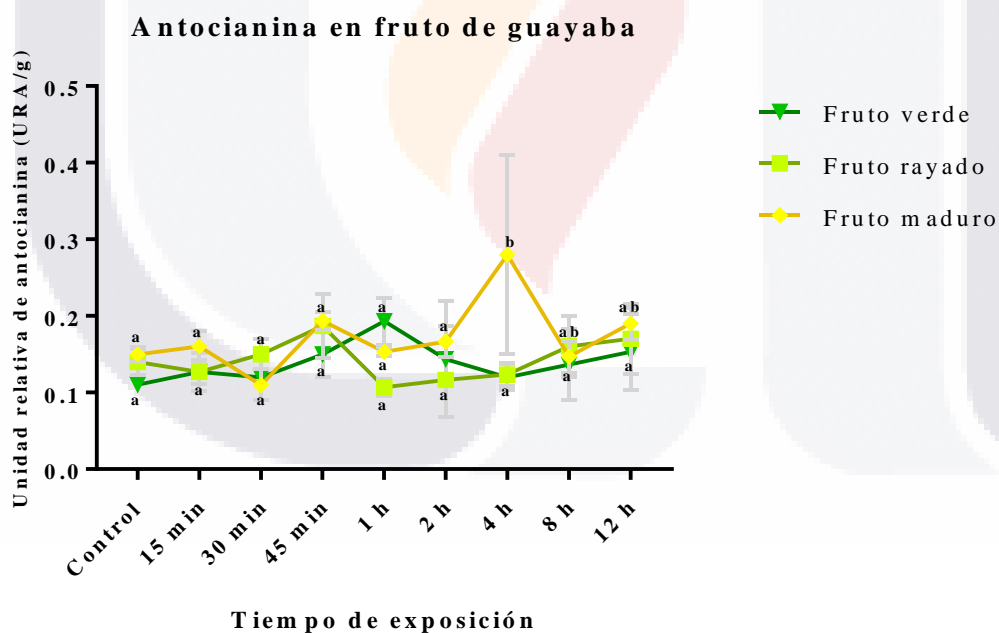
Una estrategia utilizada por las plantas para contrarrestar los EROS producidos es el uso antioxidantes como las antocianinas (Htay y Kil, 2020), las cuales tienen una actividad antioxidante superior al ascorbato (vitamina C) (Mendes et al., 2009). Se ha demostrado que tanto las antocianinas como la vitamina E y C actúan de forma análoga protegiendo las membranas del daño oxidativo inactivando los radicales peroxilo en el citosol (Posmyk et al., 2008).

La guayaba de pulpa blanca, como lo es la variedad media china carece de antocianinas (Flores et al., 2014); aunque contiene taninos condensados, que se les considera proantocianidinas (Mendes et al., 2009), estos al igual que las antocianinas participan en la protección de estreses ambientales actuando como flavonoides antioxidantes parciales ante la producción de EROS (Li, Chen et al., 2019). No obstante, estos absorben a una longitud de onda inferior, de 258 nm (Díaz y Vera, 2012), por lo que no se representan en el gráfico (Fig. 18a).

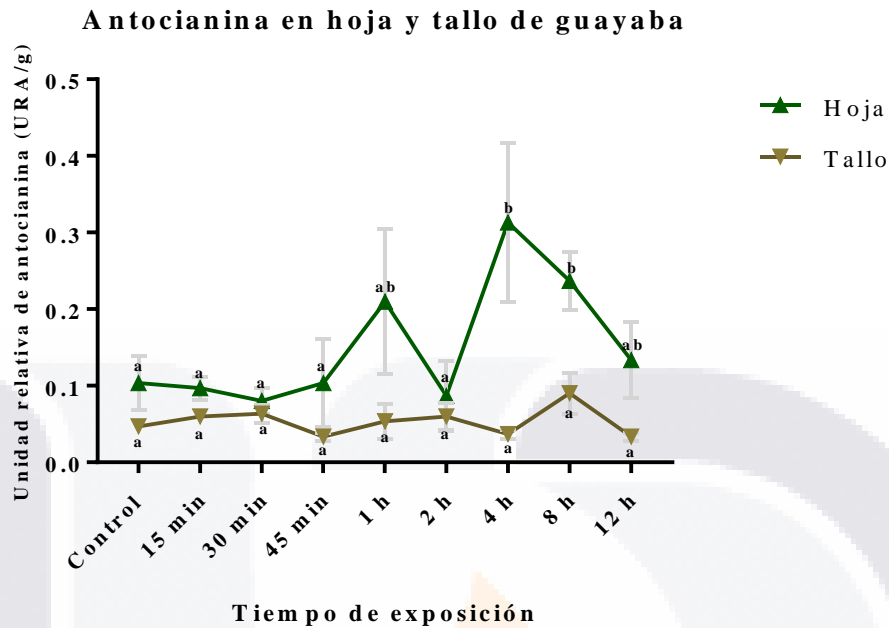
En el fruto verde (Fig. 18a) la concentración de antocianina se mantuvo constante (0.1127-0.1569 URA/g) respecto los tratamientos de estrés, excepto a la hora de absorción de cobre, que presenta

un pico máximo de 0.1952 URA/g, sin embargo, este no es debido al estrés causado, ya que la absorción de cobre comienza a las 4 h (Fig. 16a). En el estadio rayado y maduro se presentó un comportamiento similar, solo que su máximo de concentración fue a los 45 min (0.1844 URA/g) y 4 h (0.2804 URA/g), respectivamente.

Puesto que el estrés metálico por cobre es el principal inductor de la síntesis de antocianinas en las plantas (Htay y Kil, 2020), la concentración de antocianina en la hoja (Fig 18b) aumentó de manera significativa conforme acumuló cobre el tejido, exceptuando el tratamiento de 2 h, ya que es en este, que la hoja presentó la menor absorción de cobre. La concentración de antocianinas llegó a su máximo a las 4 h con 0.3143 URA/g, seguida de su decline hasta la concentración del tiempo inicial (0.1313 URA/g), puesto que para este tiempo la cantidad de EROS acumulada debería ser muy grande lo que pudo inhibir la síntesis de antocianinas. En el tallo no se presentaron cambios significativos en la concentración de antocianinas entre los tratamientos de estrés por cobre (Fig. 18b).



a)



b)

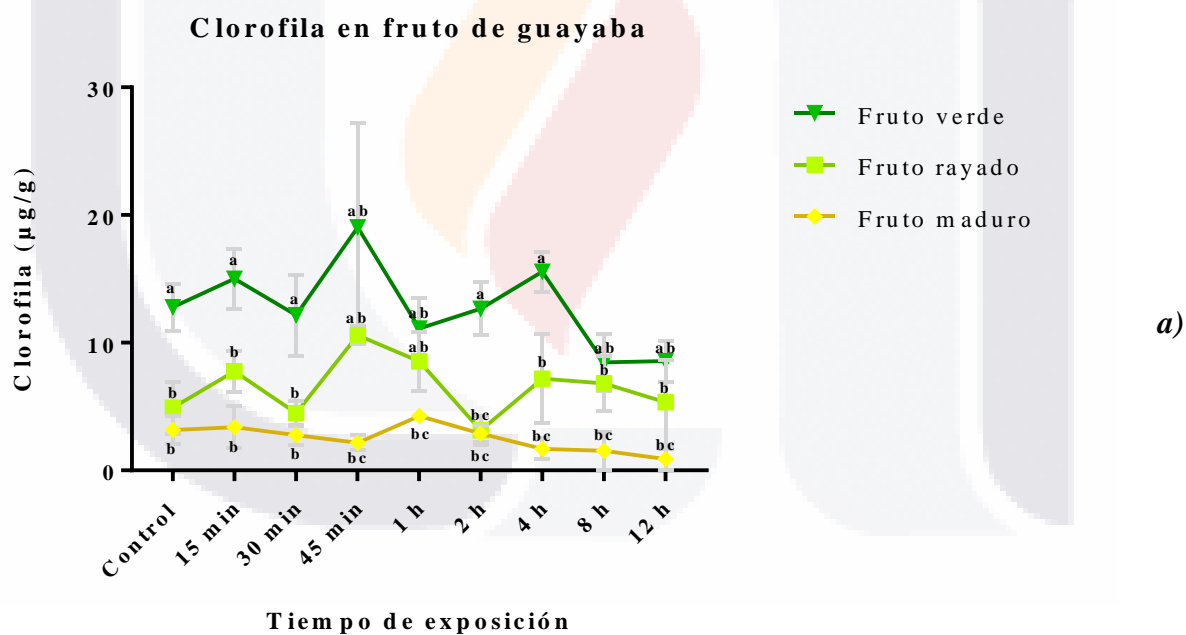
**Figura 18.** Gráfico de antocianina en frutos, hoja y tallo de guayaba bajo estrés por cobre. a) Antocianina en el fruto verde (verde), rayado (verde-amarillo) y maduro (amarillo). b) Antocianina en hoja (verde oscuro) y tallo (café) de guayaba. Las líneas grises indican la desviación estándar, y las letras la diferencia significativa ( $\alpha$  0.05) cada tratamiento.

Entre los efectos que produce el estrés por cobre en las plantas, está la reducción del contenido de clorofila e inhibición algunas funciones de la fotosíntesis de la planta (Brahim y Mohamed, 2011). En el fruto verde este decaimiento se observa a partir de las 4 h (15.57  $\mu\text{g/g}$ ) (Fig. 19a), que es donde comienza a acumular el metal en el fruto, hasta llegar a niveles inferiores al control inicial (8.57  $\mu\text{g/g}$ ). En el estadio rayado no se presentó cambios con respecto al contenido de cobre, ya que solo se presentó absorción del metal hasta las 12 h (Fig. 16a). Por otra parte, el fruto maduro mantuvo la misma relación que en el estadio verde, con un máximo de concentración a la hora con 4.2718  $\mu\text{g/g}$  y un decaimiento hasta concentraciones inferiores al control inicial (0.8861  $\mu\text{g/g}$ ). Este comportamiento concuerda con Kadiriye (2016) quien obtuvo un pico máximo de clorofila, seguido de un decline al sumergir las plántulas en las soluciones de sulfato de cobre por 7 días de 25  $\mu\text{M}$  de Cu en *Lemna minor* y 50  $\mu\text{M}$  de Cu en *Spirodela polyrrhiza*. Por otra parte, se presentó un decremento significativo dependiente del estadio de maduración del fruto, donde las concentraciones más altas se registraron en estadio verde (16.0015-9.5143  $\mu\text{g}$  clorofila/g), seguido de rayado (8.3351-4.1591  $\mu\text{g}$  clorofila/g) y maduro (3.4251-1.4149  $\mu\text{g}$  clorofila/g), esto concuerda con la investigación de Jain et al. (2003), que obtuvieron 1.24 mg/100  $\text{cm}^2$  de clorofila para el

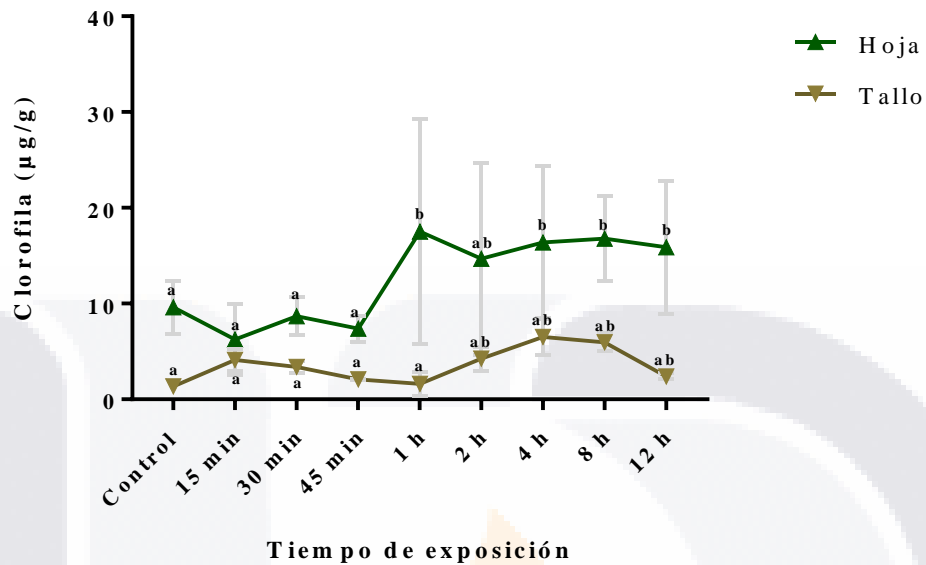


estadio verde y 1.01 mg/100 cm<sup>2</sup> para el estadio maduro en guayaba Banarsi Surkha. El decremento es producido por la clorofilasa, clorofiloxidasa y peroxidasa que degradan la clorofila durante la madurez (Jain et al., 2003).

El comportamiento de la hoja fue inverso a lo encontrado en el fruto (Fig. 19b), donde se observa una concentración mínima a los 45 min de 7.3697 µg/g, seguida de un ascenso significativo a 17.5302 µg/g a la hora de absorción, para mantenerse estable hasta las 12 h (15.8727 µg/g). Esta relación se presenta en los tejidos expuestos a trazas de cobre, que benefician la síntesis de clorofila, sin embargo, ante un estrés del metal, se atrofia su síntesis y por lo tanto su actividad fisiológica, disminuyendo la concentración de clorofila en hojas (Zhang et al., 2019), contrario a lo obtenido. Mientras que, en el tallo, no presentó variaciones en su contenido de clorofila, debido a que las células que componen al tallo no están especializadas en la realización de la fotosíntesis y, por lo tanto, el contenido de clorofila es mucho menor que en las hojas (Berveiller et al., 2007).



**Clorofila en hoja y tallo de guayaba**



b)

**Figura 19.** Gráfico de clorofila en frutos, hoja y tallo de guayaba bajo estrés por cobre. a) Clorofila en el fruto verde (verde), rayado (verde-amarillo) y maduro (amarillo). b) Clorofila en hoja (verde oscuro) y tallo (café) de guayaba. Las líneas grises indican la desviación estándar, y las letras la diferencia significativa ( $\alpha$  0.05) cada tratamiento.

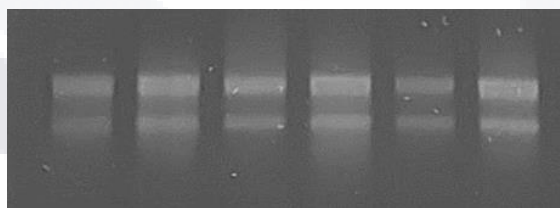
Debido a que la respuesta mitigadora del estrés por parte de la catalasa y antocianinas no fue significativa para los tejidos sometidos a estrés metálico, se espera que la principal acción mitigadora del estrés oxidativo por cobre sea por las enzimas antioxidantes superóxido dismutasas, ya que otros compuestos que se activan ante estrés oxidativo, como los péptidos quelantes, fitoquelatinas y metalotioneinas actúan principalmente en raíz, evitando la ingesta de cobre a la planta, como en *S. nigrum* (Fidalgo et al., 2013), sin embargo, al haberse utilizado el tallo y fruto con 2 cm de pedúnculo, estos compuestos no estarían presentes para bloquear el acceso del cobre al fruto, capturando así, todo el cobre ingerido dentro del mesocarpio.

A pesar de que los marcadores de estrés indiquen que se produjo un estrés oxidativo por cobre, es necesario medir la expresión en tiempo real de la CCSD1, CSD1 y CSD2 para comprobar su activación por exceso de cobre y por lo tanto, poder relacionar su activación con la producción de etileno, mediante la expresión relativa de la ACC oxidasa.

## 7.5 Extracción de ácidos nucleicos (RNA) y síntesis de cDNA

La extracción de RNA y DNA se realizó utilizando el método modificado Doyle y Doyle (1987), el cual utiliza 2 % del surfactante catiónico CTAB en el buffer de lisis, para favorecer la eliminación de compuestos fenólicos y polisacáridos, debido a que los miembros de la familia *Myrtaceae*, como la guayaba, se caracterizan por su rico contenido de terpenos, taninos, compuestos fenólicos, polisacáridos y otros metabolitos secundarios. Son los compuestos fenólicos los responsables de la generación de quinonas, que se unen a la hebra de RNA volviéndola insoluble, impidiendo su uso posterior para análisis moleculares (De Avelar et al., 2021), como PCR y qPCR; para evitar la oxidación y remover los polifenoles se le adicionó el antioxidante polivinilpirrolidona (PVPP) al buffer de lisis (Cheong-Xin et al., 2004). Así mismo, se aumentó la concentración de CTAB (3 %) y NaCl (5 M), que en conjunto con el PVPP promueven la lisis celular y evitan la adición de polifenoles y RNAsas en la pastilla de RNA (Vennapusa et al., 2020). Finalmente, el RNA extraído se precipitó con LiCl 8 M, para evitar contaminación por DNA (Walker y Lorsch, 2013).

Los resultados de la extracción de fruto verde, visualizados en un gel de agarosa 1 % (Fig. 20) mostraron una buena integridad de las bandas de RNAr, con proporción de tamaño 2:1 de la subunidad ribosomal 28S y 18S (Aranda et al., 2012), sin embargo, no se encontró rastro de la 5.8S perteneciente a los RNAs de transferencia (tRNA), ya que el LiCl precipita los RNAs superiores a 100 nt, por lo cual los tRNA, miRNAs entre otros RNAs pequeños no se obtienen mediante este método (Walker y Lorsch, 2013).



**Figura 20.** Extracción de RNA de fruto verde de guayaba. Las dos bandas corresponden a las dos subunidades del RNAr. Se corrió 2  $\mu$ L de RNA en un gel de agarosa 1 %.

Respecto al rendimiento, la extracción de RNA de los frutos, independientemente del nivel de estrés por cobre inducido, osciló entre 244.5-617, 228-391.8 y 237.6-787.7 ng/ $\mu$ L (Tabla 8) para fruto en estadio verde, rayado y maduro, respectivamente. La concentración obtenida es superior a la reportada por De Avelar y colaboradores (2021) para hojas de guayabas variedad Paluma y Cortibel

(386.28-676.87 ng/μL) y en hojas de 15 genotipos de guayaba de India (229.1-485.3 ng/μL) (Rani et al., 2019). Contrario a lo esperado, no se encontró diferencia entre la concentración y pureza en las extracciones de RNA de los tratamientos de los tejidos con estrés por cobre, a pesar de la formación de EROS en la planta desde las primeras 4 h de tratamiento, las cuales fueron verificados por los marcadores de estrés testeados (actividad catalasa, antocianina y clorofila), quienes tienen un efecto mutagénico y degradativo en el DNA y RNA, afectando por lo tanto, la extracción de RNA (De Avelar et al., 2021).

**Tabla 8.** Cuantificación de RNA obtenidos de hoja y fruto (verde, rayado y maduro) de *P. guajava* bajo estrés por cobre.

Tejido	Estrés por cobre											
	Control			4 h			8 h			12 h		
	$\frac{[ng]}{[\mu L]}$	$\frac{260}{280}$	$\frac{260}{230}$	$\frac{[ng]}{[\mu L]}$	$\frac{260}{280}$	$\frac{260}{230}$	$\frac{[ng]}{[\mu L]}$	$\frac{260}{280}$	$\frac{260}{230}$	$\frac{[ng]}{[\mu L]}$	$\frac{260}{280}$	$\frac{260}{230}$
Hoja	85.2 ± 15.9	2	2.2 ± 0.1	38.8 ± 7.8	1.9	2.1 ± 0.2	42.8 ± 4	1.9	2	64.8 ± 12.2	1.9	2.1
Fruto verde	617 ± 134.8	2	2 ± 0.1	244.5 ± 43.8	2	2.2 ± 0.1	454.5 ± 92.8	2.1	2.3 ± 0.2	458.6 ± 102.7	2.1	2.3 ± 0.1
Fruto rayado	506 ± 40.6	1.9	2.2 ± 0.2	391.8 ± 151	2	1.9 ± 0.2	228 ± 95.9	2	2.2	386.9 ± 80.4	2	2.2 ± 0.1
Fruto maduro	237.6 ± 124.8	2 ± 0.1	2.2 ± 0.2	787.7 ± 164.2	2	2.3 ± 0.1	619 ± 168	2	2 ± 0.1	273.1 ± 58.8	2	2 ± 0.1

Nota: la pureza está indicada por el cociente de absorbancia a λ 260 y 280 nm y λ 260 y 230 nm. Todas las muestras se hicieron con seis repeticiones, de los cuales se calculó la media y desviación estándar.

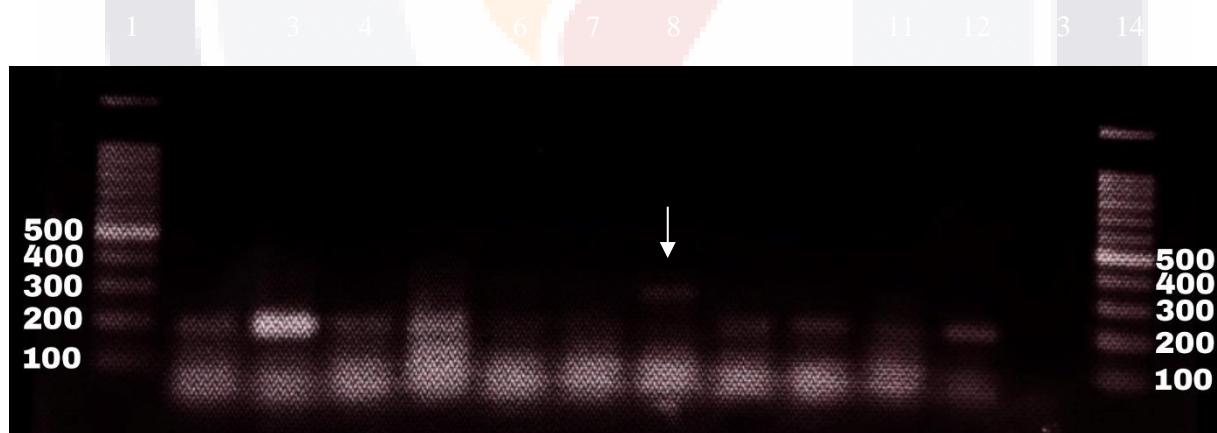
En hoja el rendimiento fue sumamente inferior al obtenido en fruto (38.8-85.2 ng/μL), ya que en su extracción se utilizó la mitad de tejido pulverizado pues al haber absorbido mayor concentración de cobre (Fig. 16b), las especies reactivas presentes en la hoja después del estrés oxidativo fueron imposibles de eliminar en concentraciones más elevadas (datos no mostrados).

La pureza del RNA extraído se confirma con la cuantificación a tres longitudes de onda, λ 260, 280 y 230 nm, donde el cociente Abs 260/280 y Abs 260/230 debe ser de 2.0 y 2.0-2.2, respectivamente; valores inferiores a 2.0 indican la presencia de carbohidratos, proteínas, compuestos fenólicos y aromáticos (Thermo Fisher Scientific, 2015). Los resultados promedio de la extracción de cada

órgano de guayaba (Tabla 8) denotan un RNA íntegro y puro, con valores cercanos a 2-2.2, los cuales carecen de fenoles y carbohidratos, pudiendo deberse a la adición de PVPP (De Avelar et al., 2021) y LiCl, como menciona Cheong-Xin et al. (2004) en la precipitación de RNA de las semillas recalcitrantes de *Porphyra*. Esto había sido reportado para la variedad Paluma y Cortibel, que obtuvieron valores más cercanos a 2 y 2-2.2, respectivamente utilizando el método CTAB, que con kits comerciales, como PureLink RNA Kit y RNeasy Plant Kit, quienes además obtuvieron rendimientos 6, 6 y 19 veces inferiores a los de CTAB (De Avelar et al., 2021).

Los valores elevados de rendimiento y pureza también están sustentados en la concentración de LiCl final utilizada (2 M) que favorece el rendimiento del RNA obtenido, así como la eliminación de carbohidratos de la muestra; además que el tiempo de precipitado fue de 3 h, recomendado en especies recalcitrantes para evitar la degradación del RNA en el tiempo de incubación (Cheong-Xin et al., 2004).

Los RNAs fueron tratados con DNAsa para eliminar las trazas de DNA extraído por el LiCl. Posteriormente, se sintetizó el cDNA de cada una de las muestras y se verificó su funcionalidad y pureza mediante una PCR de ACC oxidasa (Fig. 21). Esto fue debido a que el gen de ACC oxidasa genera 2 bandas (300 y 200 pb) en aquellos cDNAs contaminados con DNA, como el caso del fruto rayado 8 h y una única banda de 200 pb para los cDNAs puros.



**Figura 21.** RT-PCR de ACC oxidasa. Producto de RT-PCR de ACC oxidasa perteneciente a cDNA puro de fruto verde (FV), rayado (FR) y maduro (FM) y bajo estrés por cobre (4 h, 8 h y 12 h de absorción de  $\text{CuSO}_4$ ). 1) Marcador de peso molecular de 100 pb; 2) FV control; 3) FV 4 h; 4) FV 8 h; 5) FV 12 h; 6) FR control; 7) FR 4 h; 8) FR 8 h; 9) FR 12 h; 10) FM control; 11) FM 4 h; 12) FM 8 h; 13) FM 12 h y 14) Marcador de peso molecular de 100 pb. Todos los cDNAs utilizados amplificaron una banda única de 200 pb, con excepción de FR 8h quien mostró contaminación por DNA al amplificar a 300 pb y F12 h quien no presentó bandedo.

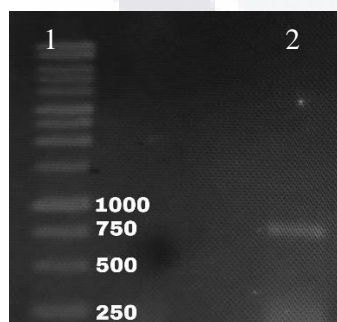
## 7.6 RT-PCR

Para la comprobación de la funcionalidad de los oligonucleótidos diseñados, flanqueantes de la región de unión del miRNA398 se realizaron pruebas PCR y RT-PCR de cada gen, utilizando DNA y cDNA respectivamente, para denotar la diferencia del tamaño del amplicón. El fragmento obtenido por la PCR y RT-PCR al coincidir con el tamaño deseado, asegura la amplificación del fragmento específico. Dichas pruebas se realizaron utilizando 1 µL DNA y cDNA, de fruto verde, respectivamente, con una concentración final de 200 ng/µL.

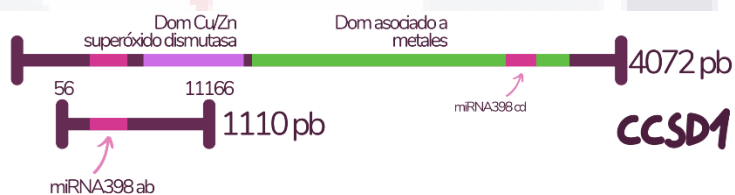
### 7.6.1 RT-PCR de CCSD1 en cDNA

Para el gen CCSD1 y partiendo de DNA se obtuvo una única banda de aproximadamente 750 pb de los 1110 pb esperados (Fig. 22ab). Utilizando cDNA se obtuvo una única banda de aproximadamente 500 pb de los 553 pb esperados (Fig. 22cd) para el fragmento perteneciente al transcrito de CCSD1.

De acuerdo con el alineamiento múltiple entre el fragmento de CCSD1 y la CCSD1 de *E grandis*, se observó que el producto de RT-PCR obtenido abarca desde el nucleótido 56 al 609 del transcrito del gen perteneciente a *P. guajava*, esta región contiene el sitio de unión del miRNA398ab localizado entre los nucleótidos 87 y 106 nt (Fig. 22d).

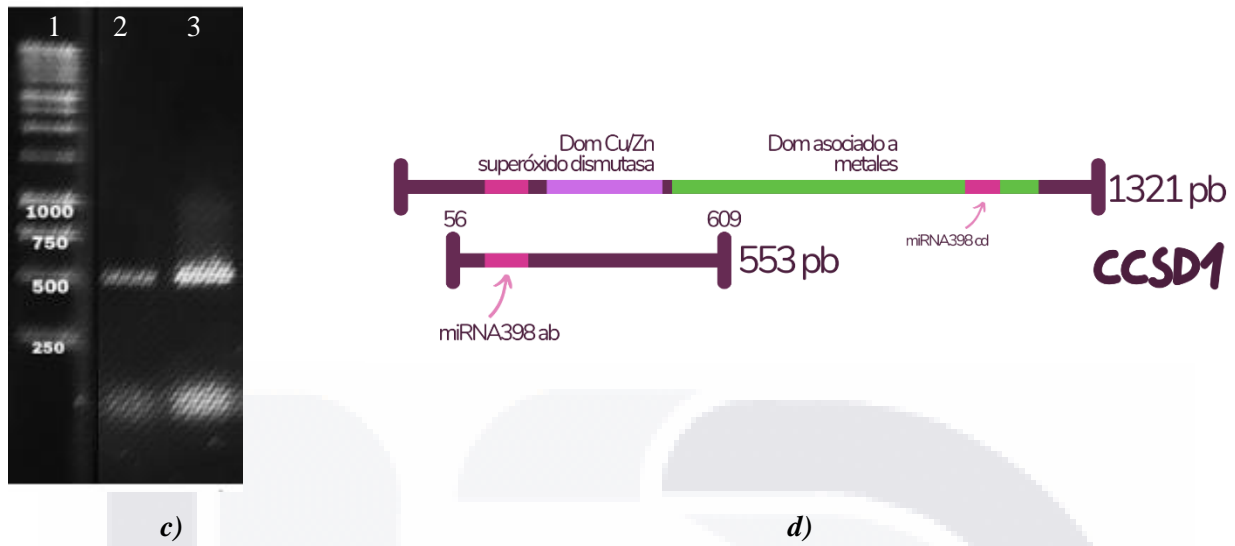


a)



b)

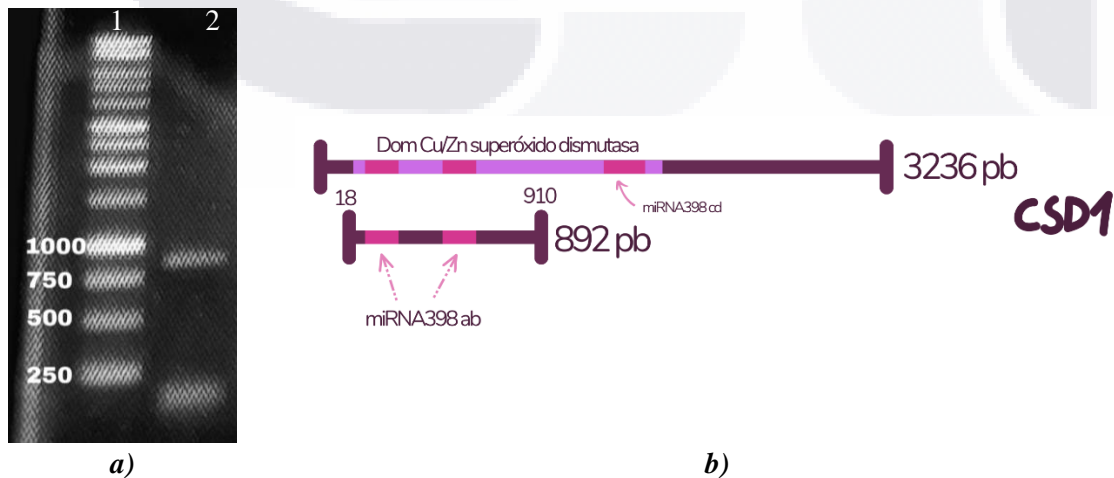


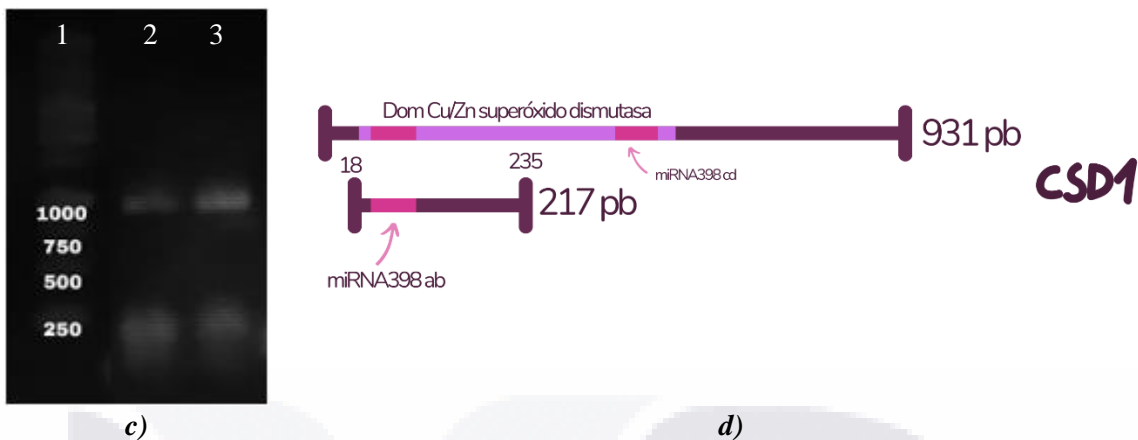


**Figura 22.** Fragmento del gen *CCSD1* de fruto verde de guayaba. *a)* Producto de PCR perteneciente al gen *CCSD1*, partiendo de DNA. 1) Marcador de peso molecular, 2) producto de PCR. *b)* Construcción del gen en *P. guajava*. En la parte superior del gen marcada con dos dominios, el dominio Cu/Zn superóxido dismutasa (morado) y el dominio asociado a metales (verde). En la parte inferior el fragmento obtenido. *c)* Producto de RT-PCR perteneciente al gen *CCSD1*, partiendo de cDNA. 1) Marcador de peso molecular, 2-3) producto de RT-PCR. *d)* Construcción del transcrito del gen en *P. guajava*.

### 7.6.2 RT-PCR de CSD1 en cDNA

Los oligonucleótidos diseñados para el gen CSD1 partiendo de DNA abarcan del nucleótido 19 al 910 nt, con un fragmento de 892 pb y de 217 pb utilizando cDNA. Se obtuvieron dos bandas de aproximadamente 900 y 200 pb (Fig. 23), las cuales corresponden al fragmento de DNA y cDNA, respectivamente, lo cual indica que el cDNA utilizado contenía trazas de DNA.

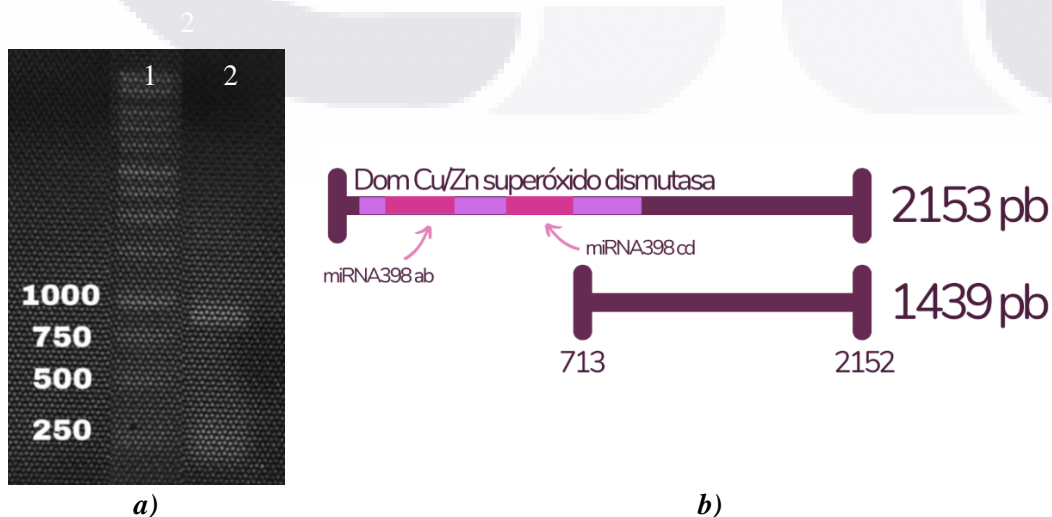


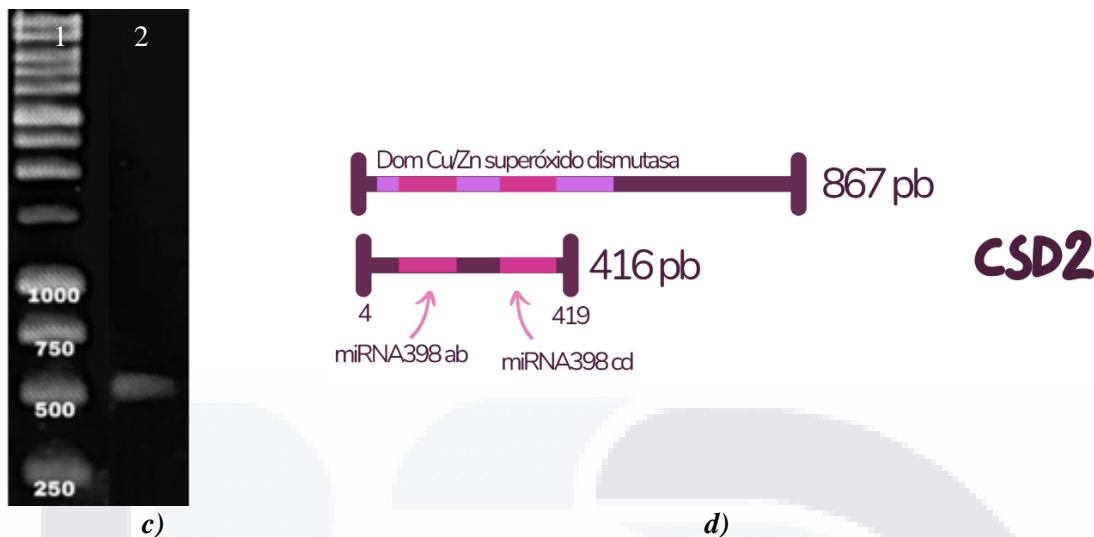


**Figura 23.** Fragmento del gen *CSD1* en fruto verde de guayaba. *a)* Producto de PCR perteneciente al gen *CSD1*, partiendo de DNA. 1) Marcador de peso molecular, 2) producto de PCR. *b)* Construcción del gen de *P. guajava*. En la parte superior del gen se encuentra el dominio Cu/Zn superóxido dismutasa (morado). En la parte inferior el fragmento obtenido, el cual incluye la unión al microRNA398*ab* *c)* Producto de RT-PCR perteneciente al transcrito de *CSD1*, partiendo de cDNA. 1) Marcador de peso molecular, 2-3) producto de RT-PCR. *d)* Construcción del transcrito del gen de *P. guajava*.

### 7.6.3 RT-PCR de *CSD2* en cDNA

Para el fragmento *CSD2* se obtuvieron 4 bandas partiendo de DNA, aproximadamente en 1400, 1000, 750 y 400 pb (Fig. 23*a*), donde la primera es la única que corresponde al fragmento esperado de 1440 pb. Sin embargo, debido a la temperatura precisa de alineamiento de los oligonucleótidos utilizados (50 °C), el aumentar la temperatura de alineamiento para obtener el fragmento de 1440 pb, disminuyó la nitidez de las bandas, y por consiguiente la concentración del amplicón. Por otro lado, con cDNA se obtuvo una única banda de aproximadamente 500 pb (Fig. 24*c*) correspondiente al transcrito del gen desde el nucleótido 400-866 nt, de 466 pb (Fig. 24*d*).





**Figura 24.** Fragmento del gen *CSD2* en fruto verde de guayaba. *a)* PCR del gen *CSD2*, partiendo de DNA. 1) Marcador de peso molecular, 2) producto de PCR. *b)* Construcción del gen de *P. guajava*. En la parte superior se encuentra el dominio Cu/Zn superóxido dismutasa (morado). En la parte inferior el fragmento obtenido. *c)* RT-PCR del gen *CSD2*, partiendo de cDNA. 1) Marcador de peso molecular, 2) producto de RT-PCR. *d)* Construcción del transcrito del gen de *P. guajava*.

## 7.7 qPCR

Se midió la expresión relativa de las enzimas antioxidantes CSD, ya que, el estrés oxidativo provocado por los tratamientos de cobre induciría la sobreexpresión de estas enzimas para la eliminación de las EROS producidas (Ramanjulu et al., 2006). Dicha sobreexpresión de estos genes generaría un decaimiento en la actividad y expresión del miRNA398 cuya función se centra en la regulación de las CSD. Por otra parte, también se midió la expresión de la enzima ACC oxidasa ya que se espera que el estrés inducido inhiba su expresión reduciendo la producción de etileno, el cual inhibe la expresión del miRNA398, aumentando la actividad de sus genes objetivo (Lu et al., 2011). Esto ha sido reportado previamente por Borsani y colaboradores (2001), quienes utilizando hojas de *Lotus corniculatus* expuestas a sequía por 4 h, potenciaron la actividad de MnSOD, Cu/ZnSOD y FeSOD para la mitigación del estrés inducido.

### 7.7.1 Expresión relativa de CCSD1

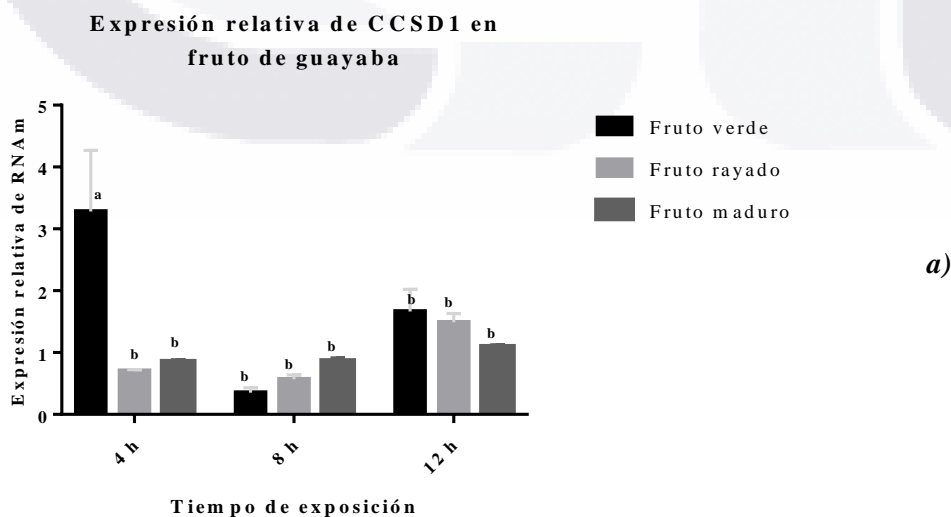
Para el gen de la CCSD1 (Fig. 25a) sus mayores niveles de expresión fueron en fruto verde a las 4 h (3.28), seguido de un decaimiento a las 8 y 12 h (0.35 y 1.66, respectivamente), provocado muy probablemente al exceso de estrés por parte de las EROS. En fruto rayado y maduro presentó un

comportamiento diferente, incrementando su expresión relativa proporcionalmente al aumento del tiempo de exposición a cobre de 0.7, 0.57 a 1.5 para fruto rayado y de 0.83, 0.85 a 1.07 en fruto maduro a las 4, 8 y 12 h de exposición a cobre, respectivamente.

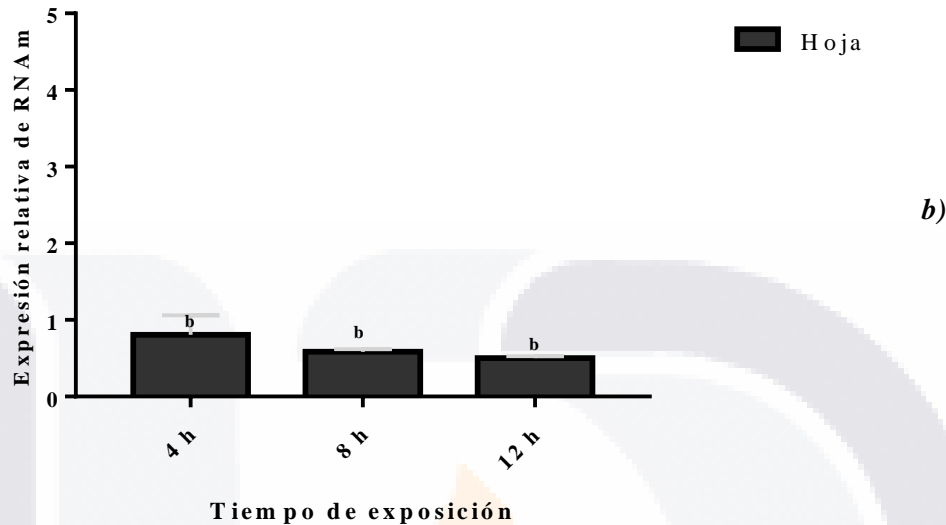
De forma contraria, en hoja la expresión de la CCSD1 (Fig. 25b) no mostró variación entre tratamientos, manteniéndose entre 0.5-0.8. Esto pudo ser debido a que la ingesta de cobre en hoja ocurrió desde la hora de exposición de forma significativa, por lo que, al analizar la expresión a las 4 h de absorción de cobre, el estrés oxidativo pudo ser tan excesivo que inhibió la expresión de la CCSD1, manteniéndose mínima en los tratamientos posteriores.

Resultados similares han sido descritos en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), donde se ha encontrado que al aumentar la dosis de 20 a 125 mg Cu/L se produjo un incremento en la producción de las CSD de hasta un 260 % sin embargo, en altas dosis (500 mg/L) la actividad de la CSD disminuyó hasta 63.14 %, ya que la producción de EROS en la planta excedió su capacidad de respuesta (López-Vargas et al., 2018; Ban et al., 2011); y con el estudio de Brahim y Mohamed (2011) quienes encontraron un aumento en la actividad de la superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa al inducir estrés por Cu en *Atriplex hallmus*, debido al mecanismo de protección de la planta.

Debido a que la expresión relativa de la CCSD1 en frutos rayado y maduro no fue significativa dentro de las 12 h de exposición a cobre, se propone un tratamiento posterior de exposición que supere las 12 h para denotar si existe la sobreexpresión de la CCSD1.



**Expresión relativa de CCSD1 en  
hoja de guayaba**

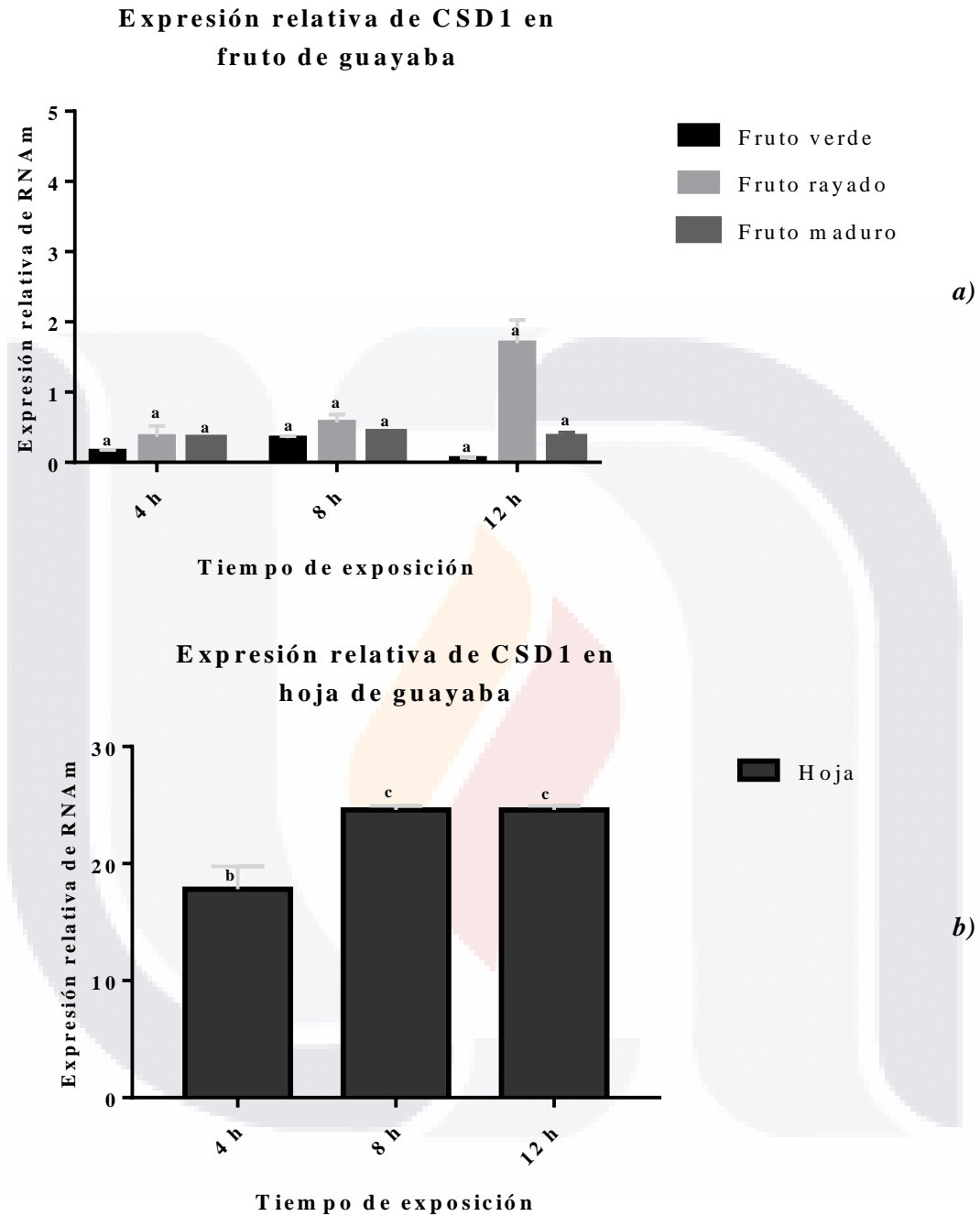


**Figura 25.** Expresión relativa del RNAm de CCSD1 en frutos y hoja de guayaba bajo estrés por cobre. *a)* Expresión relativa en frutos estadio verde, rayado y maduro ante una exposición a cobre por 4, 8 y 12 h. *b)* Expresión relativa en hoja ante una exposición a cobre por 4, 8 y 12 h. Las líneas grises indican la desviación estándar, y las letras la diferencia significativa ( $\alpha$  0.05) cada tratamiento.

**7.7.2 Expresión relativa de CSD1 y CSD2**

En hoja y en fruto verde la expresión de la CCSD1 muestra una relación proporcional con las expresiones de las CSD1 y CSD2 (Fig. 26, 27) en los tratamientos de 8 y 12 h. Estos resultados eran esperados, debido a que la CSD1 y CSD2 son apoproteínas activadas por acción de la CCSD. En fruto (Fig. 26a), únicamente el estadio rayado mostró un aumento en la expresión de la CSD1 de 0.36, 0.57 a 1.7 para los tratamientos de 4, 8 y 12 h de exposición a cobre, respectivamente. Mientras que en hoja (Fig. 26b) su expresión comenzó a las 4 h con 17.82 y aumentó hasta 24.6 a las 12 h, valores aproximadamente 50 y 14 veces superiores a los obtenidos en fruto. Correspondiendo con las cantidades de cobre absorbidos que para fruto verde y rayado fue de 1.38 mg Cu/L, fruto maduro de 0.42 mg Cu/L y hoja de 2.27 mg Cu/L.

Dichos niveles de expresión de las CSD1 y CSD2 se han reportado previamente en *Arabidopsis* bajo 8 h de estrés lumínico y oxidativo por  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  y metil-viológeno (Ramanjulu et al., 2006).



**Figura 26.** Expresión relativa del RNAm de CSD1 en frutos y hoja de guayaba bajo estrés por cobre. **a)** Expresión relativa en frutos estadio verde, rayado y maduro ante una exposición a cobre por 4, 8 y 12 h. **b)** Expresión relativa en hoja ante una exposición a cobre por 4, 8 y 12 h. Las líneas grises indican la desviación estándar, y las letras la diferencia significativa ( $\alpha$  0.05) cada tratamiento.

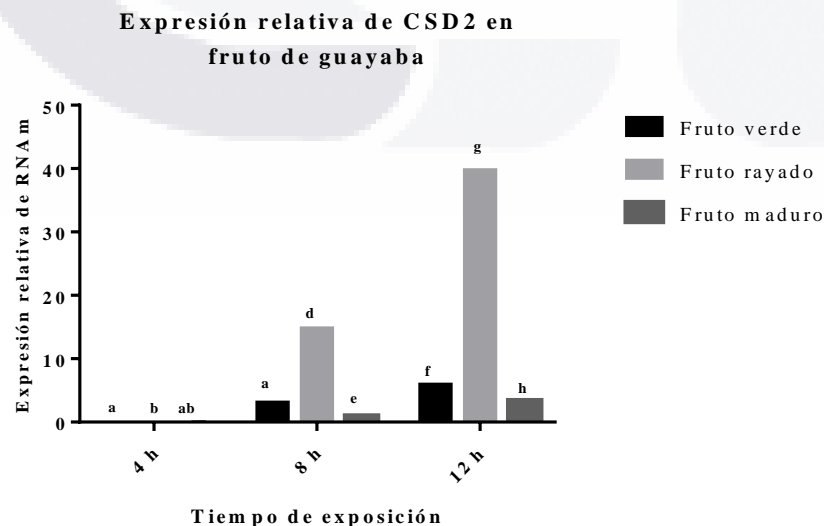
Por su parte, la CSD2 presentó niveles de expresión mayores en todos los tejidos (Fig. 27) a comparación de su contraparte citosólica (Fig. 26). Estos valores de expresión muestran una



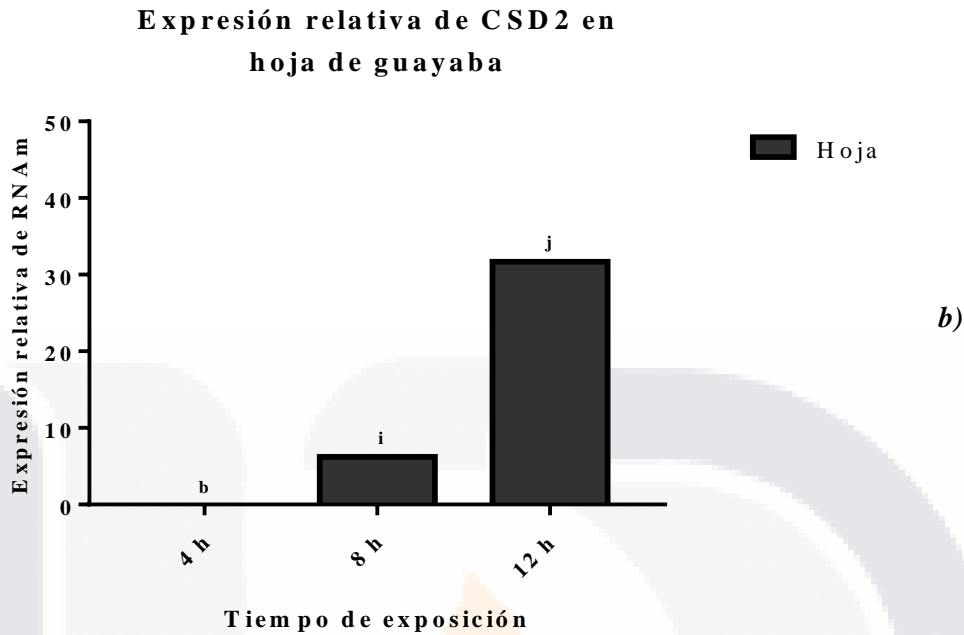
tendencia ascendente con respecto a la acumulación de cobre en tejido, concordando con lo reportado por Lu et al. (2011) en una variedad de arroz (*Oryza sativa* cv. Nipponbare), quienes al sobreexpresar el gen de la CSD2, observaron una disminución proporcional de la actividad de la CSD1, implicando que la sobreexpresión de la CSD2 reprime la expresión de la CSD1.

En fruto verde y maduro se observó la menor expresión, con valores de 3 a 5.86 en estadio verde y de 0.75 a 3.2 en maduro a las 8 y 12 h, respectivamente. En fruto rayado el incremento se dio de 14.7 a 39.7 a las 8 y 12 h, respectivamente. Esta misma relación se encontró en hoja, con un aumento de 6.2 a 31.7 de 8 a 12 h de exposición (Fig. 27b). Estos perfiles de expresión de CSD2 se han reportado en *Arabidopsis* expuesta a  $\text{CuSO}_4$  200  $\mu\text{M}$  por 24 h, encontrando un aumento a las 4 y 1 h de absorción de cobre en la concentración de CSD1 y CSD2, respectivamente (Lu et al., 2011).

La expresión bajo condiciones naturales de la CSD2 es constante y flexible a los cambios en los niveles de EROS producidas en el cloroplasto y así evitar alteraciones en sus procesos fotosintéticos (Ramanjulu et al., 2006). Por esta razón, al aumentar la concentración de cobre en fruto, se sobreexpresa la CSD2 mitigando el estrés oxidativo. Por otra parte, la expresión de la CSD1 no se dio de manera significativa entre tratamientos, siendo semejantes a los obtenidos de la actividad de la catalasa, esto podría deberse a que el estrés inducido en fruto fue mitigado principalmente por acción de la CSD2. Contrario al fruto, en hoja se vio un incremento en la expresión relativa de la CSD1 y CSD2, proporcional a los tiempos y concentraciones de cobre en el tejido.



a)



**Figura 27.** Expresión relativa del RNAm de CSD2 en frutos y hoja de guayaba bajo estrés por cobre. **a)** Expresión relativa en frutos estadio verde, rayado y maduro ante una exposición a cobre por 4, 8 y 12 h. **b)** Expresión relativa en hoja ante una exposición a cobre por 4, 8 y 12 h. Las líneas grises indican la desviación estándar, y las letras la diferencia significativa ( $\alpha$  0.05) cada tratamiento.

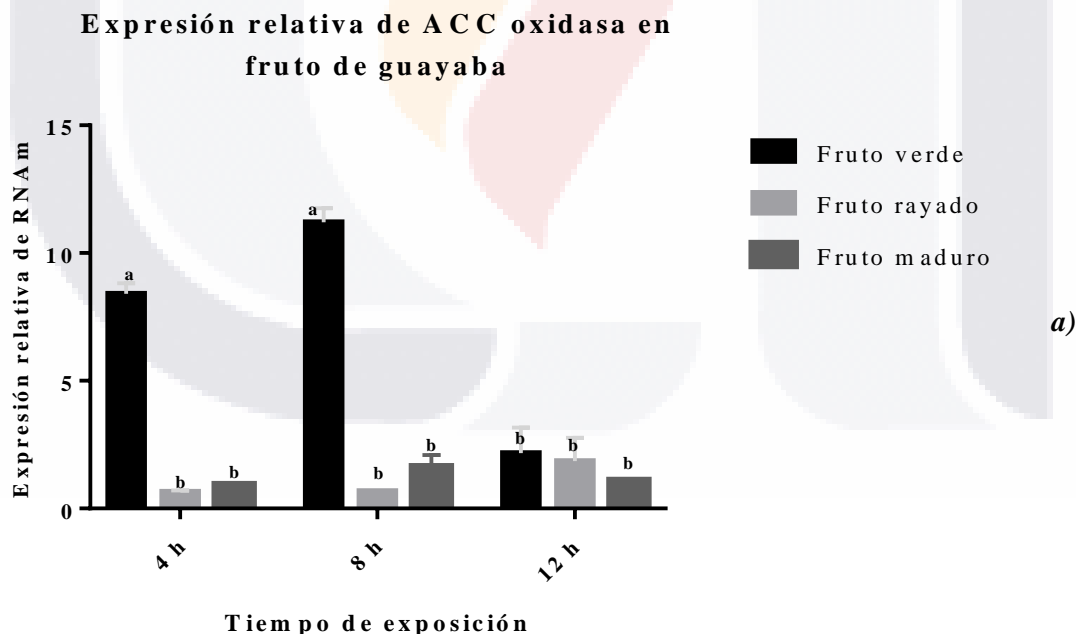
Debido a que el estrés oxidativo indujo la expresión de las CSD, principalmente de la CSD2, se puede aseverar que la expresión del miRNA398 se vio disminuida en fruto rayado, seguido de hoja, fruto verde y maduro; este comportamiento fue reportado por Ramanjulu y colaboradores (2006), quienes generaron dos plantas transgénicas de *Arabidopsis*, la primera con sobreexpresión de la CSD2 y la segunda con una CSD2 mutante en su secuencia de reconocimiento del miRNA398 (CSD2m), evitando su regulación por el miRNA398. También observaron que la línea de CSD2m tuvo mayor adaptación al estrés lumínico y por cobre, al germinar semillas de *Arabidopsis* en medios suplementados con  $175 \mu\text{M Cu}^{2+}$ , con rendimiento del 75 %, a diferencia de sus contrapartes, *Arabidopsis* control (0 %) y *Arabidopsis* con sobreexpresión de la CSD2 (20 %); así como menores efectos por el estrés, como la pérdida de clorofila, peroxidación de lípidos y producción de antocianinas, indicando que el principal efector contra la tolerancia a estreses oxidativos y por tanto, el responsable del sobrellevo del estrés en la planta es la presencia y regulación del miRNA398 y no la cantidad de CSD2 presente en la planta, ya que al sobreexpresar la CSD2 no se tuvo un efecto inhibitorio a las consecuencias del estrés. Esto se reforzó al utilizar

los transgénicos CSD2m y la línea de *Arabidopsis* con el miRNA398 suprimido (Cosup#21), los cuales mostraron resultados similares (Ramanjulu et al., 2006).

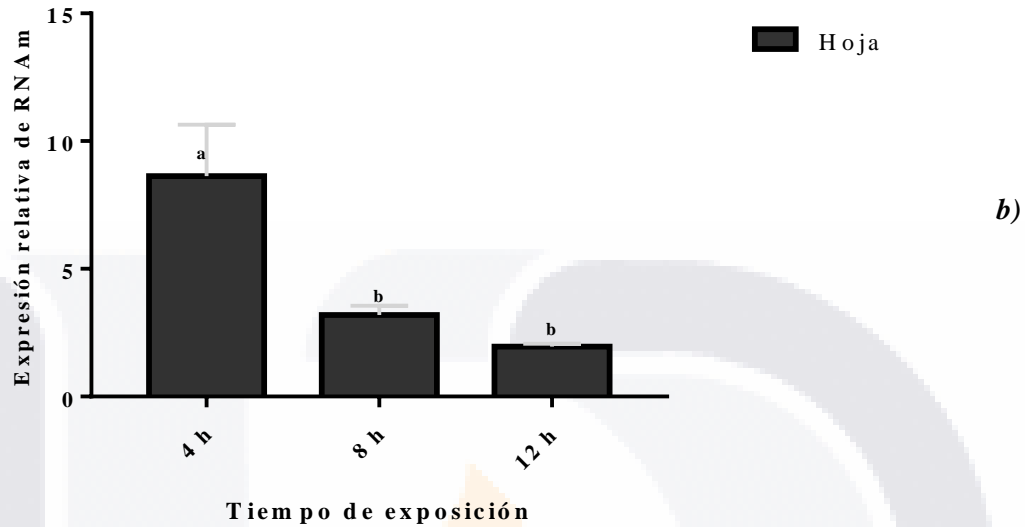
### 7.7.3 Expresión relativa de ACC oxidasa

La ACC oxidasa en frutos (Fig. 28a) únicamente se ve activa en fruto verde, incrementando su expresión de 8.4 a 11.2 a las 4 y 8 h, seguida de un decline a las 12 h. En fruto rayado y maduro no presentó actividad, lo cual indicaría que la producción de etileno y el proceso de maduración del fruto posiblemente se vio inhibido por la exposición de cobre, mismo caso del tratamiento de 12 h en fruto verde. En hoja la expresión de la ACC oxidasa disminuyó de 8, 3 a 1 para los tratamientos de 4, 8 y 12 h de exposición (Fig. 28b).

Este perfil de expresión de la ACC oxidasa contrario al de las CSD en frutos y hoja, era de esperarse, ya que la expresión de las CSD se ve regulada por el cianuro, metabolito secundario producido en misma proporción que el etileno, por parte de la ACC oxidasa (Hernández-Nistal et al., 2002).



**Expresión relativa de ACC oxidasa en hoja de guayaba**



**Figura 28.** Expresión relativa del RNAm de ACC oxidasa en frutos y hoja de guayaba bajo estrés por cobre. **a)** Expresión relativa en frutos estadio verde, rayado y maduro ante una exposición a cobre por 4, 8 y 12 h. **b)** Expresión relativa en hoja ante una exposición a cobre por 4, 8 y 12 h. Las líneas grises indican la desviación estándar, y las letras la diferencia significativa ( $\alpha$  0.05) cada tratamiento.

**VIII. Conclusión**

Las secuencias de los genes y las proteínas codificantes de *CCSD1*, *CSD1* y *CSD2* de *P. guajava* se mantienen altamente conservadas entre especies de la familia *Myrtaceae*, principalmente en la región correspondiente al dominio superóxido dismutasa.

En la inducción por cobre se observó que el pedúnculo del fruto y tallo de hoja expuestos por 12 h tienen la mayor cantidad de cobre. El estrés oxidativo por cobre fue comprobado con el decaimiento en la producción de clorofila y actividad de catalasa, así como con el aumento en la producción de antocianina en hoja conforme aumentó el tiempo de exposición de cobre.

La expresión de los genes *CSD1*, *CSD2* y *ACC oxidasa* mostraron el comportamiento esperado; la *CSD1* y *CSD2* actuaron en conjunto activándose desde las 8 y 12 h para *CSD1* en hoja y fruto rayado, respectivamente y desde las 8 h para *CSD2* en todos los tejidos, por lo que se podría sugerir que la mitigación del estrés inducido se dio principalmente por la *CSD2*. Finalmente, la *ACC*

oxidasa mostró una reducción en su expresión dependiente del tiempo de exposición de cobre, lo que indica que la producción de etileno se ve comprometida posiblemente por la inducción de cobre y sobreexpresión de las CSD1 y CSD2.

## IX. Referencias

- Abu-Bakr A., Abu-Goukh y Hind A. (2003). Changes in pectic enzymes and cellulase activity during guava fruit ripening. *Food Chemistry*. 83: 213-218
- Aranda P., LaJoie D. y Jorcyk C. (2012). Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis* 33(2): 366-369
- Arora J. y Singh J. (1971). Some responses on guava (*Psidium guajava* L.) to copper spray. *Indian Journal of Horticulture*. 28(2): 108-113
- Ban Q., Liu G. y Wang Y. (2011). A DREB gene from *Limonium bicolor* mediates molecular and physiological responses to copper stress in transgenic tobacco. *Journal of Plant Physiology*. 168(5): 449- 458
- Batista Silva W., Cosme Silva G., Bortolini Santana D., Rodrigues Salvador A., Barbosa Medeiros D., Belghith I., Martins da Silva N., Menezes Cordeiro M. y Misobutsi G. (2018). Chitosaan delays ripening and ROS production in guava (*Psidium guajava* L.) fruit. *Food Chemistry*. 242: 232-238
- Bapat V., Jagtap U., Ghag S. y Ganapathi T. (2019). Molecular approaches for the improvement of under-researched tropical fruit trees: jackfruit, guava, and custard apple. *International Journal of FruitScience*. 20(3): 233-281
- Bennett A. y Labavitch J. (2008). Ethylene and ripening-regulated expression and function of fruit cell wall modifying proteins. *Plant Science*. 175: 130-136
- Berveiller D., Kierzkowski D. y Damesin C. (2007). Interspecific variability of stem photosynthesis among tree species. *Tree Physiology*. 27: 53-61
- Bi F., Meng X., Ma C. y Yi G. (2015). Identification of miRNAs involved in fruit ripening in *Cavendish* bananas by deep sequencing. *BMC Genomics*. 16(776)
- Binder B. (2020). Ethylene signaling in plants. *JBC reviews*. 295(22): 7710-7725
- Borja-Bravo M., García-Salazar J., Cuevas-Reyes V., Arciniega S. y Quintero S. (2019).

Competitiveness and economic efficiency of guava production systems in Calvillo, Aguascalientes.

- Borsani O., Díaz P., Agius M., Valpuesta V. y Monza J. (2001). Water stress generates an oxidative stress through the induction of a specific Cu/Zn superoxide dismutase in *Lotus corniculatus* leaves. *Plant Science*. 161(4): 757-763
- Boyd S., Liu L., Bulla L. y Winkler D. (2018). Quantifying the Interaction between Copper-Zinc Superoxide Dismutase (Sod1) and its Copper Chaperone (Ccs1). *J Proteomics Bioinform*, 11(4).
- Brahim L. y Mohamed M. (2011). Effects of copper stress on antioxidative enzymes, chlorophyll and protein content in *Atriplex halimus*. *African Journal of Biotechnology*. 10(50): 10143-10148
- Castillo-González J., Ojeda-Barrios D., Hernández-Rodríguez A., González-Franco A., Robles-Hernández L. y López-Ochoa G. (2018). Zinc metalloenzymes in plants. *Interciencia*. 43(4): 242-248
- Cedillo Jimenez C., Feregrino-Perez A., Guevara-González R. y Cruz-Hernández A. (2020). MicroRNA regulation during the tomato fruit development and ripening: A review. *Scientia Horticulturae*. 270
- Cheong-Xin C., Swee-Sen T., Chai-Ling H., Othman R. y Siew-Moi P. (2004). Optimization of RNA extraction from *Gracilaria changii* (Gracilariales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*. 16: 297-301
- Chen C., Li J., Feng J., Liu B., Feng L., Yu X., li G., Zhai J., Meyers B. y Xia R. (2021). sRNAanno a database repository of uniformly annotated small RNAs in plants. *Horticulture Research*.
- Chen T. W., Ng C., Wang C. y Shyu Y. (2007). Molecular identification and analysis of *Psidium guajava* L. from indigenous tribes of Taiwan
- Chiung-Chih C., Wen-Chi L., Wen-Yu G., Shu-Mei P., Lih-Jen C., Hsou-min L. y Tsung-Luo J. (2005). A copper chaperone for superoxide dismutase that confers three types of Copper/Zinc superoxide dismutase activity in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 139: 425-436
- Chorostecki U. y Palatnik J. (2014). comTAR: a web tool for the prediction and characterization of conserved microRNA targets in plants. *Bioinformatics*. 30(14):2066-7



- Cohu C., Abdel-Ghany S., Gogolin Reynolds K., Onofrio A., Bodecker J., Kimbrel J., Niyogi K. y Pilon M. (2009). Copper delivery by the copper chaperone for chloroplast and cytosolic Copper/Zinc- Superoxide Dismutases: regulation and unexpected phenotypes in an *Arabidopsis* mutant. *Molecular Plant*. 2(6): 1336-1350
- CPHmodels-3.0 - Remote homology modeling using structure guided sequence profiles. Nielsen M., Lundegaard C., Lund O., Petersen TN. *Nucleic Acids Research*, 2010, Vol. 38, doi:10.1093/nar/gkq535. Última vez ingresado el 14 de enero del 2022. Disponible en: <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?CPHmodels-3.2>
- Deepthi P. (2017). Physiological and biochemical changes during fruit growth, maturity and ripening of guava: a review. *Journal of Postharvest Technology*. 05(2): 1-16
- De Avelar Carpinetti P., Sartori Fioresi V., Ignez da Cruz T., Nogueira de Almeida F., Canal D., Ferreira A. y Da Silva Ferreira M. (2021). Efficient method for isolation of high-quality RNA from *Psidium guajava* L. tissues. *Plos ONE* 16(7).
- De Paulo Farias D., Neri-Numa I., De Araújo F. y Pastore G. (2020). A critical review of some fruit trees from the Myrtaceae family as promising sources for food applications with functional claims. *Food Chemistry*. 306
- Díaz Ortega J. y Vera Granda C. (2012). Cuantificación de flavonoides totales y taninos presentes en el extracto acuoso de hojas de *Thea sinensis* L. y su capacidad antioxidante. *UCV Scientia*. 4(2): 161-174
- Doyle J.J. y Doyle J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin*. 11-15.
- Drazkiewicz M., Skorzynska-Polit E. y Krupa Z. (2004). Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*. *BioMetals*. 17: 379-387
- Fabi J., Gonçalves Peroni F. y Araújo Gomez, M. (2010). Papaya, mango and guava fruit metabolism during ripening: postharvest changes affecting tropical fruit nutritional content and quality. *Fresh produce*. 4(1): 56-64
- FAO. 2021. *Major Tropical Fruits: Preliminary results 2020*. Roma. Recuperado de: <https://www.fao.org/3/cb0717en/cb0717en.pdf>. Último acceso el 7 de noviembre del 2021.
- FAO. 2022. *Major Tropical Fruits Statical Compendium 2022*. Roma. Recuperado de: <https://www.fao.org/3/cb0717en/cb0717en.pdf>. Último acceso el 2 de abril del 2023.

- Clustal Omega: Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega Sievers F, Wilm A, Dineen DG, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins D *Molecular Systems Biology* 7 Article number: 539 doi:10.1038/msb.2011.75
- Feng C., Feng C., Lin X., Liu S., Li Y. y Kang M. (2020). 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.
- Feria-Romero I., Astudillo-de la Vega H., Chavez-soto M., Rivera-Arce E., López M., Serrano H. y Lozoya X. (2009). RAPD markers associated with quercetin accumulation in *Psidium guajava*. *Biología plantarum*. 53(1): 125-128
- Fidalgo F., Azenha M., Silva A., de Sousa A., Santiago A., Ferraz P. y Teixeira J. (2013). Copper-induced stress in *Solanum nigrum* L. and antioxidant defense system responses. *Food and Energy Security*. 2(1): 70-80.
- Fischer G. y Melgarejo L. (2021). Ecophysiological aspects of guava (*Psidium guajava* L.). A review. *Revista colombiana de ciencias hortícolas*. 15(2)
- Flores G., Wu SB., Negrin A. y Kennelly E. (2014). Chemical composition and antioxidant activity of seven cultivars of guava (*Psidium guajava*) fruits. *Food Chemistry*.
- Fry S., Miller J. y Dumville. (2002). A proposed role for copper ions in cell wall loosening. *Plant and Soil*. 247: 27-67
- Gaikwad A. y Nimbalkar C. (2005). Phytotoxicity of copper fungicides to guava fruits. *Journal of Environmental biology*. 26(1): 155-156
- García-Rivera L., Váquiro-Herrera H. y Solanilla-Duque J. (2016). Physicochemical characterization and nutritional composition analysis of pineapple guava at three different ripening stages. *Agronomía Colombiana*. 34(2): 217-227
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.; Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press (2005). pp. 571-607. Última vez accesado el 14 de enero del 2022. Disponible en: <https://web.expasy.org/protparam/>
- Goulao L. y Oliveira C. (2008). Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Trends in Food Science & Technology*. 19: 4-25
- NCBI: H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N.

- Shindyalov, P.E. Bourne. (2000) The Protein Data Bank Nucleic Acids Research, 28: 235-242.
- Hernández-Nistal J., Dopico B. y Labrador E. (2002). Cold and salt stress regulates the expression and activity of a chickpea cytosolic Cu/Zn superoxide dismutase. *Plant Science*. 163: 507-514.
- Hoppen C., Müller L., Hänsch S., Uzun B., Milic D., Meyer A., Weidtkamp-Peters S. y Growth G. (2019). Soluble and membrane-bound protein carrier mediate direct copper transport to the ethylene receptor family. *Scientific reports*. 9, 10715
- Htay Naing A. y Kil Kim C. (2020). Abiotic stress-induced anthocyanins in plants: their role in tolerance to abiotic stresses. *Physiologia Plantarum*. 1-13
- Huan C., Jiang L., An X., Yu M., Xu Y., Ma R. y Yu Z. (2016). Potential role of reactive oxygen species and antioxidant genes in the regulation of peach fruit development and ripening. *Plant Physiology and Biochemistry*. 104: 294-303
- InterPro in 2022. Paysan-Lafosse T., Blum M., Chunguransky S., Grego T., Lázaro Pinto B., Salazar G., Bileschi M., Bork P., Bridge A., Colwell L., Gough J., Haft D., Letunic I., Marchler-Bauer P., Mi H., Natale D., Orengo C., Pandurangan A., Rivoire C., Sigrist C., Sillitoe I., Thanki N., Thomas P., Tosatto S., Wu C. y Bateman A. (2022) InterPro in 2022. *Nucleic Acids Research*.
- Jain N., Dhawan K., Malhotra S. y Singh R. (2003). Biochemistry and fruit ripening of guava (*Psidium guajava* L.) compositional and enzymatic changes. *Plant foods for human nutrition*. 58:309-315
- Kadiriye U. (2016). Effects of copper on accumulation, antioxidant activity and MDA content in *Lemna minor*, *Lemna gibba* and *Spirodela polyrrhiza* (L.) *Jornal of Science and Technology*. 9(I): 95-106
- Kairiah J., Ding-Woei J., Habibah R., Ahmad-Mahir A., Aminah A. y Ismail B. (2009). Concentration of heavy metals in guava plant part and soil in the Sungai Wangi Plantation, Perak, Malaysia. *International Journal of Agricultural Research*. 4(10): 310-316
- Karpinska B., Karlsson M., Schinkel H., Steller S., Süß KH., Melzer M. y Wingsle G. (2001). A novel superoxide dismutase with a high isoelectric point in higher plants. Expression, regulation, and protein localization. *Plant Physiology*. 126: 1668-1677.
- Keller M., Zhang Y., Shrestha P, Biondi M. y Bondada B. (2014). Sugar demand of ripening

- grape berries leads to recycling of surplus phloem water via the xylem. *Plant, Cell & Environment*. 38(6): 1048-1059
- Koressaar T, Remm M (2007) Enhancements and modifications of primer design program Primer3 *Bioinformatics* 23(10):1289-91
- Kumar P., Kumar Mishra P. y Singh D. (2014). Heavy metal analysis in root, shoot and leaf of *Psidium guajava* L. by using atomic absorption spectrophotometer. *Poll Res.* 3(4): 135-138.
- Lepp N. (1970). The potential of tree-ring analysis for monitoring heavy metal pollution patterns. *Environ. Pollut.* 9(1): 49-61
- Li Y., Cao X., Zhu Y., Yang X., Zhang K., Xiao Z., Wang H., Zhao J., Zhang L., Li G., Zheng Y., Fan J., Wang J., Chen X., Wu X., Zhao J., Dong O., Chen X. y Chern M. (2019). Osa-miR398b boost H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and rice blast disease-resistance via multiple superoxide dismutases. *New phytologist foundation*. 222(3):1507-1522
- Li Z., Chen W., Zhang C., Du C., Shao G., Cui Y. y Luo P. (2019). RcMYBPA2 of *Rosa chinensis* functions in proanthocyanidin biosynthesis and enhances abiotic stress tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell, tissue and organ culture (PCTOC)*. 137: 441-454.
- Li W., Ma M., Feng Y., Li H., Wang Y., Ma Y., Li M., An F. y Guo H. (2015). EIN2-Directed Translational Regulation of Ethylene Signaling in *Arabidopsis*. *Cell*. 163(3):670-683
- López-Vargas E., Ortega-Ortiz H., Cadenas-Pliego G., De Alba Romenus K., Cabrera de la Fuente M., Benavides-Mendoza A. y Juárez-Maldonado A. (2018). Foliar application of copper nanoparticles increases the fruit quality and the content of bioactive compounds in tomatoes. *Nanotechnology and applied nanosciences*. 8(7): 1020
- Lombardi L. y Sebastiani L. (2005). Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of *in vitro* grown plants. *Plant Science*. 168: 797-802
- Lu Y., Feng Z., Bian L., Xie H. y Liang J. (2011). miR398 regulation in rice of the responses to abiotic and biotic stresses depends on CSD1 and CSD2 expression. *Functional Plant Biology*. 38: 44-53
- Maduwanthi S. y Marapana R. (2017). Biochemical changes during ripening of banana: A review. *International Journal of Food Science and Nutrition*. 2(5): 166-169.
- Martínez M., Molina N. y Boucourt. (1997). Evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium guajava* L. (guayaba). *Rev Cubana Plant Med*. 2(1)

- Marquina V., Araujo L., Ruíz J., Rodríguez-Malaver A. y Vit P. (2008). Composición química y capacidad antioxidante en fruta, pulpa y mermelada de guayaba (*Psidium guajava* L.). Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 58(1)
- Medina M. y Pagano F. (2003). Caracterización de la pulpa de guayaba (*Psidium guajava* L.) tipo “Criolla Roja”. Revista de la facultad de agronomía. 20(1)
- Mejía Mendoza, M. A. (2022). Estudio y análisis de genes de maduración en *Psidium guajava* L. [Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Aguascalientes] Repositorio bibliográfico-Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Mendes de Rezende F. y Furlan C. (2009). Anthocyanins and tannins in ozone-fumigated guava trees. Chemosphere. 76: 1445-1450
- Mittal A., Yadav I., Arora N., Boora R., Mittal M., Kaur P., Erskine W., Chhuneja P., Grill M. y Singh K. (2020) RNA-sequencing based gene expression landscape of guava cv. Allahabad Safeda and comparative analysis to colored cultivars. BMC Genomics. 21, 484
- Mitra T. y Kumar Das S. (2019). Cr (VI) removal from aqueous solution using *Psidium guajava* leaves as green adsorbent: column studies. Applied water science. 9(153)
- Mohamed A., Adel A. y Saleh M. (2011). Antioxidant capacity, antioxidant compounds and antioxidant enzyme activities in five date cultivars during development and ripening. Scientia Horticulturae. 129: 688-693
- Morales Domínguez J. (2022). Capítulo 10 Expresión genética en plantas; transcriptomas y miARNs en Mendoza M. y Enríquez C. (Ed.), Algunas aplicaciones biotecnológicas en plantas y microalgas (1ra ed., Vol. 1. pp. 272). Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Moxon S., Jing R., Szittyá G., Schwach F., Rusholme P., Moulton V. y Dalmay T. (2008). Deep sequencing of tomato short RNAs identifies microRNAs targeting genes involved in fruit ripening. Genome Research. 18(10): 1602-1609
- National Center for Biotechnology Information (NCBI)[Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – [citado 2022 enero 14]. Disponible de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Naqvi N., Ahmed Khan T., Mazid M., Khan F., Quddosi S., Roychowdhury R. y Saxena D. (2014). Phytoremediatory potential of guava and ashok treat three different sites of Bareilly district-a case study. ARPN Journal of Agricultural and Biological Science. 9(3): 101-109

- NEB, 2019. NEB Tm Calculator. [online] Tmcalculator.neb.com. Disponible en <https://tmcalculator.neb.com/#!/main>. Último acceso el 8 junio, 2022.
- Otu Oti W. (2015). Bioaccumulation factors and pollution indices of heavy metals in selected fruits and vegetables from a derelict mine and their associated health implications. *International Journal of Environment and Sustainability*. 4(1): 15-23.
- Padilla-Ramírez J. S., González Gaona E., Esquivel-Villagrana F., Mercado-Silva E., Hernández-Delgado S. y Mayek-Pérez N. (2002). Caracterización de germoplasma sobresaliente de guayabo de la región Calvillo-Cañones, México. *Rev. Fitotec. Mex.* 24(4): 393-399
- Panda S. y Chandra G. (2012). Physicochemical characterization and functional analysis of some snake venom toxin proteins and related non-toxin protein of other chordates. *Bioinformation*. 8(18):891-896.
- Payasi A. y Sanwal G. (2008). Ripening of climacteric fruits and their control. *Journal of Food Biochemistry*. 34: 679-710
- Paull R. y Duarte O. (2012). Tropical fruits. Vol 2. 2da edición. International Wallingford.
- Paull R. y Jung Cheng N. (2000). Heat treatment and fruit ripening. *Postharvest Biology and Technology*. 21: 21-37
- Pérez Gutiérrez R., Mitchell S., Vargas Solis R. (2008). *Psidium guajava*. A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. 117:1-27
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. *J Comput Chem*. 2004 Oct;25(13):1605-12 UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis.
- Pilon M., Ravet K. y Tapken W. (2011). The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1807. 989-998
- Posmyk M., Kontek R. y Janas K. (2008). Red cabbage extract limits copper stress injury in meristematic cells of *Vicia faba*. *Acta Physiol Plant*. 30(4): 481-491
- Prasanna V., Prabha T. y Tharanathan R. (2007). Fruit ripening phenomena-an overview. *Critical reviews in food science and nutrition*. 47(1): 1-19
- Rai M., Asthana P., Jaiswal V. y Jaiswal U. (2010). Biotechnological advances in guava (*Psidium guajava* L.): recent developments and prospects for further research. *Trees*. 24(1): 1-12
- Ramanjulu S., Avnish K. y Jian-Zang Z. (2006). Posttranscriptional induction of two Cu/Zn



- superoxide dismutase genes in Arabidopsis is mediated by downregulation of miRNA398 and important for oxidative stress tolerance. *The Plant Cell*. 18: 2051-2065
- Ramos-Sandoval I., García-Salazar J., Borja-Bravo M., Guajardo-Hernández L., Almeraya-Quintero S. y Arana-Coronado O. (2017). El mercado de la guayaba en Aguascalientes: un análisis para reducir la volatilidad de los precios. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 8.
- Rani S., Sharma JR. y Sehrawat SK. (2019). Standardization the protocol for high genomic DNA yield and quality for guava cultivars. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 8(1S): 77-79
- Rzewuski G., Sauter M. (2008). Ethylene biosynthesis and signaling in rice. *Plant Science*. 175: 32-42
- Sablok G. (2019). Capítulo 7. Crosstalk between plant miRNA and heavy metal toxicity. Noman A., Sanaullah T., Khalíd N., Islam W., Khan S., Kashif M. y Aqeel M. *Plant metallomics and functional omics (a system-wide perspective)*. DOI: 10.1007/978-3-030-19103-0\_7
- Selveraj Y., Pal D., Raja M. y Rawal R. (1999). Changes in chemical composition of guava fruits during growth and development. *Indian Journal of Horticulture*. 56(1): 10-18
- Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. (2017). Guayaba (*Psidium guajava* L.). Recuperado de: <https://www.gob.mx/snics/acciones-y-programas/guayaba-psidium-guajava-l>. Última vez revisado el 7 de noviembre del 2021.
- Sigríst CJA, de Castro E, Cerutti L, Cuche BA, Hulo N, Bridge A, Bougueleret L, Xenarios I. (2012) New and continuing developments at PROSITE *Nucleic Acids Res*. doi: 10.1093/nar/gks1067 PubMed:23161676 [Full text] [PDF version]. Última vez ingresado el 27 de noviembre del 2022. Disponible en: <https://prosite.expasy.org/>
- SNIIM. 2021. Resumen SNIIM de la guayaba. Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados. Recuperado de: <http://www.economia-sniim.gob.mx/analisis/SNIIMproducto.asp?prodC=9037>. Última vez revisado el 7 de noviembre de 2021.
- Su W., Raza A., Gao A., Jiao Z., Zhang Y., Azhar Hussain M., Saher Mehmood S., Yan Lv Y. y Zou X. (2021). Genome-wide análisis and expresión profile of superoxide dismutase (SOD) gene family in rapeseed (*Brassica napus* L.) under different hormones and abiotic stress conditions. *Antioxidants*. 10. DOI: 10.3390/antiox10081182.

- Suman M., Sangma P. y Singh D. (2017). Role of micronutrients (Fe, Zn, B, Mg, Mn and Mo) in fruit crops. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 6(6): 3240-3250
- Termo Fisher Scientific. (2015). Assessment of Nucleic Acid Purity (Nota técnica núm. 52646). <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>
- Tingwa P. y Young R. (1975). Studies on the inhibition of ripening in attached avocado (*Persea americana* Mill.) fruits. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 100(5): 447-449
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15):e115
- Vennapusa A., Somayanda I., Doherty C. y Krishna Jagadish S. (2020). A universal method for high-quality RNA extraction from plant tissues rich in starch, proteins and fiber. *Scientific reports*. 10
- Wahid F., Shehzad A., Khan T. y You Yung K. (2010). MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Molecular Cell Research*. 1803(11): 1231-1243
- Walker S. y Lorsch J. (2013). RNA purification-precipitation methods. En Jon Lorsch ed. *Methods in Enzymology* (337-343). Academic Press.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46, W296-W303 (2018)
- Wenlong D., Pengfei Z., Shuai L., Yuanwei Z. y Ling L. (2021). The copper chaperone CcsA, coupled with superoxide dismutase SodA, mediates the oxidative stress response in *Aspergillus fumigatus*. *Applied and environmental microbiology*. 87(17): 1-16
- Yam Tzec J., Villaseñor Perea C., Romantchik Kriuchkova E., Soto Escobar M. y Peña Peralta M. (2010). Una revisión sobre la importancia del fruto de guayaba (*Psidium guajava* L.) y sus principales características en la postcosecha. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*. 19(4)
- Yruela I. (2009). Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Functional Plant Biology*- 36(5): 409-430

- Zhang C., Ren H., Dai X., Qin Q., Li J., Zhang T. y Sun T. (2019). Spectral characteristics of copper-stressed vegetation leaves and further understanding of the copper stress vegetation index. *International Journal of remote sensing*. DOI: 10.1080/01431161.2018.1563842
- Zheng P., Chen L., Zhang S., Xiaobo S., Qi Z., Qinglin P., Zhensheng K. y Jie L. (2020). A Cu-only superoxide dismutase from stripe rust fungi functions as a virulence factor deployed for conter defense against host-derived oxidative stress. *Environmental Microbiology*. 22(12): 5309-5326
- Zhou G., Liu C., Cheng Y., Ruan M., Ye Q., Wang R., Yao Z. y Wan H. (2022). Molecular evolution and functional divergence of stress-responsive Cu/Zn superoxide dismutases in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 23(13) <https://doi.org/10.3390/ijms23137082>

