

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

Centro de Ciencias Básicas

Departamento de Química

**Aislamiento, caracterización y estudio de la expresión de
cDNAs relacionados con la maduración del fruto de la guayaba
(*Psidium guajava* L.)**

Tesis que presenta

Biólogo. Alberto Isaac Reyes Silva

Para obtener el grado de

Maestría en Ciencias en el Área Biotecnología Vegetal

Director de Tesis

Dr. José Francisco Morales Domínguez

Asesores:

Dr. Héctor Gordon Nuñez Palenius

Dr. Gustavo Hernández Guzmán

Aguascalientes, Ags., Marzo del 2011

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

Centro de Ciencias Básicas

BIOL. ALBERTO ISAAC REYES SILVA
ALUMNO DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN
EL ÁREA DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL,
P R E S E N T E .

Estimado alumno: Reyes:

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 caso práctico titulado: "Aislamiento, caracterización y estudio de la expresión de cDNA relacionados con la maduración del fruto de guayaba (*Psidium guajava L.*)", 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.

A T E N T A M E N T E
Aguascalientes, Ags., 14 de marzo de 2011
"SE LUMEN PROFERRE"
LA DECANO

M. en C. MARTHA CRISTINA GONZÁLEZ DÍAZ



c.c.p.- Archivo
MCGD,mjda





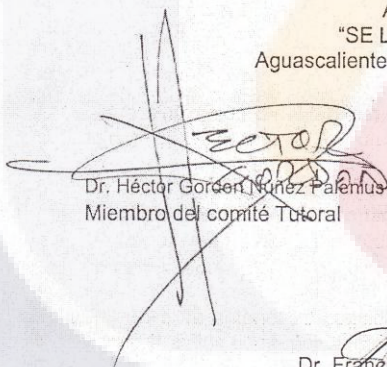
UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE AGUASCALIENTES

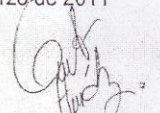
M en C. Martha Cristina González Díaz
Decano del Centro de Ciencias Básicas
Presente:

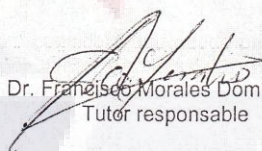
Por medio de este conducto, le comunico que los miembros del comité tutorial del alumno Alberto Isaac Reyes Silva, estudiante de la Maestría en Ciencias en el área de Biotecnología Vegetal, hemos revisado la versión final del escrito de la tesis "Aislamiento, caracterización y estudio de la expresión de cDNA relacionados con la maduración del fruto de guayaba (*Psidium guajava* L.)". Que defenderá en el examen de titulación correspondiente.

Por lo anterior se considera que puede proceder a realizar los trámites administrativos correspondientes y se le asigne la fecha de examen de grado.

ATENTAMENTE
"SE LUMEN PROFERRE"
Aguascalientes, Ags. A 9 de Marzo de 2011


Dr. Héctor Gordon Núñez Palermus
Miembro del comité Tutorial


Dr. Gustavo Hernández Guzmán
Miembro del comité Tutorial


Dr. Francisco Morales Domínguez
Tutor responsable


V.B. Martha



Agradezco este trabajo:

- A la Universidad Autónoma de Aguascalientes por permitirme realizar mis estudios de posgrado.
- Al CONACYT por la beca otorgada No. 298957/228193 ya que estos apoyos permiten continuar con la investigación en nuestro país.
- A mis padres Teresa y Salomón por su apoyo incondicional.
- A Yesika, Raquel y Gael por estar a mi lado.
- A mis hermanos por su apoyo
- A mi tutor Dr. Francisco Morales Domínguez por todos sus conocimientos compartidos, su apoyo, confianza y amistad que deposito en mi para realizar este trabajo.
- A mi asesor Dr. Héctor Gordon Nuñez Palenius por su amistad, ayuda, paciencia y sus valiosos conocimientos y consejos que forman parte fundamental de mi formación académica.
- A mi asesor Dr. Gustavo Hernández Guzmán por su amistad, paciencia, apoyo y conocimientos compartidos para la realización de este trabajo.
- A mis compañeras de laboratorio Cris y Viki por todo su valioso apoyo.

Agradecimiento especial

- Al Dr. José Saúl Padilla Ramírez por su generosidad al contribuir con el material vegetal para la elaboración de este trabajo.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



A mi hijo Gael por la fortaleza y valor que me inspira

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Resumen

El fruto de guayaba (*Psidium guajava* L.) es un producto muy apreciado en el ámbito comercial debido a que contiene un gran valor nutricional. Sin embargo, uno de los principales problemas que enfrenta su comercialización, es la sobremaduración en post-cosecha, lo cual repercute en grandes pérdidas para los agricultores y comerciantes. Este tipo de maduración es típico de frutos climatéricos y se caracteriza por un incremento en la respiración y producción de etileno (Jain *et al.*, 2003). El etileno es una hormona vegetal y en su biosíntesis intervienen 2 enzimas principales: 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa (ACCs) y oxidasa (ACCo); y una de sus funciones es promover la maduración, por el aumento en los niveles de enzimas hidrolíticas como las poligalacturonasas (PGs), endo-1,4- β -glucanasas (EGs) y proteínas como α -expansinas (α -Exp), entre otras más; que de manera coordinada e interdependiente modifican la pared celular vegetal resultando en el ablandamiento del tejido (Cosgrove, 2005). En general el proceso de maduración involucra varios eventos bioquímicos, fisiológicos y moleculares que se encuentran genéticamente programados (Zhong-Yan *et al.*, 2000). Para entender dicho proceso a nivel molecular en el fruto de guayaba, en el presente trabajo se realizó la identificación, caracterización y estudio de expresión de cDNAs correspondientes a PGs (*PgPG1*), EGs (*PgEG1*), ACCs (*PgACS1*), ACCo (*PgACO1*) y α -Exp (*PgExp1*, *PgExp2* y *PgExp3*); todos ellos implicados en el proceso de maduración del fruto. El alineamiento de las proteínas putativas de todas las secuencias en la base de datos (NCBI), mostró una alta homología por arriba del 70%, con otras proteínas ya reportadas. Los análisis de expresión mediante la técnica de RT-PCR y Dot-blot mostraron que estos genes se expresan en el proceso de maduración del fruto. El presente trabajo, es el primer estudio a nivel molecular que integra cinco genes diferentes implicados en la maduración del fruto de guayaba, aportando información esencial para estudios futuros en diferentes líneas de investigación con el objetivo final de manipular el proceso de maduración en el fruto de guayaba, y con ello incrementar y mejorar la vida de anaquel.

Índice de Contenido

Introducción:	1
1. Historia de la Guayaba	1
2. Descripción General	2
3. Producción y comercialización de Guayaba	7
4. Uso Medicinal de <i>Psidium guajava</i>	8
5. Características Bioquímicas	9
6. Eventos en la maduración de los frutos	10
6.1 Papel del etileno en la maduración del fruto	12
6.2 La pared celular en la maduración del fruto	15
6.3 Papel de la enzima Poligalacturonasa en la maduración del fruto	21
6.4 Papel de la enzima endo-1,4- β -glucanasa en la maduración del fruto	22
6.5 Papel de las expansinas en la maduración del fruto	23
6.6 Genes que codifican ACCs, ACCo, PG, EGs y α -Exp implicados en la maduración del fruto	24
7. Importancia de la Bioinformática	25
Justificación del trabajo:	26
Hipótesis de Trabajo:	27
Objetivo General:	27
Objetivos particulares:	27
Metas:	27
Metodología	28
1. Obtención de Material Vegetal	28
2. Diseño de oligonucleótidos	28
3. Extracción de ADN genómico	28
4. Análisis de la presencia de los genes mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN genómico	29
5. Extracción de ARN Total	29
6. RT-PCR	30
7. Recuperación de fragmentos amplificados mediante RT-PCR de geles de agarosa	31
8. Secuenciación y análisis <i>in Silico</i>	31
9. Hibridación mediante <i>Dot blot</i>	33
Resultados:	33

1. Obtención de Material Vegetal	33
2. Búsqueda y diseño de oligonucleótidos	35
3. Extracción de ADN genómico.....	36
4. Análisis de la presencia de los genes mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN genómico.....	36
5. Extracción de ARN Total.....	37
6. RT-PCR.....	38
7. Recuperación de fragmentos amplificados mediante RT-PCR de geles de agarosa	42
8. Secuenciación y análisis <i>in Silico</i>	42
9. Hibridación mediante Dot blot	59
Discusión:	61
Conclusión:.....	70
Perspectivas:.....	70
Anexo 1	71
Anexo 2.....	72
1. Protocolo para PCR	72
2. Protocolo de Concert™ Plan RNA Reagent.....	72
3. Protocolo de TRIzol® Reagent.....	73
4. Protocolo de TRIzol® Reagent with the PureLink™ RNA Mini Kit	73
5. Protocolo para RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas).....	74
6. Protocolo para SuperScript™ First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen™)	74
7. Protocolo para ThermoScript RT-PCR System for First-Strand cDNA synthesis (Invitrogen™)	75
8. Protocolo para SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen™)	75
9. Protocolo para AccessQuick™ RT-PCR System (Promega).....	76
10. Protocolo para Super Script™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq (Invitrogen™)	77
11. Protocolo para extracción de bandas Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas).....	77
12. Protocolo para extracción de bandas Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (ZYMO RESEARCH)	78
13. Protocolo para Hibridar Rapid-hyb buffer (GE-Healthcare Amersham).....	78

14. Protocolo para Marcaje Rediprime II Random Prime Labelling System
Protocol (GE-Healthcare Amersham) 78

Abreviaturas: 79

Glosario:..... 81

Bibliografía:..... 84

Sitios en Internet:..... 95



Índice de Figuras

Figura 1. Diferentes partes de <i>Psidium guajava</i> L.....	3
Figura 2. Área ecológica de <i>Psidium guajava</i> L.....	4
Figura 3. Mosca de la fruta <i>Anastrepha</i> spp., atacando un fruto de guayaba.....	5
Figura 4. Diversidad de genotipos de <i>Psidium guajava</i> L.....	6
Figura 5. Fruto de guayaba var. "Media china"	7
Figura 6. Ciclo de Yang.....	13
Figura 7. Estructura de las microfibrillas.	17
Figura 8. Ubicación del campo experimental "Los Cañones" (CEDEC) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).....	34
Figura 9. Material Vegetal de <i>Psidium guajava</i> , variedad "Media China" selección 126.	34
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de ADN genómico extraído de hoja de guayaba utilizando el protocolo modificado de Murray and Thompson (1980).	36
Figura 11. Visualización en gel de agarosa al 1%, de productos amplificados mediante PCR a partir de ADN genómico utilizando oligonucleótidos correspondientes a ACCs, ACCo, poligalacturonasa, endo-1,4- β -glucanasa y α -expansina; usando el kit 2X Master Mix (Fermentas).	37
Figura 12. Visualización de ARN total aislado de diferentes tejidos vegetales de guayaba.	38
Figura 13. Imagen de fragmentos amplificados por RT-PCR usando oligonucleótidos degenerados para poligalacturonasa y analizados en gel de agarosa al 1%.	40
Figura 14. Imagen de fragmentos amplificados por RT-PCR usando oligonucleótidos degenerados para endo-1,4- β -glucanasa y analizados en gel de agarosa al 1%.	40
Figura 15. Imagen de fragmentos amplificados por RT-PCR usando oligonucleótidos degenerados para expansina y analizados en gel de agarosa al 1%.	41
Figura 16. Imagen de fragmentos amplificados por RT-PCR usando oligonucleótidos degenerados para ACCs y analizados en gel de agarosa al 1%.	41
Figura 17. Imagen de fragmentos amplificados por RT-PCR usando oligonucleótidos degenerados para ACCo y analizados en gel de agarosa al 1%.	42
Figura 18. Secuenciación de <i>PgPG1</i>	43
Figura 19. Búsqueda de secuencias similares a <i>PgPG1</i> en la base de datos del NCBI utilizando el programa BLASTp (Altschul et al., 1997, 2005).....	43
Figura 20. Comparación mediante un alineamiento múltiple de <i>PgPG1</i> y seis secuencias de aminoácidos que codifican para proteínas de PG (GuayabaPG [No. Acceso AAX12520], jitomate <i>TAPG2</i> [No. Acceso AAB09575], Melón <i>MPG1</i> y <i>MPG3</i> [No. Acceso AAC26510 y AAC26512] y pera <i>PC-PG1</i> y <i>PCPG2</i> [No. Acceso BAC22688 y BAC22689]), utilizando el programa de alineamiento múltiple <i>Clustal W2</i> (Larkin et al., 2007)..	45
Figura 21. Dendograma diseñado tomando en cuenta el porcentaje de identidad entre 19 secuencias de aminoácidos correspondientes a poligalacturonasas y la secuencia putativa <i>PgPG1</i> correspondiente a una poligalacturonasa..	46
Figura 22. Secuenciación de <i>PgEG1</i>	47

Figura 23. Búsqueda de secuencias similares a *PgEG1* en la base de datos del NCBI utilizando el programa BLASTp (Altschul et al., 1997, 2005)..... 47

Figura 24. Comparación mediante un alineamiento múltiple de *PgEG1* y seis secuencias de aminoácidos que codifican para proteínas de EG (Pera *PC-EG1* y *PC-EG2* [No. Acceso BAC22690 y BAC22691], jitomate *Tomcel1* y *Tomcel8* [No. Acceso AAA69908 y AAD08699], fresa *faEG1* [No. Acceso CAB43937] y *A. thaliana* [No. Acceso Q9CAC1]), utilizando el programa de alineamiento múltiple *Clustal W2* (Larkin et al., 2007). 49

Figura 25. Dendograma diseñado tomando en cuenta el porcentaje de identidad entre 19 secuencias de aminoácidos correspondientes a endo-1,4-β-glucanasa y la secuencia putativa *PgEG1* correspondiente a una endo-1,4-β-glucanasa..... 50

Figura 26. Secuenciación de *PgACO1*. 50

Figura 27. Búsqueda de secuencias similares a *PgACO1* en la base de datos del NCBI utilizando el programa BLASTp (Altschul et al., 1997, 2005)..... 51

Figura 28. Comparación mediante un alineamiento múltiple de *PgACO1* y seis secuencias de aminoácidos que codifican para proteínas de ACCo (GuayabaACO [No. Acceso AAM74522], jitomate *LE-ACO1*, *LE-ACO3*, *LE-ACO2* [No. Acceso PO5116, CAA68538, P24157], PetuniaACO3 [No. Acceso AAA33697] y TulipanACO3 [No. Acceso BAE20197]), utilizando el programa de alineamiento múltiple *Clustal W2* (Larkin et al., 2007). 52

Figura 29. Dendograma diseñado tomando en cuenta el porcentaje de identidad entre 18 secuencias de aminoácidos correspondientes a la superfamilia Fe(II) y ascorbato, la secuencia putativa *PgACO1* y como control externo una secuencia de aminoácidos correspondiente a una ACC deaminasa..... 53

Figura 30. Secuenciación de *PgEXP1*. 54

Figura 31. Búsqueda de secuencias similares a *PgExp1* en la base de datos del NCBI utilizando el programa BLASTp (Altschul et al., 1997, 2005)..... 54

Figura 32. Secuenciación de *PgEXP2*. 55

Figura 33. Búsqueda de secuencias similares a *PgExp2* en la base de datos del NCBI utilizando el programa BLASTp (Altschul et al., 1997, 2005). 55

Figura 34. Secuenciación de *PgEXP3*. 56

Figura 35. Búsqueda de secuencias similares a *PgExp3* en la base de datos del NCBI utilizando el programa BLASTp (Altschul et al., 1997, 2005)..... 56

Figura 36. Comparación mediante un alineamiento múltiple de *PgEXP1*, *PgEXP2*, *PgEXP3* y cuatro secuencias de aminoácidos que codifican para proteínas de expansinas (GuayabaExp [No. Acceso FJ44120], jitomate *LeExp1* [No. Acceso AAC63088], *Arabidopsis thaliana* [No. Acceso NP180461] y pepino [No. Acceso AAB37746]), utilizando el programa de alineamiento múltiple *Clustal W2* (Larkin et al., 2007). 58

Figura 37. Dendograma diseñado tomando en cuenta el porcentaje de identidad entre 16 secuencias de aminoácidos correspondientes a expansinas, las secuencias putativas *PgEXP1*, *PgEXP2* y *PgEXP3* y como control externo una secuencia de aminoácidos correspondiente a una proteína parecida a expansina..... 59

Figura 38. Expresión de *PgPG1*, *PgEG1*, *PgEXP2*, *PgEXP3*, *PgACO1* y *PgACS1* en hoja, pedúnculo y en fruto de guayaba durante su desarrollo y maduración. 60

Introducción:

1. Historia de la Guayaba

En la actualidad, la guayaba ha logrado un gran reconocimiento a nivel mundial, no solo por su impacto comercial que repercute en muchas naciones, sino también a su legado cultural generado a lo largo de la historia del hombre. Los primeros registros que se tienen sobre el conocimiento de la guayaba nos remiten a la época prehispánica donde se sabe que los aztecas utilizaban como remedio el xalxócotl (de xalli, arena, y xócotl, fruto redondo, pequeño, macizo y astringente) o el árbol del “fruto arenoso”. Dicho árbol adquiría el nombre en Náhuatl en referencia a sus frutos, que contienen abundantes semillas pequeñas y duras. A estos frutos se les conoce hoy con el nombre de guayabas.

El conocimiento de la guayaba a lo largo de su historia, se ha basado principalmente en su aplicación como tratamiento de diversas enfermedades de carácter gastrointestinal entre otras más. En la medicina prehispánica el fruto de la guayaba y otros órganos como las hojas, corteza y raíz principalmente, fueron ampliamente utilizadas en la herbolaria mexicana, donde se combinaban con algunas otras plantas bajo un mágico entorno de rituales.

Con la llegada de los españoles al continente Americano, el uso de la guayaba como tratamiento medicinal principalmente, comenzó a expandirse por todo el mundo. Aunque los españoles escribieron sobre la utilidad de la infusión de hojas de guayabo para aliviar problemas gastrointestinales, los médicos novohispanos no incorporaron este recurso a la medicina oficial de la Colonia. No obstante, durante los siguientes años, en la medicina popular mexicana prevaleció su uso, de tal modo que en el siglo XIX se deposita la función principal de la hoja de guayabo tanto en los libros de medicina doméstica como en las descripciones populares sobre la utilidad de la flora medicinal local y la medicina tradicional.

La referencia más antigua sobre el uso del guayabo se encuentra en la obra de Martín de la Cruz del siglo XVI, donde se menciona como antidisentérica y antitérmica. Así también en el mismo siglo, las obras de Francisco Hernández, Nicolás Monardes y en el Códice Florentino, plasman diversos usos medicinales. Para finales del siguiente siglo, Gregorio López repite la información de Monardes. En el siglo XVIII conocido como “el siglo de las luces”, Juan de Esteyneffer, Ricardo Ossado y Vicente Cervantes persisten con la mención de sus usos curativos. Sin embargo fue hasta 1753, cuando el botánico y taxónomo sueco Carlos Linneo clasifica y asigna un nombre binomial por vez primera al guayabo como *Psidium guajava* L., en su obra *Species Plantarum*. Para finales del siglo XVIII, Sessé y Mociño la reconocen botánicamente y repiten la misma información proporcionada por Ricardo Ossado (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

Con el paso del tiempo, las características medicinales y culturales del guayabo, así como el crecimiento global del comercio de su fruto, permitió que el cultivo de este árbol se extendiera por casi todo el cinturón tropical del mundo. No obstante a la enorme difusión de este recurso y tomando en cuenta el conocimiento de nuestros antepasados acerca de esta especie de árbol, en México, la investigación científica de sus propiedades se inició apenas en la segunda mitad del siglo XX.

En la actualidad el origen del nombre de la guayaba aún es polémico; para algunos estudiosos se atribuye a escritos de navegantes que descubrieron la guayaba

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

en los primeros viajes que Cristóbal Colón realizó por la región de América. Para otros, el origen de la palabra guayaba sería del Náhuatl y provendría de cuáhuatl, árbol, y tlacoyahua, descortezado, resultando cuayahua, en alusión al constante desprendimiento de la capa externa de la corteza que caracteriza al árbol de guayabo.

Así también, en nuestros días, el origen de *Psidium guajava* es incierto, sin embargo algunos autores ubican como posible centro de origen la región comprendida entre el sur de México y Perú (Padilla *et al.*, 2007). Se sabe que su propagación a todos los trópicos del mundo, fue realizada por los españoles y portugueses, donde la participación de los pájaros ha sido fundamental para su naturalización en esas regiones (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

2. Descripción General

La familia Myrtaceae se caracteriza por poseer frutos muy aromáticos y flores con largos y visibles estambres. En esta familia se incluyen especies como el clavo y el eucalipto, así como los géneros Myrtus, Callistemon, Metrosideros, Melaleuca, Psidium, entre otros. Dentro de esta familia, la guayaba es la fruta pomológica más importante (Wilson, 1920).

El género *Psidium* comprende 233 especies, cinco de las cuales se utilizan como frutales comestibles, entre ellas se ubica a *Psidium friedrichsthalianum* Ndz., *P. cattleianum* Sabine, *P. molle* Bertol., *P. guineense* Sw., y *P. guajava* L. A esta última pertenecen los ecotipos de guayaba que se cultivan comercialmente. (Sanabria *et al.*, 2005), (Wilson, 1920).

La clasificación taxonómica para la guayaba (*Psidium guajava*) es la siguiente:

Reino:	Plantae
Subreino:	Traqueobionta (plantas vasculares)
Superdivisión:	Espermatofita (plantas con semilla)
División:	Magnoliofita (plantas con flores)
Clase:	Magnoliopsida (plantas dicotiledóneas)
Subclase:	Rosidae
Orden:	Myrtales
Familia:	Myrtaceae
Género:	<i>Psidium</i>
Especie:	<i>Psidium guajava</i> (USDA. NRCS., 2009)

Psidium guajava es un árbol o arbusto de 3 a 10m de altura con un diámetro de hasta 60cm. Posee una copa irregular con hojas decusadas simples, laminas de 3 a 13.5cm de largo por 1.5 a 6cm de ancho, oblanceoladas, oblongas o elípticas de margen entero, verde brillante a verde pardusco; con abundantes puntos glandulosos transparentes. El tronco es generalmente torcido y muy ramificado cuyas ramas son gruesas, ascendentes y retorcidas. La corteza externa es escamosa en piezas lisas, delgadas e irregulares de tono pardo rojizo, con las escamas grisáceas; la corteza interna es fibrosa, ligeramente amarga, de color crema rosado o pardo rosado, cambiando a pardo oscuro, siendo el grosor total de la corteza de 5 a 8 mm. Posee flores solitarias o en cimas hasta de 8cm, axilares, dulcemente perfumadas, actinomorfas; con sépalos de 4 a 5, verdes en el exterior y blancos en el interior y pétalos de 4 a 5 en color blanco. Los frutos son bayas hasta de 8cm de diámetro, globosas a ovoides, con el cáliz persistente en el ápice, carnosas, de color crema amarillento a rosado, con olor fragante y sabor agrídulce. La cáscara exterior es fina

de color amarillo. El fruto contiene numerosas semillas de forma redonda de 3 a 5 mm, rodeadas de una pulpa amarillenta a rosada de sabor muy agradable (Figura 1). La sexualidad es hermafrodita; su número cromosómico es $2n=22$, sin embargo existen algunos cultivares naturales y artificiales $2n=3x=33$ y aneuploides. Los triploides producen fruto sin semilla (CONAFOR, 2010).

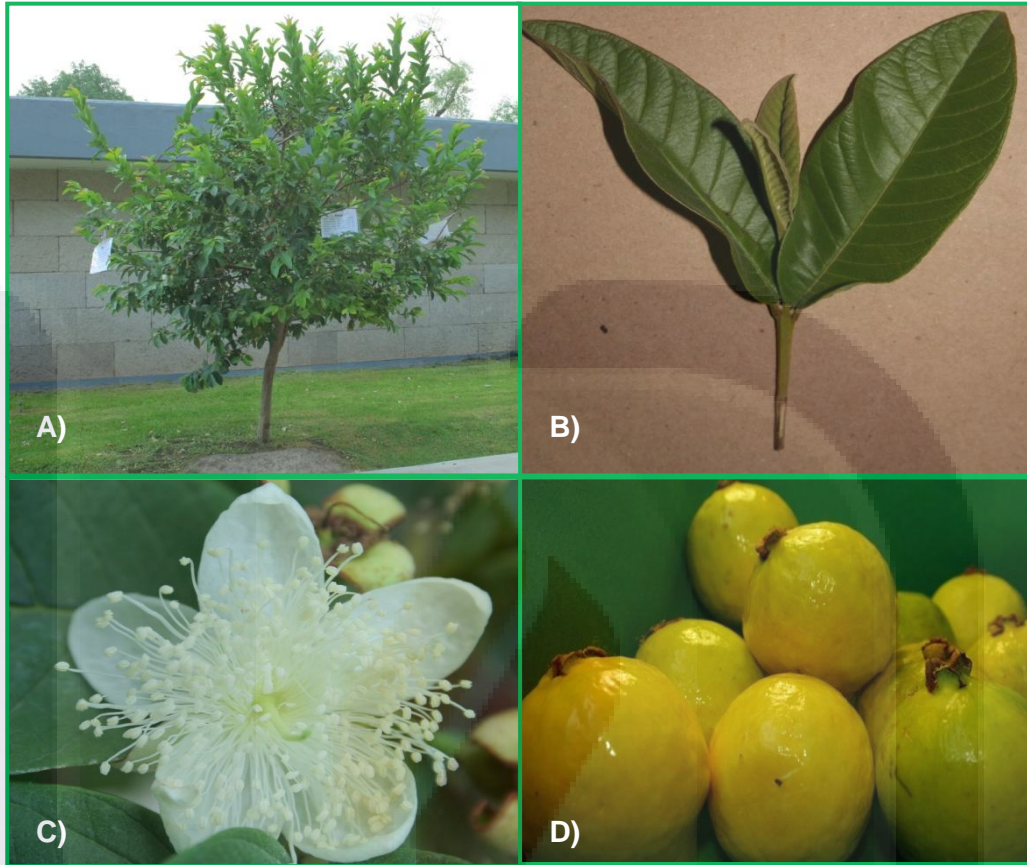


Figura 1. Diferentes partes de *Psidium guajava* L. A) Árbol B) Hoja C) Flor y D) Fruto.

Guayaba es el nombre común de *Psidium guajava* en todas las zonas de habla española de América tropical. Los franceses han adoptado este fruto con el nombre de goyave, los alemanes como guajava, y el portugués como guayaba. El nombre de este último se utiliza en Brasil, donde el nombre indígena (lengua tupí) es Araca Guacu. En el Oriente hay muchos nombres locales, algunos de ellos derivados de la guayaba americana. El nombre más común en Indostaní es amrud, que significa "pera" (Wilson, 1920). En México la sinonimia popular es muy amplia; en Chiapas se conoce como: pata, pocs-cuy, potoj, potos, pox, sumbadam; en Hidalgo y Guerrero: xaxokotl, xolxocatl; en Michoacán: enendi (Purhépecha); Morelos: coloc, jaljocote pichi; en Nayarit: ca-arú ó ca-rú, ushca-arú; Oaxaca: lacow (Huave), tzon t kichi kichi, tzon t kichi nchjon, tzon t kichi (Amuzgo), jukoin papoxtik, pox; Puebla: asiuit, asiwit (Totonaco), xaxokotl, xaxucotl (Náhuatl), aci'huit, xalxocotl, xapeni, xocoyot; Quintana Roo: pichí (Maya), kolok, julú, pachi', sákpichi; Veracruz: asiwit, cuympatan, patán, pitchcuy; Yucatán: piichi; y San Luis Potosí: bek (Tenek).

En su fenología se caracteriza el tipo de follaje perennifolio y caducifolio. La floración se presenta en los meses de marzo a septiembre y el fruto madura de 90 a 150 días después de la floración. La polinización es entomófila por medio de las abejas (CONAFOR, 2010).

P. guajava es originaria de América tropical; se cree que es nativa del sur de México o de Centroamérica, no obstante se han encontrado semillas en excavaciones realizadas en Perú. El centro de dispersión va desde México hasta Brasil (Sanabria *et al.*, 2005), teniendo el área ecológica localizada entre los paralelos 30° de latitud al norte y sur del ecuador, encontrándose ampliamente distribuido en áreas con climas tropicales y subtropicales (Padilla *et al.*, 2007) (Figura 2). Siglos atrás fue propagada por los españoles y portugueses a varios países de todos los trópicos del mundo entre ellos India, Francia, Argelia entre otros más (Wilson, 1920). Se considera que nuestro país es uno de los centros primarios de diversidad de *Psidium guajava*. En México este frutal se cultiva en 20 estados del país y se encuentra en forma silvestre en casi todo el territorio nacional (Padilla *et al.*, 2007).



Figura 2. Área ecológica de *Psidium guajava* L.

El árbol del guayabo se desarrolla muy bien en aquellos lugares en donde se tengan temperaturas entre los 16 a 34°C, humedad relativa entre 36 y 96%, con precipitación anual de 1,000 a 1,800 mm. Esto le permite como fruta tropical producir todo el año (SIAP, 2009a). Se encuentra muy comúnmente a la orilla de los caminos y cerca de casas dónde constituye a veces una verdadera plaga. En México prospera en diferentes condiciones climáticas: habita en climas cálido, semicálido, semiseco, seco y templado. Las principales zonas productoras de guayaba a nivel comercial se ubican entre los 17 y 22° de latitud norte y una altitud que va desde los 300 a los 2200 msnm (Padilla *et al.*, 2007).

La especie tolera diversas condiciones de suelo pero, se produce mejor en suelos bien drenados, con abundante materia orgánica en un pH de 4.5 a 7.5. Sin embargo, es tolerante a suelos ácidos y alcalinos (pH de 4.5 a 9.4). Puede presentarse en suelos arcillosos, salinos, pobres, muy degradados, de baja fertilidad con problemas de drenaje, tanto de origen calizo como metamórfico e ígneo; también toleran inundación temporal, exposición constante al viento y a la sombra. Posee una longevidad de 30 a 40 años. La producción promedio anual por árbol es de 63 kg (CONAFOR, 2010); en términos generales, un árbol en el primer año puede producir 100 frutos, y se va incrementando en forma gradual hasta el quinto año, cuando alcanza los 500 frutos. Así se mantiene constante durante el resto de su vida, con excepción de cuando se realiza la poda de renovación cada tres a cuatro años, donde la producción vuelve a tener el mismo ciclo que al inicio. La fruta se debe cortar cuando se encuentra “sazonada” para que tenga mejor sabor y consistencia, esto se nota cuando cambia el color externo de verde oscuro a verde claro (SIAP, 2009a).

La aplicación de fertilizantes al árbol del guayabo es favorable, por lo que se recomienda su aplicación una vez al mes durante el primer año y en cualquier otro mes en el segundo año, donde se debe aplicar a una tasa de 227g por árbol inicialmente e ir aumentando gradualmente hasta 680g al final del segundo año, el uso

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

de fertilizantes incrementa la calidad de los frutos durante su desarrollo; también se utiliza la poda para adelantar o retrasar la floración y para mejorar el tamaño así como la calidad de fruto. Con el despunte del brote se favorece la aparición de yemas axilares, incrementando la producción de brotes reproductivos. La distancia óptima de plantación es de 10 m, pero se pueden plantar a 5 m para establecer una barrera o cerco vivo (CONAFOR, 2010).

La propagación puede ser por reproducción asexual y sexual. Para el primer caso existen técnicas como acodo aéreo, brotes de raíz, estacas, injerto y cultivo de tejidos. Para esta última técnica, se ha obtenido un sistema de regeneración a partir de segmentos nodales tomados de plántulas germinadas *in vitro* así como de árboles adultos. También se ha logrado organogénesis y embriogénesis somática (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999; Amin and Jaiswal, 1987). Para el segundo caso existe la regeneración natural por semilla, la cual tiene la característica de ser ortodoxa (CONAFOR, 2010).

Esta especie es atacada en la raíz por nemátodos como *Meloidogyne* spp.; y en semilla, fruto y hoja por hongos (CONAFOR, 2010); como en el caso de la enfermedad “clavo del guayabo” cuyo agente causal es *Pestalotia* spp. (Montiel-Montoya y Avelar-Mejía, 2001). Una enfermedad muy seria es la pudrición de raíz causada por el hongo *Clitocybe tabescens*, llegando incluso a matar al árbol. También es atacado por epífitas parásitos. Particularmente bajo condiciones de alta humedad daña la alga roja *Cephaleuros virescens*, responsable del moteado superficial de frutos y hojas, causando a veces la defoliación. El daño por insectos se presenta principalmente en fruto y hoja, a causa de la mosca de la guayaba *Anastrepha striata*, Mosca de la fruta *Anastrepha bistrigata*, *Ceratitis capitata*, Mosca del Caribe *Anastrepha suspensa*, la polilla de la guayaba *Argyresthia eugeniella*, trips, aradores, la mosca blanca de la guayaba *Metaleurodicus cardini* entre otros (Figura 3) (CONAFOR, 2010; Malo and Campbell, 2010; Ramírez *et al.*, 1996).



Figura 3. Mosca de la fruta *Anastrepha* spp., atacando un fruto de guayaba.

Su importancia ecológica radica en que es una especie que se cultiva en huertos y que se encuentra asociada a la selva tropical caducifolia y perennifolia; matorral xerófilo, bosques espinoso, mesófilo de montaña, de encino y mixto de pino. Entre la vegetación asociada se puede mencionar *Erythrina americana*, *Persea americana*, *Liquidambar styraciflua*, *Carpinus tropicalis* (CONAFOR, 2010).

Por otro lado, la guayaba ha sido el foco de la investigación en horticultura extensiva, debido a sus usos en el consumo humano (Somarriba Eduardo, 1988). La diversidad genética es la base para la selección de variedades sobresalientes, promisorias o mejoradas dentro de un contexto frutícola en particular. La guayaba, por ser una especie de polinización cruzada o alógama, principalmente dado el sistema predominante de explotación en que se encuentra en el país, se cruza naturalmente con otras variedades dando origen a genotipos diferentes en apariencia, producción y calidad (Figura 4) (Sanabria *et al.*, 2006).



Figura 4. Diversidad de genotipos de *Psidium guajava* L.

Una de las variedades más importantes en el país, y particularmente en el estado de Aguascalientes debido a su comercialización es la guayaba variedad "Media China" la cual se caracteriza por poseer un fruto de forma globosa a ovoide, generalmente con textura firme, pericarpio grueso y piel delgada (Figura 5). Es de color amarillo-verdoso en su exterior o amarillo claro en plena madurez. La pulpa es de color blanco amarillento, rosado o rojo, con sabor dulce o ácido y aromático (NMX-FF-040-SCFI-2002, 2009). Dentro de esta variedad, existen diferentes selecciones, entre ellas la selección 126, la cual debido a sus características pomológicas, es una de las más cultivadas en el estado, además se encuentra caracterizada dentro del banco de germoplasma de guayaba del campo experimental "Los Cañones" (CEDEC) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Esta selección se caracteriza por producir un fruto en forma ovoide con un diámetro polar de aproximadamente 5.6cm y un diámetro ecuatorial de 5.1cm; presenta un grosor del mesocarpio aproximadamente de 0.7cm. El número de semillas por fruto es en promedio de 178 con un peso aproximado de 2.5g por fruto. Cada semilla pesa un aproximado de 14.1mg. Exhibe una pulpa de color crema y un contenido de Sólidos Solubles Totales (SST) de 14.1°Brix en promedio. El crecimiento del fruto muestra una cinética trimodal o doble zigmoide; que incluye tres fases: la fase I con tasas de crecimiento que van de 0.4 a 0.6 mm d⁻¹; la fase II con una disminución paulatina del

crecimiento del fruto hasta alcanzar valores por debajo de 0.1 mm d⁻¹ durante un periodo de 30 a 40 días, donde también ocurre la formación de semillas; y la fase III donde la tasa de crecimiento se vuelve a incrementar en magnitudes de aproximadamente 0.5 mm d⁻¹ (Padilla-Ramírez *et al.*, 2002).



Figura 5. Fruto de guayaba var. "Media china". A) Fruto de guayaba en estadio de maduración postcosecha "Sazonada". B) Disección del fruto de guayaba, nótese el pericarpio carnoso en su completa madurez y sus tres capas características. Modificado de Marquina *et al.*, (2008).

3. Producción y comercialización de Guayaba

La producción mundial de guayaba suele englobarse junto con la de otros frutales debido a que se le considera un frutal menor, esto se debe a la menor producción y consumo comparado con otros frutos como la manzana, melocotón y pera. Para el año 2009, la producción mundial de Guayaba, Mango y Mangostino fue de alrededor de 35 millones de toneladas y su área de cosecha aproximadamente 4,745,782 millones de Ha, con un rendimiento de 73,824 Hg/Ha (FAO-FAOSTAT, 2010). Actualmente se cultiva en más de 60 países alrededor del mundo, donde tienen mercados bien establecidos, destacando entre los principales países productores de guayaba: India, México, Brasil, Venezuela, Colombia, Cuba, Estados Unidos, Tailandia, Malasia, Filipinas, Indonesia Australia, Nueva Zelanda y Sudafrica (Padilla *et al.*, 2007).

En México la producción de guayaba es de aproximadamente 268 mil toneladas anuales; destacando por su aportación los Estados de Michoacán (48 %), Aguascalientes (27 %), y Zacatecas (16 %), mientras que el Estado de México, Jalisco y Guerrero aportan el 7 % restante. El valor de la producción es del orden de los 1,070 millones de pesos (SIAP, 2009b). El rendimiento promedio a nivel nacional es de 8.0 ton/ha; sin embargo, existe una gran variación entre los estados productores que va desde 1.4 ton/ha en Baja California Sur hasta 15.7 ton/ha en Aguascalientes (Padilla *et al.*, 2007).

Para el estado de Aguascalientes la producción anual de guayaba en el 2007 en la variedad "Media China" fue de 71,010 toneladas, lo cual significa un valor de producción de 241,192.⁵² mil pesos lo que indica que es el segundo cultivo perenne en el estado con mayor valor de producción (SIAP, 2009b).

El cultivo de la guayaba se lleva a cabo por un poco más de 10 mil familias campesinas, en una superficie cercana a las 23 mil hectáreas, los rendimientos unitarios promedio son de 13 toneladas por hectárea y con un precio promedio en el

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

mercado por arriba de los tres mil quinientos pesos por tonelada. El consumo *per cápita* a nivel nacional de guayaba se estima en 3.0 kg/persona (Padilla *et al.*, 2007), siendo los principales centros de mayor consumo de guayaba en fresco, el Distrito Federal, Guadalajara y Monterrey (SIAP, 2009c).

Los requerimientos para la comercialización de guayaba según la norma del CODEX para la guayaba (CODEX STAN 215-1999, EMD. 1-2005, 2009), que aplica a las variedades comerciales de guayabas obtenidas de *Psidium guajava* L., de la familia Myrtaceae, que habrán de suministrarse frescas al consumidor, los frutos deben presentar como requisitos mínimos dentro de las disposiciones relativas a la calidad las siguientes características:

- Deben estar enteras
- Deben estar sanas, y exentas de podredumbre o deterioro que hagan que no sean aptas para el consumo
- Limpias y prácticamente exentas de cualquier materia extraña visible
- Estar prácticamente exentas de plagas que afecten al estado general del producto
- Estar prácticamente exentas de daños causados por plagas
- Estar exentas de humedad externa anormal, salvo la condensación consiguiente a su remoción de una cámara frigorífica
- Estar exentas de cualquier sabor u olor extraño
- Deben ser de consistencia firme
- Estar prácticamente exentas de magulladuras

Para lograr dichos requisitos es indispensable que las guayabas se recolecten cuidadosamente, cuando hayan alcanzado un grado apropiado de desarrollo y madurez, de conformidad con los criterios peculiares de la variedad y la zona en que se producen. Las condiciones de las guayabas les deben permitir, soportar el transporte y la manipulación, y llegar en estado satisfactorio al lugar de destino (CODEX STAN 215-1999, EMD. 1-2005, 2009).

Las guayabas pueden ser clasificadas en tres categorías. La categoría “extra” donde las guayabas deberán ser de calidad superior y características de la variedad. No deberán tener defectos, salvo que sean superficiales y muy leves siempre y cuando no afecten al aspecto general del producto, su calidad, estado de conservación y presentación en el envase. La categoría “I” donde las guayabas deberán ser de buena calidad y características de la variedad y tipo comercial. Podrán permitirse, sin embargo, algunos defectos leves, como la forma, la coloración y defectos leves de la piel que no excedan el 5% de la superficie total; siempre y cuando no afecten al aspecto general del producto; y la categoría “II” donde las guayabas satisfacen los requisitos mínimos de calidad (CODEX STAN 215-1999, EMD. 1-2005, 2009).

4. Uso Medicinal de *Psidium guajava*

La acción farmacológica y el uso medicinal de extractos acuosos de hoja de guayaba en la medicina tradicional incluyen el tratamiento de varios tipos de trastornos gastrointestinales, tales como el vómito, diarrea, inhibición de los reflejos peristálticos, gastroenteritis, actividad espasmolítica, disentería, distensión abdominal y dolor gástrico. Estos extractos han sido también utilizados en trastornos del sistema nervioso central como insomnio, convulsiones y epilepsia, así como en enfermedades respiratorias como bronquitis, ataques de asma, tos y enfermedades pulmonares. También puede ser usado como antiinflamatorio, agente hemostático (Abreu *et al.*, 2006), hipoglucemiante, antitérmico, astringente narcótico, anticoagulante

(Belemtougri *et al.*, 2006), cicatrizante, emenagogo, laxativo (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009). Se han descrito otros usos para el tratamiento de cólico menstrual, sarna, caída de pelo, acné, colitis nerviosa, sordera, cólera, caries, bilis, escarlatina, e hidropesía.

Por otro lado, se describe que los extractos de hoja de guayaba tiene actividad antibacterial, teniendo efectividad contra un gran número de cepas bacterianas, *Aeromonas hydrophila*, *Shigella* spp., *Vibrio* spp. *Staphylococcus aureus* y β -*streptococcus* group A, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*. Así como actividad anti-rotavirus (Abreu *et al.*, 2006).

Se sabe que el consumo del fruto de guayaba reduce el estrés oxidativo, y el riesgo de enfermedades causadas por los radicales libres y la hipercolesterolemia. Mediante el consumo moderado de guayaba en la dieta, pueden ocurrir cambios en los ácidos grasos y en los carbohidratos; además de proveer de fibra dietética, vitaminas antioxidantes, y minerales sin ningún efecto secundario; reduce el colesterol total, los triglicéridos y la presión arterial (Marquina *et al.*, 2008).

5. Características Bioquímicas

Se ha reportado en el extracto de hojas de *Psidium guajava* más de veinte compuestos, entre los cuales están presentes metabolitos secundarios como β -selinelo, β -cariofileno, óxido cariofileno, esqualeno, quercetina, isoquercetina, hiperina, guaijavarina, β -sitosterol, uvaol, ácido oleanoico, entre otros; (Belemtougri *et al.*, 2006). Otros constituyentes identificados en hoja son taninos, ácido maslínico, aceites esenciales, triterpenoides y flavonoides (Abreu *et al.*, 2006).

Particularmente, el fruto contiene una gran cantidad de componentes que se pueden dividir en nutricionales y fisicoquímicos, algunos de ellos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición Nutricional del fruto de Guayaba (*Psidium guajava*) por cada 100 g. de porción comestible.

Calorías	68Kcal
Agua	80g
Proteína	2.55g
Grasa	0.95g
Cenizas	1.39g
Carbohidratos	14.32g
Fibra	5.4g
Calcio	18mg
Hierro	0.26mg
Fósforo	40mg
Magnesio	22mg
Potasio	417mg
Sodio	2mg
Zinc	0.23mg
Cobre	0.230mg
Manganeso	0.150mg
Selenio	0.6 μ g
Vitamina C	228.3mg
Vitamina A	(200–400 IU)
Tiamina	0.046 mg

Riboflavina	(0.03– 0.04 mg)
Niacina	(0.6–1.068 mg)
Vitamina B3	40 IU
Vitamina B5	0.451mg
Vitamina B6	0.110mg
Vitamina G4	35 IU
Vitamina E	0.73mg
Vitamina K	2.6µg
B-Caroteno	374µg
Licopeno	5204µg
Humedad	77–86 gr

Fuente (USDA. National Nutrient Database for Standard Reference, 2010; SAGARPA, 2010).

La guayaba es una de las frutas con mayor contenido vitamínico (16 vitaminas diferentes), y es una de las fuentes más ricas de vitamina C (150 a 400 mg por 100 g de peso fresco), asimismo, algunas variedades poseen altos contenidos de vitamina A (FAO, 2006). Contiene además otras vitaminas B₁ y B₂, así como importantes minerales (Padilla *et al.*, 2007). Posee una capacidad antioxidante, donde el epicarpio es diez veces superior al endocarpio. Esta capacidad aumenta con el contenido de polifenoles totales del epicarpio, endocarpio y mesocarpio. Así también, generalmente los carotenoides están más concentrados en el epicarpio, que en el mesocarpio y endocarpio, incrementándose con el proceso de maduración. (Marquina *et al.*, 2008). En algunas variedades de guayaba, se han identificado hasta 97 constituyentes volátiles en donde los compuestos mayoritarios son el acetato de 3Z-hexenilo, acetato de 3-fenilpropilo, acetato (E)-cinamilo, hexanal, entre otros (Quijano and Pino, 2007). Así también se han identificado en fruto, algunos carotenoides siendo mayoritarios el fitoflueno, β-caroteno y licopeno; este último teniendo su concentración muy similar al jitomate (Ventosa *et al.*, 2008).

6. Eventos en la maduración de los frutos

Los frutos de diferentes especies de plantas son ampliamente diversos, desde capsulas con semillas secas que abren, permitiendo la dispersión de las semillas, hasta frutos frescos relativamente muy complejos donde se han desarrollado colores y aromas complejos, con la finalidad de atraer organismos vivos dispersores de semillas. Los frutos frescos son botánicamente muy diversos, por ejemplo el jitomate, uvas y guayaba son bayas verdaderas derivadas de un ovario, y otros tales como fresa, piña y manzana derivan de tejidos del receptáculo o de la expansión de los sépalos. Los frutos frescos, tienen una amplia variedad de tamaños, formas y colores, además cada especie posee su propio sabor característico (Cornelius and Giovannoni, 2007). Anatómicamente, los frutos son ovarios aumentados que pueden tener asociaciones con otras partes de la flor. Su desarrollo continúa a la fertilización y ocurre simultáneamente con la maduración de las semillas. Inicialmente los frutos crecen debido a la división celular y después por incremento en el volumen celular. Los frutos han adoptado muchas formas que han evolucionado para proteger y dispersar las semillas. (White, 2002). Si bien, los frutos dehiscentes y secos representan la mayoría de las especies de plantas, los estudios del desarrollo del fruto hasta la fecha han sido enfocados a frutos carnosos principalmente, debido a su importancia en la dieta humana (Giovannoni, 2004).

En frutos dehiscentes, la maduración representa el estado terminal en el cual las semillas maduras son liberadas. En contraste en frutos carnosos como el jitomate,

manzana, melón, guayaba, etc.; la maduración es el proceso en el cual la bioquímica, fisiología y estructura del órgano son desarrolladas para influir en la apariencia y en el diseño con la finalidad de atraer a los organismos vivos dispersores de semillas. Aunque los sistemas bioquímicos específicos que resultan en la maduración varían entre las especies, los cambios típicos incluyen la modificación de color a través de alteración de clorofila, carotenoides y acumulación de flavonoides; modificación de la textura por modificación del turgor celular, modificación de la estructura y metabolismo de la pared celular; modificación de azúcares, ácidos y compuestos volátiles que afectan la calidad nutricional, sabor y aroma; y generalmente mejora la susceptibilidad a patógenos oportunistas, asociados a la pérdida de la integridad de la pared celular (Giovannoni, 2004).

Como un proceso complejo, la maduración envuelve una transición mayor en el desarrollo y metabolismo del fruto. Teorías que enfatizaban el deterioro de aspectos en la maduración, han sido reemplazadas por una visión donde representa un proceso muy bien coordinado de diferenciación de órganos que están genéticamente programados. Debido a que esta transición del desarrollo envuelve cambios coordinados en un número de vías metabólicas, la regulación de la maduración ha sido extensivamente estudiada como un modelo en el desarrollo de la planta (Fischer and Bennett, 1991). En concreto, la maduración se caracteriza por un número de procesos genéticos, bioquímicos y fisiológicos que alteran la firmeza, el color, el sabor, el aroma y la textura del fruto (Nishiyama *et al.*, 2007). Desde otro punto de vista fisiológico, la maduración significa que las semillas están listas para su dispersión (Taiz and Zeiger, 2006).

La maduración se acelera en los frutos debido a la acción del etileno, un regulador de crecimiento, el cual al ser expuesto a la fruta, acelera los procesos asociados con la maduración, así como un dramático incremento en su biosíntesis. Basados en estas características, existe una categorización en los frutos con respecto a su interacción con el etileno; se les nombra frutos climatéricos a todos aquellos que maduran en respuesta a una exposición de etileno y que exhiben un característico aumento en la respiración. Durante el proceso climatérico, las frutas muestran un aumento inmediato en la producción de etileno antes del aumento en la respiración. En contraste los frutos no climatéricos no presentan un aumento en la respiración ni en la producción de etileno (Taiz and Zeiger, 2006). Sin embargo estas distinciones no son absolutas, por ejemplo en especies como melón y chile pueden ser tanto climatéricos como no climatéricos; además, algunos frutos que son llamados no climatéricos muestran fenotipos con incremento en la velocidad de maduración en respuesta a etileno exógeno (Cornelius and Giovannoni, 2007).

En frutos climatéricos, la maduración ocurre en plazos relativamente cortos de tiempo. La guayaba es un fruto climatérico que exhibe un típico incremento en la respiración y producción de etileno durante la maduración (Jain *et al.*, 2003). Esto da lugar al reblandecimiento y el deterioro. Se presenta el decremento de la clorofila a y b así como el incremento de los carotenoides. El almidón se disminuye mientras que los azúcares solubles aumentan por el doble (Jain *et al.*, 2001), esto es debido a que el almidón es principal almacén de polisacáridos en muchos frutos inmaduros, y este, es degradado durante la maduración, resultando en cambios en la dulzura y textura del fruto (Jain *et al.*, 2003). También se observa una actividad de diferentes enzimas hidrolasas implicadas en el ablandamiento del fruto, como también el incremento de la biosíntesis de etileno, en los diferentes estadios de maduración. La identificación de los genes implicados en la expresión de dichas enzimas, es un factor fundamental en el control del proceso de la maduración del fruto de guayaba. En este sentido las enzimas implicadas en la síntesis de etileno y enzimas hidrolasas implicadas en el

ablandamiento del fruto, son de especial interés para la investigación del proceso de la maduración del fruto. En estudios de la actividad de dichas enzimas en el fruto de la guayaba han reportado que las poligalacturonasas y endo-1,4- β -glucanasas exhiben un aumento progresivo de la actividad a lo largo de maduración, mientras que la pectinmetilesterasa presenta un aumento de la actividad hasta la etapa de sobremaduración (Jain *et al.*, 2003).

A pesar de la gran diversidad de organismos vegetales, los aspectos de la maduración del fruto a menudo se conservan entre especies. Por ejemplo, el inicio de la maduración es a menudo asociada con los cambios de color, alteración en el metabolismo de azúcar, el ablandamiento y las alteraciones en la textura, la síntesis de aromas volátiles, y un incremento en la susceptibilidad a la infección por patógenos. Estos acontecimientos comunes sugieren que los mecanismos genéticos que regulan la maduración del fruto pueden ser conservados entre los frutos de diferentes especies (Cornelius and Giovannoni, 2007).

6.1 Papel del etileno en la maduración del fruto

El etileno es la más simple olefina que existe en estado gaseoso bajo condiciones fisiológicas normales, regula muchos aspectos del crecimiento de la planta, desarrollo y senescencia; es biológicamente activo en cantidades traza (menos de 0.1 mg/L en la atmósfera para papaya) y sus efectos son comercialmente importantes (Yang and Hoffman, 1984). También se sabe que el etileno está involucrado en otros procesos tales como respuesta al ataque por patógenos, heridas, así como entre otras causas de estrés bióticas y abióticas (Alexander and Grierson, 2002). El proceso de maduración en frutos climatéricos como el jitomate, banana y manzana, son altamente regulados por la hormona vegetal etileno, la cual coordina numerosas vías metabólicas necesarias para la maduración normal (Rose *et al.*, 1997).

Esta hormona promueve la maduración de frutos por aumento en los niveles de enzimas hidrolíticas que ablandan el tejido, producen la hidrólisis de los productos almacenados, incrementan la velocidad de respiración y la pigmentación de los frutos. Se produce en casi todos los órganos de las plantas superiores, aunque la tasa de producción dependerá del tipo de tejido y de su estadio de desarrollo. En general, las regiones meristemáticas y nodales son las más activas en la biosíntesis. Sin embargo, la producción también se incrementa durante la abscisión foliar, senescencia de las flores y maduración de frutos (Soberón *et al.*, 2005).

La síntesis de etileno es altamente regulada, siendo inducida en respuesta a ciertas señales del desarrollo y estrés. Además para controlar el desarrollo estricto sobre la síntesis de etileno, su percepción es regulada por muchos tejidos. Esto por ejemplo, explica que el fruto inmaduro de jitomate, no madure en respuesta a etileno exógeno. Mientras los frutos no perciban el etileno, evidente por la activación de un sub-conjunto de genes inducidos por etileno, estos no inician el desarrollo que conduce a la maduración (Klee, 2002). La biosíntesis de etileno (Figura 6), es a partir de la metionina a través de la S-adenosilmetionina (SAM) y el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). El ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa (ACCs) (E. C. 4.4.1.14), convierte la SAM a ACC y funciona en general como un proceso de control de velocidad en la biosíntesis de etileno. La última etapa de la vía del ciclo del etileno es mediada por el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa (ACC_o) (E. C. 1.14.17.4) el cual requiere O₂, entre otros, como sustrato. El grupo CH₃-S (tiometilo) de la metionina es reciclado a través del ciclo del Etileno

nuevamente hasta Metionina; esta vía cíclica involucra el consumo de energía bajo la forma de ATP y de O₂ (Yang and Hoffman, 1984).

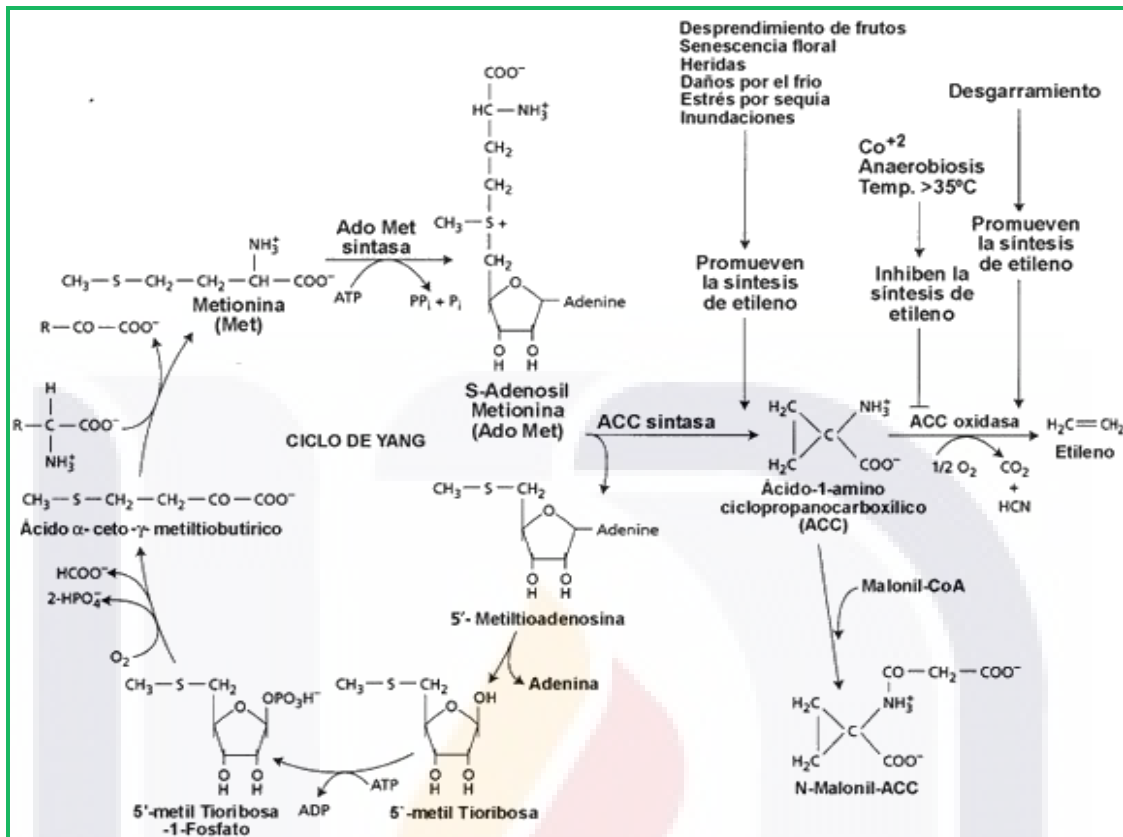


Figura 6. Ciclo de Yang. Biosíntesis de etileno (Soberón, 2005).

Existen dos sistemas definidos de producción de etileno en plantas. Uno funciona durante el crecimiento normal y desarrollo, así como durante las respuestas a estrés. El otro opera durante la senescencia floral y la maduración de frutos. El primer sistema es auto-inhibitorio, ya que el etileno exógeno inhibe su síntesis, y la acción de sus inhibidores pueden estimular su biosíntesis. En contraste, el segundo sistema es estimulado por el etileno y es, por lo tanto auto-catalítico, y la acción de inhibidores de etileno, suprimen su producción. (Cornelius and Giovannoni, 2007).

Teniendo en cuenta que el etileno se sintetiza por vía de la metionina, se sabe que los pasos cruciales en la biosíntesis de etileno son la conversión de SAM a ACC catalizada por la enzima ACCs y la conversión de ACC a etileno catalizada por la ACCo. Por lo tanto, alterar la actividad de esas enzimas, puede cambiar la producción de etileno y en consecuencia el proceso de maduración. En plantas, estas dos enzimas están codificadas por familias multigénicas. En frutos climatéricos, la transición a la producción autocatalítica de etileno parece ser debido a una serie de eventos en los cuales los genes de ACCs y ACCo han sido expresados para su desarrollo. En jitomate por ejemplo, al menos seis genes de ACCs han sido descritos, pero únicamente dos de ellos son expresados durante la maduración del fruto. También múltiples copias de genes de ACCo fueron encontradas en el genoma de la pera Japonesa, melocotón, manzana (Dris and Jain, 2004).

La ACCs pertenece a una familia de enzimas semejante a aminotransferasas PLP-dependientes por lo que requiere de piridoxal 5'-fosfato. La estructura de ACCs en manzana, ha sido determinada y revela que la enzima forma un homodímero. La

mayoría de los residuos conservados entre las isoformas de la familia de las ACCs, se encuentran sobre la superficie de los dímeros y se agrupan cerca del sitio activo de la enzima. El sustrato específico de estas enzimas puede derivarse de distancias relativas entre residuos conservados y el sitio activo. Poseen un gran dominio que se extiende de la región central de la enzima y contiene estrictamente estructuras secundarias conservadas, encontradas entre familias de enzimas PLP-dependientes. También poseen un pequeño dominio el cual muestra gran variabilidad en estructura entre ACCs y aminotransferasas (Wang *et al.*, 2002).

Tanto los genes de ACCs como ACCo han sido utilizados en orientación sentido y antisentido para transformar plantas con el objeto de inhibir la biosíntesis de etileno y así demorar la maduración del fruto. Sin embargo el efecto de la transformación depende en gran medida de factores desconocidos. Se ha visto que la inhibición en la producción de etileno varía significativamente en clones transgénicos (Dris and Jain, 2004). Por ejemplo en estudios con jitomate transgénico donde la producción de etileno fue reducido drásticamente por la inserción de la secuencia de los genes ACCs o ACCo en orientación antisentido junto con un promotor fuerte, mostraron que el fruto no llevó a cabo el proceso de maduración. Esto demuestra que el etileno no actúa simplemente como activador molecular, que se convierte en el proceso de maduración, sino más bien como un motor para el funcionamiento continuo relacionado con la maduración. Si la producción o acción del etileno es detenido por el uso de inhibidores de la síntesis de etileno o inhibidores de la percepción de éste, el proceso de maduración se reduce considerablemente (Srivastava, 2002). Durante la maduración del jitomate, muchos ARNs (<20) son sobre-expresados o sub-expresados. Los genes sobre-expresados incluyen los que codifican para las enzimas para la biosíntesis de etileno, biosíntesis de carotenoides, metabolismo de almidón a azúcar, degradación de pared celular y la acción de antioxidantes. Entre los genes sub-expresados están las proteínas vinculadas con la clorofila y para las subunidades RUBISCO (Srivastava, 2002).

Estudios moleculares del rol del etileno en la maduración del fruto han llevado a la afirmación de que los mecanismos de percepción y respuesta del etileno definidos en el modelo de *Arabidopsis thaliana* son ampliamente conservados en especies de cultivos frutales, aunque a veces con modificaciones en el tamaño y regulación de la familia de genes (Cornelius and Giovannoni, 2007).

Además del etileno, existen evidencias de que otros reguladores de crecimiento, pueden estar involucrados en el control de la maduración del fruto. Se ha visto que la planta madre produce algunas sustancias que retardan la maduración de los frutos aun unidos a la planta como son el aguacate y algunas variedades de pera, que no maduran a menos que sean separados del árbol, mientras que la cosecha de la manzana acelera significativamente su maduración. La identidad de esos compuestos aún no ha sido elucidada, aunque algunas evidencias sugieren que pueden ser auxinas. Se ha sabido por mucho tiempo que estos reguladores de crecimiento inhiben la maduración del fruto. En frutos climatéricos tratados con auxinas exógenas contrarrestan el tratamiento con etileno. Otro regulador de crecimiento que actúan en la maduración del fruto son los jasmonatos. Estos son una clase de oxilipinas que inducen una amplia variedad de respuestas en plantas superiores. Aplicado a la maduración del fruto estimulan la biosíntesis de etileno, cambios en la coloración y producción de compuestos volátiles. En manzana y jitomate el inicio de la maduración es precedido por un incremento de isómeros de ácido jasmonico. Esto sugiere que los jasmonatos junto con el etileno, juegan un papel en la regulación en las etapas tempranas de la maduración en frutos climatéricos. También se han detectado niveles de ácido absísico que comúnmente aumentan durante estadios tardíos del desarrollo

del fruto y en la maduración. En tratamientos exógenos con este regulador de crecimiento promueven el cambio de color en la maduración de cerezas, sin afectar la producción de etileno y en fresa y jitomate acelera la maduración. La aplicación de giberelinas y citocininas retardan la maduración del fruto en algunas especies. Sin embargo no se han encontrado relaciones consistentes entre estos reguladores de crecimiento y la maduración del fruto (Dris and Jain, 2004). Sin embargo debido a esta interacción entre diferentes reguladores de crecimiento y otros señalizadores, hace que el entendimiento del rol del etileno en la maduración del fruto resulte complejo, así también la alteración en los niveles de etileno podría resultar en un inesperado o no reconocida modificación de otras vías de señalización (Alexander and Grierson, 2002). Algunas otras investigaciones donde se ha trabajado con el tratamiento de varios frutos utilizando inhibidores que bloquean la síntesis de etileno o manipulando ese proceso utilizando mutantes, han revelado el rol esencial de esta hormona en la regulación de la maduración del fruto (Cornelius and Giovannoni, 2007).

6.2 La pared celular en la maduración del fruto

El ablandamiento en frutos es uno de los factores más importantes que determinan la calidad y la vida pos-cosecha (Nishiyama *et al.*, 2007). Durante el ablandamiento de frutos ocurren tres principales cambios en la pared celular: solubilización y depolimerización de poliurínidos, depolimerización de hemicelulosa y la pérdida de algunos azúcares neutros, principalmente galactosa y arabinosa. La naturaleza y los cambios de composición de la pared celular, así como las actividades relativas a la hidrólisis de la pared celular, varían fuertemente entre las especies (Dris and Jain, 2004)

La composición de la pared celular juega un papel importante en la determinación de la firmeza del fruto. Los principales componentes son: hemicelulosa, celulosa y pectina, los cuales disminuyen significativamente en peso seco durante el proceso de maduración. Esta disminución es debido al aumento de la actividad de enzimas que hidrolizan la pared celular. Dentro de estas enzimas en guayaba se encuentran: la endo-poligalacturonasa y exo-poligalacturonasa, celulasas y la pectinmetilesterasa. La actividad de la poligalacturonasa se incrementa significativamente en el proceso de maduración obteniendo sus máximos niveles cuando el fruto se encuentra verde. La actividad de la celulasas y la pectinmetilesterasa se incrementan en el proceso de maduración, sin embargo a niveles menores que la poligalacturonasa. La actividad de enzimas que hidrolizan el almidón, las α -amilasas y β -amilasas, se reducen inicialmente en el proceso de maduración, sin embargo se aumentan bruscamente conforme el fruto madura (Jain *et al.*, 2001).

La pared celular es la principal fuente de celulosa, el biopolímero más abundante y útil de la tierra. Esta estructura no solamente fortalece el cuerpo de la planta, sino que también juega roles importantes en el crecimiento de la planta, diferenciación celular, comunicación intercelular, movimiento de agua y defensa. En el crecimiento de la célula, la pared es típicamente una capa delgada y flexible, que consiste principalmente de compuestos polisacáridos y una pequeña cantidad de proteínas estructurales (Cosgrove, 2005). Un gran número de modelos tentativos sobre la pared celular han anhelado integrar análisis químicos y enzimáticos de sus componentes específicos dentro de una estructura unificada. En general la composición polimérica de la pared celular primaria no es tan controversial, está compuesta aproximadamente de 30% celulosa, 30% hemicelulosa, 35% pectina y 5% proteínas en plantas dicotiledóneas, no obstante el contenido de pectina puede substancialmente ser alto y el contenido de proteínas muy bajo en fruto. Todos los modelos de pared celular contienen micro-fibrillas de celulosa embebidas en una matriz de polisacáridos no

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

celulósicos y proteínas. Sin embargo las interacciones específicas y los entrecruzamientos entre polímeros han proveído gran controversia. Así, en la maduración de frutos es ampliamente apreciable que ocurren cambios en la estructura de la pared celular, pero la naturaleza específica de los cambios, sus bases enzimáticas y la contribución de los cambios en las propiedades reológicas de dicha estructura son disputadas (Fisher and Bennett, 1991).

Dos tipos de paredes celulares son diferenciadas dependiendo su estado de desarrollo; la primera de ellas, la cual es sintetizada durante la expansión celular, alcanzando por lo general un grosor de 50-100 nm es denominada pared primaria, la cual está compuesta de numerosos polímeros los cuales varían algo en la estructura entre especies, pero ocho componentes poliméricos (celulosa, matriz de tres de glucanos compuestos por un azúcar neutro, tres pectinas ricas en ácido-D-galacturónico y proteínas estructurales) están usualmente presentes (Brummell and Harpster, 2001).

La celulosa es una molécula conformada de glucanos con uniones β -(1,4) que provee de fuerza mecánica en la pared celular de las plantas. Está se asocia asimismo intermolecularmente por puentes de hidrógeno, para formar largas y cristalinas microfibrillas de cadenas de al menos 36 glucanos. Tiene una fuerte asociación con la hemicelulosa en la pared celular, esto sugiere que el diámetro de las microfibrillas de celulosa pueden ser determinadas, al menos en parte, por la unión de hemicelulosa durante la síntesis de celulosa, lo cual evita el aglomerado de pequeñas microfibrillas a lo largo del atado. Así, estas microfibrillas existen en un complejo con hemicelulosa *in situ*, establecido durante la síntesis y deposición de celulosa (Fisher and Bennett, 1991).

La síntesis de celulosa se atribuye a los genes celulosa sintasa (CESA). Estos fueron identificados a finales de 1990 en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Los genes CESA son normalmente requeridos para realizar una síntesis funcional de complejos de celulosa donde diferentes conjuntos de genes están involucrados en la formación de la pared primaria tal es el caso de los genes CESA1, CESA3 y CESA6; mientras que CESA4, CESA7 y CESA8 son requeridos para la biosíntesis de la pared secundaria. Las proteínas CESA están embebidas en la membrana plasmática a manera de arreglos hexaméricos llamadas partículas roseta. Cada microfibrilla de celulosa es formada de espontánea "agrupación" y cristalización de docenas de cadenas mediante uniones 1,4- β -glucosídicas, cada una hecha a partir de una proteína CESA (Figura 7). Las microfibrillas son mecánicamente fuertes y altamente resistentes al ataque enzimático; poseen de 3-5 nm de ancho y muchos micrómetros de largo, lo suficiente para cerrar la circunferencia de la célula muchas veces (Cosgrove, 2005).

Estudios recientes indican que el esteroles glucósido puede funcionar como un aceptor inicial para la elongación de la cadena de celulosa. Los esteroides son lípidos comunes, componentes de la membrana celular y el esteroles- β -glucósido son los más comúnmente sintetizados en plantas en la membrana plasmática, donde CESA puede usar un esteroles glucósido y una uridina 5'-difosfato-glucosa para formar uniones cortas esteroles-glucano. Esta idea fue soportada por estudios donde defectos en la biosíntesis de esteroles resulta en vacíos en la pared celular y en la reducción de contenido de celulosa (Cosgrove, 2005).

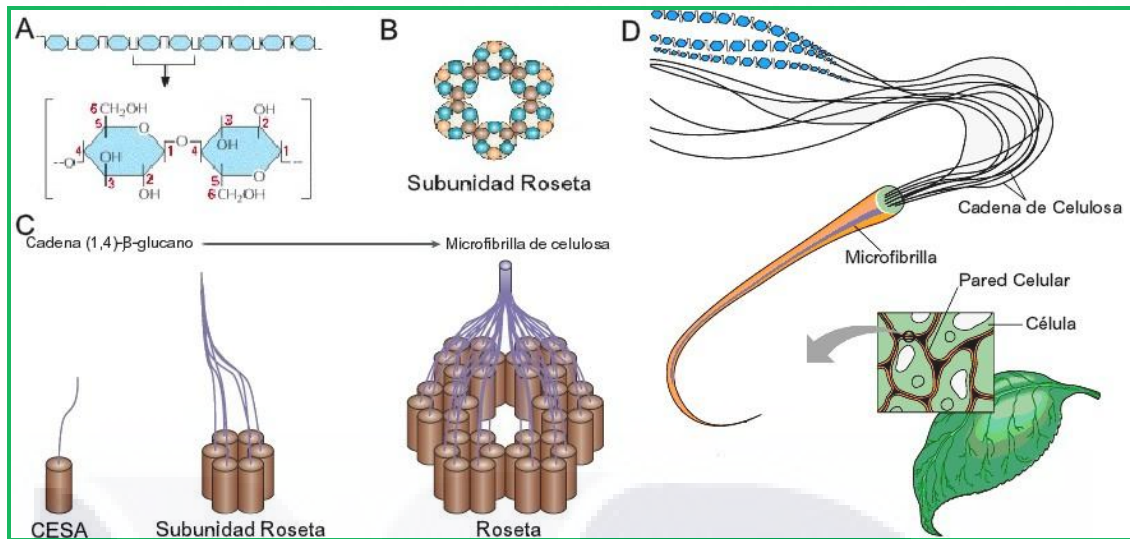


Figura 7. Estructura de las microfibrillas. A) La molécula de celulosa son cadenas de unidades de glucosa con enlaces 1,4-β-glucosídicas. Cada glucosa está invertida con respecto a su vecina y el disacárido resultante ocurre cientos de veces en una sola molécula de celulosa. Modificado de Alberts *et al.*, (2008) B) Modelo de una partícula hexamérica en roseta muestra como tres diferentes proteínas CESA (mostradas en tres diferentes colores: α-naranja, β-café y γ-verde) deben ser organizadas en una subunidad roseta. C) Modelo de cómo el complejo CESA sintetiza una microfibrilla de celulosa. Cada proteína CESA puede sintetizar una sola cadena de enlace (1,4)-β-D-glucano. La celulosa se forma como una cinta cristalina que está compuesta de muchos glucanos. En este modelo se requieren 36 cadenas de β-D-glucanos para formar una partícula roseta, la cual está hexaméricamente compuesta de hexámeros de CESA (Cosgrove, 2005). D) Fibra de celulosa. La pared celular de plantas está compuesta en parte por moléculas de celulosa unidas de un extremo a otro formando microfibrillas de celulosa. La combinación de muchas microfibrillas forman una fibra de celulosa (Nelson and Cox, 2005).

Una endoglucanasa de membrana nombrada KORRIGAN o *Kor* es también requerida para una formación normal de celulosa, pero su función exacta es incierta. Mutantes *Kor* muestran defectos en la citocinesis y en la elongación celular. Aunque estas hacen uniones (1-4)-β-D-glucano no está bien cristalizado en la microfibrilla. Se ha postulado que las *Kor* endoglucanasas cortan residuos de esteroles por el glucano inicial de la cadena. Sin embargo, las mutantes *kor* muestran una normal cantidad de esteroles glucósidos (Cosgrove, 2005).

Aunque se puede anticipar que los cambios en la estructura de la celulosa son asociados con el ablandamiento de la maduración del fruto, esto no parece ser el caso. En observaciones ultraestructurales tienen documentado que en la maduración de aguacate, pera y manzana aparentemente la disociación fibrilar de la pared celular y su disolución podrían ser reproducidos en tejidos de frutos tratados con celulosa fungal *in vitro*. Esto sugiere que esta disolución resulta de una actividad celulolítica, pero análisis químicos de los niveles de glucanos celulóticos indican que los niveles de celulosa permanecen constantes e incluso incrementan escasamente durante la maduración del fruto de pera y jitomate, lo cual no soporta lo anterior. Es posible que las observaciones en los cambios ultraestructurales resulten de la actividad celulolítica que no solubiliza completamente la celulosa de la pared celular. Alternativamente, los cambios ultraestructurales pueden tener resultado de la degradación de un componente de la matriz no-celulolítica que resulte en la pérdida de la organización microfibrilar. Se puede considerar que la extracción química de hemicelulosas de las

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

uniones de la pared celular, resulta en la pérdida de la organización microfibrilar aun cuando la celulosa fue presumiblemente intacta en esa preparación (Fisher and Bennett, 1991).

Los xiloglucanos poseen un esqueleto de (1,4)- β -D-glucanos parecido a celulosa, pero presenta cadenas laterales ramificadas por inserción con α -D-xilosa. La xilosa ocasionalmente se extiende con β -D-galactosil, α -L-fucosa o α -L-arabinosa en alguna especie (Brummell and Harpster, 2001). En general los xiloglucanos se comportan como enroscaduras flexibles y semiflexibles, las cuales forman soluciones viscosas en concentraciones elevadas debido al enredo de polímeros. Por otra parte, es posible una conformación retorcida de la cadena principal de glucanos, junto con la protección de regiones hidrofóbicas de la cadena principal y mediante el plegamiento de los residuos de galactosa, desfavoreciendo la agregación intermolecular (Zhou *et al.*, 2007).

La función principal de los xiloglucanos se basa en la habilidad para formar uniones cruzadas con las microfibrillas de celulosa, formando juntos un gran esqueleto de redes tridimensionales. Se ha demostrado que las cadenas de xiloglucanos de 70 nm de largo, son capaces de formar numerosas microfibrillas de celulosa mediante uniones cruzadas de puentes de hidrógeno. En la naturaleza los xiloglucanos funcionan como almacenamiento de carbohidratos en semillas y como agentes esenciales en el cruzamiento de microfibrillas de celulosa en la pared celular primaria. Los xiloglucanos están presentes en un gran rango de plantas terrestres, esto sugiere que la evolución de los xiloglucanos así como su unión a polisacáridos de celulosa, confieren particular y estructural ventaja en la colonización de hábitats secos. El papel biológico de los xiloglucanos y de las enzimas que sintetizan y modifican a estas, han sido ampliamente descritas (Zhou *et al.*, 2007).

Los glucomananos son básicamente polímeros lineares compuestos básicamente de regiones de (1,4)- β -D-glucano y (1,4)- β -D-manano en cantidades aproximadamente iguales, con ocasionales ramificaciones de una sola unidad terminal α -D-galactosa (Brummell and Harpster, 2001). Son las principales hemicelulosas encontradas en la pared celular de la madera. Al igual que los xiloglucanos, los glucomananos y galactoglucomananos; drásticamente reducen la cristalinidad de las microfibrillas de celulosa en materiales compuestos, y por medio de eso introducen propiedades de flexibilidad y dureza. Estos efectos también pueden ocurrir en la planta, ya que los glucomananos recubren microfibrillas de celulosa en traqueidas únicamente en la noche cuando la presión del agua es alta, pero no durante el día cuando la presión del agua es baja. También se ha demostrado que los glucomananos tienen la habilidad de formar uniones cruzadas con celulosa en materiales compuestos (Schröder *et al.*, 2004).

Los galactomananos en plantas consisten de residuos de uniones (1,4)- β -D-manopiranosil solubles en agua, con cadenas laterales de un solo grupo (1,6)- α -D-galactopiranosil atado a lo largo de la cadena. Las propiedades reológicas de los galactomananos que incluyen engrosamiento y efectos aditivos, han sido empleadas en una gran variedad de aplicaciones industriales y alimenticias. Los verdaderos galactomananos son aquellos mananos que contienen más del 5% por peso de residuos D-galactosa. Son principalmente encontrados en semillas de la familia Leguminosae y son localizadas en la parte del endospermo de la semilla (Moreira and Filho, 2008).

Los glucuronoarabinoxilanos tienen una estructura conformada de (1,4)- β -D-xilano, con cadenas ramificadas de una sola unidad de terminales no reducidos α -L-

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

arabinosa y α -D-ácido glucurónico (Brummell and Harpster, 2001). Se unen a celulosa mediante puentes de hidrogeno teniendo función estructural proporcionando resistencia a las pared de las células del clorénquima (Ceusters *et al.*, 2008).

Las pectinas en plantas superiores forman estructuralmente, la más compleja familia de polisacáridos en la naturaleza. Están presentes en la pared celular primaria de plantas dicotiledóneas y en monocotiledoneas no gramináceas en un 35%, en pastos de 2-10% y por encima del 5% en tejidos leñosos; así también son las más abundantes en la lamela media. Están ausentes o fuertemente reducidas en la no extensible pared celular secundaria, siendo la mayor clase de polisacáridos de planta restringida a la pared celular primaria. Se ha demostrado que intervienen en el crecimiento de las plantas, morfogénesis, organogénesis, desarrollo, adhesión célula con célula, defensa, abscisión foliar, maduración de frutos y dehiscencia, hidratación de las semillas y en la unión a iones (Wolf *et al.*, 2009). Las cargas de los grupos carboxilos (COO^-) de las cadenas de pectina son unidas unas con otras vía Ca^{2+} , el cual forma un estrecho complejo con pectina, formándose de esta manera una gran red con puentes de calcio, permitiendo la capacidad de formar un gel con polímeros altamente hidratados, el cual contribuye con un ambiente de deposición, deslizamiento y extensión para la red de celulosa y hemicelulosa. También funciona como un filtro hidrofóbico que previene la agregación así como el colapso de la red de celulosa. Por otro lado, determina la porosidad de la pared celular a las macromoléculas. Las pectinas son sujetas a modificaciones que pueden alterar su conformación y su unión en la pared celular. Muchos de los residuos de ácido son esterificados durante su biosíntesis en el aparato de Golgi con metil, acetil, y otros grupos no identificados. Tales esterificaciones enmascaran las cargas del grupo carboxil y previenen los puentes de calcio entre pectinas, así reducen la formación de gel característico de las pectinas. Una vez que las pectinas han sido secretadas dentro de la pared celular, los grupos esteres pueden ser removidos por pectin esterases encontradas en la pared, así desenmascaran las cargas del grupo carboxil e incrementan la habilidad de las pectinas a formar geles rígidos. Mediante la presencia de grupos carboxilos libres, la de-esterificación también incrementa la densidad de la carga eléctrica en la pared celular, la cual puede influir la concentración de iones en la pared y la actividad de las enzimas (Taiz and Zeiger, 2006). Las pectinas son parecidas a las hemicelulosas incluyen más de 17 monosacáridos diferentes, los cuales son organizados en polisacáridos que forman parte de la red de pectina de la pared celular (Vincken *et al.*, 2003). Característicamente contienen azúcares ácidos tales como ácido galacturónico y azúcares neutros como ramnosa, galactosa y arabinosa. Las pectinas son los polisacáridos más solubles de la pared celular, son moléculas muy grandes y complejas que se cree están unidas covalente y no covalentemente (Taiz and Zeiger, 2006). Cinco clases de polisacáridos de pectina pueden ser distinguidos: homogalacturonanos (HG), xilogalacturonanos (XGA), apiogalacturonanos (AP), y ramnogalacturonanos I y II (RGI) y (RGII) (Wolf *et al.*, 2009).

Algunos dominios de polisacáridos de pectina, tales como los HG, tienen relativamente una estructura primaria muy simple. Este polisacáridos también llamado ácido poligalacturónico es un homopolímero lineal con unión α -(1,4)-D-ácido galacturónico y se considera que contiene algunos 100-200 residuos de ácido galacturónico (Willats *et al.*, 2001). Los HG son los polisacáridos de pectina más abundantes, constituyen el 65% de la pectina total. Aunque no se sabe mucho respecto a la biosíntesis de los HGs, se asume que son sintetizados en el *cis*-Golgi, metil esterificados en el *medial*-Golgi, substituido en el *trans*-Golgi y excretado en un estado altamente metil esterificado (Wolf *et al.*, 2009), depositado en la pared celular en forma de que tiene 70-80% de residuos de ácido galacturónico metil esterificados en el carbono seis (Willats *et al.*, 2001). Sin embargo, el conocimiento exacto de la

localización sub-celular de las enzimas responsables para la biosíntesis de polisacáridos HG es incierta (Wolf *et al.*, 2009).

Se ha observado que la metil esterificación de pectinas está sujeta a significantes cambios durante el desarrollo, esto es evidente especialmente en fruto, en el cual el grado de metil esterificación disminuye durante la maduración del fruto. Por otro lado, pequeños fragmentos producto del rompimiento de HGs denominados pectinogalacturonidos (OGAs), han sido demostrados que actúan como moléculas de señalización, ya sea como elicitores durante el ataque por patógenos así como una clase de hormona que contrarresta los efectos de las auxinas durante el desarrollo de la planta. Está ampliamente demostrado que los pequeños (OGAs) son producidos debido a la ruptura de HGs debido a la actividad de pectatoliasas y poligalacturonasas. Además esta ruptura depende de distintos patrones de metil esterificación. De esta manera, el estatus de la metil esterificación de los HGs, parece ser no solo un componente fundamental de sus propiedades biofísicas, sino también induce la formación de moléculas de señalización con consecuentes efectos sobre el desarrollo. En este contexto, la actividad enzimática regula el grado de metil esterificación de HGs jugando un papel fundamental en el control del crecimiento de la planta (Wolf *et al.*, 2009).

El ácido galacturónico de los HGs puede ser sustituido en el carbono tres con residuos de xilosa produciendo un dominio conocido como XGA que ha sido aislada de la corteza de semilla en guisantes, pectina de manzana, en fruto de melón y células de zanahoria. La sustitución de ácido galacturónico con apiosa en el carbono dos o tres, resulta en apiogalacturonanos los cuales han sido encontrados en la lenteja de agua *Lemna minor* and *Spirodela polyrrhiza*. Estas modificaciones biosintéticas es probable que modifiquen las propiedades funcionales de los dominios de HGs (Willats *et al.*, 2001).

Otro polisacárido de pectina abundante es el RGI, el cual tiene una larga estructura de al menos 100 repeticiones del disacárido (1,2)- α -L-ramnosa-(1,4)- α -D-ácido galacturónico, algunos de los residuos de ramnosa soportan cadenas laterales neutrales ricas en residuos de β -D-galactosa y α -L-arabinosa (Pooper and Fry, 2008). Esta molécula es muy larga y se cree que es para soportar cadenas laterales de arabinanos y galactanos. RGI es abundante, heterogéneo y ha sido aislado de un amplio rango de plantas. Esta atado glucosídicamente a dominios de HGs, lo cual puede indicar un cambio biosintético de un tipo de galacturonano a otro. En la mayoría de los casos del 20-80% de los residuos de ramnosa en RGI son sustituidos en carbono cuatro con cadenas laterales en las cuales residuos neutrales predominan y estos pueden variar en tamaño desde un solo residuo glicosil hasta 50 o más resultando en una gran y altamente variable familia de polisacáridos. La naturaleza de la amplia ramificación de los RGI los ha llevado a ser conocidos como la región "Hairy" de pectina, en contraste con los dominios de HGs que se conocen como regiones "Smooth" de pectina (Willats *et al.*, 2001).

Los RGII son de bajo peso molecular, se relacionan con el crecimiento de la pared celular y han sido aislados de diferentes tejidos vegetales en dicotiledóneas, monocotiledóneas y gimnospermas; y poseen la misma estructura en todos los tejidos. Es el único polisacárido aislado de fuentes biológicas que contiene boro (O'Neill *et al.*, 1996). Poseen un esqueleto de alrededor de nueve residuos de ácido galacturónico que son unidos (1,4)- α y sustituidos mediante cuatro cadenas laterales de heteropolímeros que contienen 11 diferentes azúcares las cuales incluyen apiosa, ácido acérico y ácido 2-keto-3-deoxy-D-mano-octulosónico (KDO) en un complicado patrón de uniones. Un rasgo significativo de RGII, es que puede dimerizarse por medio

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

de uniones de esteres de borato a través de residuos de apiosa. Los RGII pueden ser aislados de la pared celular mediante la acción de endopoligalacturonasas lo cual indica uniones covalentes con HGs (Willats *et al.*, 2001). Su función aun es desconocida sin embargo, se ha observado que los RGII aislados de raíces de rábano y betabel contienen esteres de borato que proveen soporte, y debido a su localización en la pared celular, sugiere que son requeridos para un crecimiento y desarrollo normal de las plantas. Se cree que forma esteres de diol-borato que mediante enlaces covalentes da lugar a uniones cruzadas entre polisacáridos de pectina de la pared celular dependientes de pH. Por lo tanto se cree que las uniones cruzadas de boro son hidrolizadas mediante el decremento de pH en la pared durante la expansión de la célula inducido por auxinas (O'Neill *et al.*, 1996).

Además de los polisacáridos responsables de la formación del complejo tridimensional en la pared celular, numerosas proteínas son altamente significativas, aunque su contenido no sea mayor al 10%. Poseen funciones principalmente catalíticas, de regulación y estructurales, en el crecimiento celular, maduración de los frutos, abscisión de las hojas y frutos (Taiz and Zeiger, 2006)

Las proteínas estructurales usualmente son clasificadas de acuerdo a su composición predominante de aminoácidos. Muchas de ellas tienen estructuras primarias repetitivas que son altamente glicosiladas. Varían en abundancia dependiendo del tipo celular, maduración y estímulos previos. Las heridas a la planta, el ataque por patógenos y tratamientos con elicitores, incrementan la expresión de genes que codifican para muchas de estas proteínas (Taiz and Zeiger, 2006).

6.3 Papel de la enzima Poligalacturonasa en la maduración del fruto.

Como ya se mencionó, la maduración del fruto envuelve procesos genéticamente programados como la respiración y la producción de etileno (Zhong-Yan *et al.*, 2000). El desmontaje de la pared celular, en el proceso de maduración del fruto, es muy complejo, ya que implica el desmantelamiento de múltiples polisacáridos por diversas redes de familias de proteínas que modifican la pared. El ablandamiento excesivo de la corteza de la fruta se relaciona con enzimas del grupo de las hidrolasas, al cual pertenece la poligalacturonasa (PG), que genera ruptura del enlace 1,4- α -glicosídico del ácido péctico. La actividad de ésta puede ser endo (degradación al azar de la cadena pectídica) o exo (degradación de los extremos libres no reductores de la cadena pectídica). El resultado final de esta actividad es la pérdida de la integridad celular y el incremento de la concentración de polisacáridos solubles (Rodríguez-Castro *et al.*, 2006).

Las PG han sido bien identificadas en jitomate, están presentes en las zonas de abscisión, así como en la maduración del fruto y en los granos de polen de diversas especies de plantas entre ellas el maíz (Fisher and Bennett, 1991). Numerosos frutos, los cuales incluyen al melocotón, pera, pepino y papaya, contienen ambas; endo y exo-poligalacturonasas. En algunos frutos, como la manzana, es más notable la presencia de exo-poligalacturonasa en comparación con la endo-poligalacturonasa. La presencia de endo-poligalacturonasa en el melocotón, es asociada con altos niveles de pectinas solubles en agua. La actividad de la exo-poligalacturonasa presenta bajos niveles en el desarrollo del fruto, pero se incrementa su cantidad de forma significativa, durante la maduración del fruto. Este patrón de expresión, sugiere que la exo-poligalacturonasa puede participar en el ablandamiento del fruto (Fisher and Bennett, 1991).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Durante casi tres décadas se pensaba que la endo-PG (E. C. E.C. 3.2.1.15), era la principal enzima responsable en la ruptura de la pectina y la subsiguiente pérdida de firmeza en el fruto del jitomate (Dris and Jain, 2004). Aunque existe una correlación entre la endo-poligalacturonasa y la firmeza en el fruto (Giovannoni *et al.*, 1989), otros resultados sugieren que el ablandamiento no es regulado únicamente por esta enzima (Dris and Jain, 2004). En otros frutos como el melón, el rol de la enzima poligalacturonasa en la degradación de pectina, durante el ablandamiento del fruto, sigue siendo controversial. Probablemente la enzima PG, podría no estar involucrada en el proceso de solubilización de la pared celular durante las etapas tempranas de la maduración; sin embargo, algunas poligalacturonasas dependientes del desarrollo, pueden contribuir al rompimiento de la pectina en etapas posteriores. Por otro lado se ha sugerido que un grupo de PGs diferentes de la PG del jitomate, podría estar implicado en el rompimiento de la pectina en la maduración del melón (Nuñez-Paleniús *et al.*, 2008). Por lo tanto, la degradación de pectina mediada por la enzima PG, no puede por sí sola explicar los principales cambios en la textura de la fruta que acompañan la maduración (Dris and Jain, 2004). Sin embargo, en el fruto de jitomate se han encontrado pequeñas, pero significativas diferencias en las propiedades mecánicas y características microscópicas, entre frutos control y modificados genéticamente que expresaron el ARN en antisentido dirigido a poligalacturonasa; donde se demostró una reducción en la separación de las paredes celulares en la región del sub-exocarpio perteneciente al pericarpio (Langley *et al.*, 1994).

En un estudio realizado por Abu-Bark *et al.*, (2003), observaron cambios en la actividad de enzimas implicadas en la degradación de la pared celular en el fruto de la guayaba, donde la actividad de las poligalacturonasas al igual que las celulasas, se incrementaron progresivamente durante la maduración, presentando una alta correlación entre el incremento en la actividad de las dos enzimas y la pérdida de firmeza en el fruto. En otros frutos tropicales como el mango, papaya, banana, carambola, se demostró un incremento a través de la maduración, en la actividad de la poligalacturonasa de un (57 %), (294 %), (252 %) y (154 %) respectivamente, donde las exo-poligalacturonasas fueron las que predominaron (Zainon *et al.*, 2004).

6.4 Papel de la enzima endo-1,4-β-glucanasa en la maduración del fruto

Como se mencionó anteriormente, las microfibrillas de celulosa son estructuralmente, los elementos centrales de la pared celular en plantas y su depolimerización se le atribuye a las enzimas endo-1,4-β-glucanasas (E.C. 3.2.1.4). En plantas, generalmente estas enzimas poseen un dominio de unión a celulosa, el cual puede estar involucrado en el desenvolvimiento de la celulosa cristalina en algunos contextos, mientras que la mayoría están involucradas en la depolimerización de glucanos no cristalinos tales como los xiloglucanos. Las EGs han sido asociadas a procesos fisiológicos incluidos la biosíntesis y modificación de la pared celular, elongación y diferenciación celular, abscisión de órganos y maduración del fruto (Libertini *et al.*, 2004). En modelos propuestos de la pared celular (Cosgrove, 2005), se menciona que los xiloglucanos forman amarres entre microfibrillas de celulosa, donde se cree que las endo-1,4-β-glucanasas están involucradas en la hidrólisis de estas uniones, liberando así las microfibrillas, permitiendo el "Wall loosening" y la expansión celular. Alternativamente las endo-1,4-β-glucanasas pueden afectarla estos procesos por el cambio en la viscosidad y/o en la porosidad de la pared celular, promoviendo la actividad de otros factores del "Wall-loosening" tales como expansinas u enzimas implicadas en la modificación de la pared. Durante la maduración del fruto la red de celulosa-xiloglucano es blanco de una gran variedad de enzimas, incluidas las EGs y se ha encontrado como característica común, la depolimerización de hemicelulosa en una gran variedad de especies (Libertini *et al.*, 2004). Sin embargo la regulación con

genes antisentido de la actividad de EG en jitomate resulta en el incremento de la fuerza requerida para separar al fruto de la zona de abscisión, pero no afecta la maduración del fruto (Dris and Jain, 2004).

Aunque la expresión de genes de EGs en plantas ha sido estudiada por años en conexión con el ablandamiento del fruto. Las propiedades bioquímicas de la enzima, sustrato específico y la función potencial para el “Wall loosening” sorprendentemente muestran muy poca atención experimental (Cosgrove, 2005).

6.5 Papel de las expansinas en la maduración del fruto.

Las expansinas son miembros de una familia pequeña de proteínas de aproximadamente 25-27 kDA que catalizan la extensión y relajación de la pared celular y son dependientes de pH, además tienen una efectividad de alrededor de una parte de proteína por 500 partes de pared celular, por peso seco. Las bases moleculares para la acción de las expansinas en las características reológicas de la pared celular son inciertas; pero muchas evidencias indican que las expansinas causan “Wall creep” o la extensión irreversible de estas estructuras, por pérdida de la adhesión no covalente entre los polisacáridos. Estudios vinculados sugieren que las expansinas pueden actuar en la interfase entre celulosa y una o más hemicelulosas (Taiz and Zeiger, 2006).

Cuatro líneas de evidencia respaldan la idea de que las expansinas regulan el alargamiento de la pared en el crecimiento celular. Primero, cuando el crecimiento ácido de paredes celulares se elimina mediante tratamiento de calor o con proteasas, puede ser casi completamente restaurado por la adición de expansinas purificadas, indicando que las expansinas son agentes primarios del “Wall loosening”, y que su acción por sí sola es suficiente para restaurar la extensibilidad de la pared celular. Segundo, la adición de expansinas exógenas en el crecimiento celular estimula su crecimiento, demostrando con esto que estas proteínas estimulan el crecimiento de la célula bajo condiciones de operación normales de la pared celular y que expansinas endógenas son al menos parcialmente limitantes en el crecimiento de la célula. Tercero, la expresión de genes de expansinas estimula el crecimiento de las plantas, mientras que la supresión de estos genes mediante silenciamiento decreta el crecimiento de la planta. Por último, la expresión de genes endógenos de expansinas se correlaciona con el inicio, crecimiento y finalización del crecimiento celular (Cosgrove, 2005). En fruto de jitomate, pera, fresa y durazno, la extensión celular es acompañada por la expresión de una serie de genes de α -expansinas y la acumulación de ARNm de algunas expansinas se correlaciona con el porcentaje de crecimiento (Sharova, 2007).

Por otro lado se ha reportado la expresión de expansinas en la maduración del fruto de jitomate y fresa, cuyo tejido no se encuentra bajo un crecimiento expansivo pero que posee la característica de la depolimerización de la pared celular. Se le puede atribuir a las expansinas relacionadas con la maduración, la contribución a la depolimerización de la pared celular y el ablandamiento del fruto debido al incremento en el acceso de enzimas hidrolasas a polímeros específicos de la pared celular (Civello *et al.*, 1999).

6.6 Genes que codifican ACCs, ACCo, PG, EGs y α -Exp implicados en la maduración del fruto.

Los genes más estudiados implicados en la biosíntesis de etileno son los que codifican para ACCs y ACCo, aunque existe evidencia de que otros genes involucrados en la vía de síntesis de metionina y de salvamento de metionina, se expresan diferencialmente durante la maduración y en respuesta al etileno. Ambos genes forman parte de familias multigénicas en plantas superiores. En jitomate al menos se encuentran nueve genes de ACCs (*LEACS1A*, *LEACS1B* y *LEACS2-8*) y cinco genes de ACCo (*LEACO1-5*). El análisis de expresión de estos genes ha revelado que al menos cuatro genes de ACCs (*LEACS1A*, *LEACS2*, *LEACS4*, *LEACS6*) y tres genes de ACCo (*LEACO1*, *LEACO3*, *LEACO4*) se expresan diferencialmente en el fruto del jitomate. *LEACO1*, *LEACO3*, *LEACO4* se expresan en niveles bajos en el fruto verde que se encuentran en el sistema 1 de producción de etileno. Pero la transcripción de cada uno, se incrementa con el inicio de la maduración así como la transición del fruto al sistema 2. Durante la maduración la expresión de *LEACO1* y *LEACO4* se encuentra sostenida, mientras que la expresión de *LEACO3* se incrementa transitoriamente (Cornelius and Giovannoni, 2007). En otros frutos como jitomate (Van Der Straeten *et al.*, 1990), papaya (Mason and Botella 1997), melón (Miki *et al.* 1995), plátano (Xuejun *et al.* 1999) y tuna (Collazo-Siqués *et al.*, 2003); la expresión de genes de ACCs ha sido investigada. Por otro lado, la expresión de genes de ACCo también ha sido investigada en diversos frutos, en los que se encuentra el jitomate (Holdsworth *et al.*, 1987), manzana (Dong *et al.*, 1992), kiwi (MacDiarmid and Gardner, 1993), melón (Lasserre *et al.*, 1996), plátano (López-Gómez *et al.*, 1997) pera, pepino (Liu *et al.*, 1999), guayaba enana (Agüero *et al.*, 2003), papaya (López-Gómez *et al.*, 2004) y café (Pereira *et al.*, 2005).

Con respecto a los genes implicados en la modificación de la pared celular vegetal, ha sido ampliamente estudiado el papel de la PG en la maduración del fruto en jitomate, donde se demostró que los niveles de expresión de genes de PG tienen una correlación aproximada con el grado de ablandamiento entre los cultivos silvestres y mutantes de jitomate (Hadfield and Bennett, 1998). La expresión de estos genes también ha sido estudiada en otros frutos incluidos, el melocotón (Lee *et al.*, 1990), manzana (Atkinson, 1994), melón (Hadfield *et al.*, 1998), kiwi (Zhong-Yan *et al.*, 2000), pera (Hiwasa *et al.*, 2003) y guayaba (Agüero-Chapin *et al.*, 2006). También se ha investigado la expresión de genes de EG, donde se observó un aumento significativo durante la maduración del fruto de jitomate (Brummell *et al.*, 1997), durazno (Trainotti *et al.*, 1997), fresa (Spolaore *et al.*, 2003) y pera (Hiwasa *et al.*, 2003).

Con respecto a las expansinas, una vez que se determinó el genoma de *Arabidopsis*, se demostró que estas proteínas pertenecen a una gran superfamilia de genes, que se dividen en dos grandes familias; las α -expansinas y las β -expansinas, además de dos pequeñas familias que se desconoce su función. Los dos tipos de expansinas actúan sobre diferentes polímeros de la pared celular y trabajan coordinadamente durante el crecimiento celular, maduración de los frutos y otras situaciones donde ocurre una pérdida de la pared celular (Taiz and Zeiger, 2006).

En diferentes estadios de maduración del fruto de jitomate, se han identificado seis genes que codifican para expansinas, entre ellos; (*Exp 1*), (*Exp 3-7*). Cada uno de ellos muestra diferentes características y patrones de expresión durante el crecimiento y maduración del fruto. Esto indica la presencia de una familia multigénica en este fruto, sin embargo, mientras la expresión de algunos genes de expansinas puede contribuir al desarrollo del fruto, únicamente el ARNm de *Exp 1* está presente en altos niveles durante la maduración (Rose *et al.*, 1997; Brummell *et al.*, 1999). También se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ha reportado el gen *FaExp 2* que codifica para α -expansina en fresa (Civello *et al.*, 1999), el cual presenta altos niveles de expresión durante la maduración. Al menos seis genes que codifican para expansina se expresaron, durante el crecimiento y maduración del fruto de la fresa (Dris and Jain, 2004).

Aunque los recursos de germoplasma exótico a menudo llevan muchos alelos indeseables para la agricultura, los estudios genéticos se emplean cada vez más en la identificación de genes indeseables y deseables agronómicamente (Schauer *et al.*, 2005). En la actualidad la aproximación más exitosa para prevenir la maduración del fruto en el jitomate ha sido inhibir la ACCs con ARN en antisentido (Fernando Nuez, 1995). Intentos por reducir el ablandamiento de los frutos en plantas transgénicas son distintas a las del control de todo el proceso de maduración mediante la supresión de producción de etileno. El prevenir la maduración puede ayudar en la recolección y el transporte, pero cuando el fruto es expuesto a etileno para inducir su maduración, su vida útil es a menudo más corta que en fruto silvestre. Reduciendo solo la tasa de ablandamiento de los frutos permite que los componentes deseables de la maduración (acumulación de pigmentos, azúcares, compuestos volátiles, ácidos orgánicos, etc.) proceden normalmente, pero incrementa su vida útil y decreta el deterioro. Reducir el ablandamiento puede ser también útil en especies no climatéricas donde la supresión de la evolución de etileno no es factible. El entendimiento del control, a nivel molecular de la producción de etileno, así como la participación de enzimas hidrolasas en el ablandamiento del fruto de la guayaba, nos permitirá la apertura de sistemas moleculares para retardar la maduración en el fruto de la guayaba.

7. Importancia de la Bioinformática.

La bioinformática es la columna vertebral de la genómica. La computadora como herramienta ha permitido hacer posible generar el acopio actual de datos, y los ordenadores son la única posibilidad de trabajar con ellos. Con la ayuda de bancos de genes, se pueden buscar secuencias específicas, hacer comparaciones entre las diferentes secuencias, establecer genealogías genéticas a través de una comparación de secuencias homólogas, o combinar los resultados. Existen programas específicos para el análisis de secuencias de ADN, diseño de oligonucleótidos, alineamiento, análisis de secuencias y predicciones, búsqueda de áreas funcionales en el ADN o las proteínas codificadas por ellos. Con otros programas, el investigador puede buscar secuencias que muestren homologías con ella misma (Mülhardt, 2007).

El Internet es especialmente útil para la búsqueda de secuencias. La gran cantidad de secuencias que se publican cada día, rápidamente condujo a la idealización de los bancos de datos de secuencias en la que el investigador puede buscar cualquier secuencia. Los más importantes son el *GenBank* del Centro Nacional de Información en Biotecnología (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y el banco del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL) (<http://www.ebi.ac.uk>), que comparan entre sí los datos de todos los días y puede por lo tanto, ser considerados como equivalentes. Debido a que la búsqueda de secuencias homólogas, sería muy compleja trabajando a mano, estas instituciones ofrecen programas de búsqueda para las bases de datos, principalmente el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990), a la que los investigadores tengan acceso a través de correo electrónico o por Internet. Muchas otras bases de datos con diferentes enfoques ocasionalmente pueden ser de interés para el biólogo molecular, tales como la línea de herencia mendeliana en el hombre (OMIM), que trata de enfermedades genéticas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim>); SWISSPROT, la clásica base de datos de proteínas (<http://www.expasy.ch/sprot>), o GeneCards, un banco de datos de los genes con la información relativa a la función

del código de las proteínas y su papel en las enfermedades (<http://bioinformatics/weizmann.ac.il/cards>) (Mülhardt, 2007).

Las secuencias de ADN complementarias (cDNA) son extremadamente valiosas en dos aspectos. En primer lugar, son la evidencia directa de que un determinado segmento del genoma se expresa y puede, por lo tanto codificar un gen o tener alguna otra función como el caso de los ARN de interferencia, RNA no codificantes o pseudogenes. En segundo lugar, debido a que el cDNA es complementario al ARNm maduro, los intrones del transcrito directo han sido ya eliminados, lo que facilita enormemente la identificación de los exones y los intrones del gen (Griffiths *et al.*, 2008). También pueden ayudar enormemente en la identificación del marco de lectura abierto correcto, incluyendo los codones de inicio y terminación de la traducción. La evidencia de cDNA completos, se usa como prueba de oro de que se ha identificado la secuencia de una unidad de transcripción, incluyendo sus exones y su localización en el genoma (Griffiths *et al.*, 2008).

Además de las secuencias de cDNA completas, hay grandes conjuntos de datos de cDNA en los que solo los extremos 5' y 3', o ambos, han sido secuenciados. Estas lecturas cortas de cDNA reciben el nombre de secuencias de expresión etiquetadas (EST) (Griffiths *et al.*, 2008). Varios bancos y las clonas EST respectivos, son accesibles para los investigadores (por ejemplo, el dbEST banco de datos en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>). De los varios millones de secuencias EST humanos disponibles, es un intento que ya se ha hecho para obtener una visión global de los genes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/index.html>) (Mülhardt, 2007). Algunas levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, nematodos como *Caenorhabditis elegans* y los organismos más grandes, tales como la mosca *Drosophila melanogaster*, el hombre *Homo sapiens*, y el ratón *Mus musculus*, prácticamente han sido totalmente secuenciados (Mülhardt, 2007).

El análisis de la expresión del gen es importante en muchos campos de las investigaciones biológicas, donde los cambios en la fisiología de un organismo o una célula se acompañan por los cambios en el modelo de la expresión génica (Pérez y Cabezas, 2005). Desde que comenzaron los estudios sobre la biología de las plantas, estos se han enfocado en las respuestas fisiológicas y bioquímicas a nivel microscópico, sin embargo, muy poco es conocido sobre los cambios en los niveles de expresión del gen. Con algunos proyectos sobre la determinación de la secuencia del genoma de las plantas se ha abierto paso a un futuro cercano donde múltiples secuencias génicas estarán disponibles (Pérez y Cabezas, 2005).

Controlar la expresión del gen es uno de los mecanismos reguladores primordiales usado por las células vivas para sostener y ejecutar su función. Aunque la actividad final de un gen es determinada por la proteína codificada, la medida de los niveles del ARNm ha demostrado ser una valiosa herramienta molecular (Pérez y Cabezas, 2005).

Justificación del trabajo:

El fruto de la guayaba es muy importante para el estado de Aguascalientes, ya que su producción genera divisas importantes para el desarrollo de una gran cantidad de familias en el estado. No obstante, existen pérdidas aproximadamente del 15% del total de la cosecha a causa de la maduración acelerada del fruto. Dicho proceso involucra varios eventos bioquímicos, fisiológicos y moleculares que son de suma importancia estudiar para el entendimiento de la maduración, sin embargo, para el

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

fruto de guayaba existen escasas investigaciones a nivel molecular. En otros frutos climatéricos se ha demostrado, que genes específicos de la maduración como los que codifican para la biosíntesis de etileno, ACCs y ACCo, así como genes responsables de la degradación de la pared celular, como son las poligalacturonasas, endoglucanasas y expansinas; tienen una participación esencial en la maduración del fruto. Por lo que se considera que el identificar, estudiar y caracterizar la expresión de algunos genes responsables de la maduración en ese fruto ayudará a la mejor comprensión del proceso de la maduración, abriría diferentes líneas de investigación, como podría ser la transformación genética en anti-sentido, supresión y co-supresión; con el objetivo final de manipular el proceso de maduración en el fruto de guayaba, y con ello incrementar y mejorar la vida de anaquel.

Hipótesis de Trabajo:

Existen algunos genes codificantes para la ACCs, ACCo, α -expansinas, endo-1,4- β -glucanasa y poligalacturonasa que intervienen en el proceso de la maduración del fruto de la guayaba (*Psidium guajava*); la identificación, caracterización y estudio de la expresión de estos genes será fundamental para el entendimiento a nivel molecular de la maduración en este fruto.

Objetivo General:

Identificar y analizar la expresión de genes implicados en la maduración del fruto de guayaba (*Psidium guajava*).

Objetivos particulares:

1. Diseñar y buscar en la bibliografía oligonucleótidos específicos o degenerados, dirigidos para los genes que codifican para las proteínas ACCs, ACCo, poligalacturonasa, endo-1,4- β -glucanasa y α -expansina, involucrados en la maduración del fruto de la guayaba.
2. Estudiar la expresión de los genes ACCs, ACCo, poligalacturonasa, endo-1,4- β -glucanasa y α -expansina mediante RT-PCR y *Dot blot*, a partir de ARN total de hoja, pedúnculo y frutos en 5 diferentes estadios de maduración.
3. Secuenciar los genes y realizar su análisis bioinformático *in silico*.

Metas:

1. Obtener oligonucleótidos específicos y degenerados de los genes implicados en la maduración del fruto de la guayaba que codifican para las proteínas ACCs, ACCo, poligalacturonasa, endo-1,4- β -glucanasa y α -expansina.
2. Obtener ARN total a partir de tejido juvenil de hoja, pedúnculo, y de 5 diferentes estadios de maduración del fruto de guayaba.
3. Obtener cDNA de genes que codifican para ACCs, ACCo, poligalacturonasa, endo-1,4- β -glucanasa y α -expansina, a partir de ARN total aislado de tejido de hoja, pedúnculo, y de 5 diferentes estadios de maduración del fruto de guayaba.
4. Extraer los fragmentos amplificados de cDNAs que codifican para ACCs, ACCo, poligalacturonasa, endo-1,4- β -glucanasa y α -expansina, a partir del gel de agarosa.
5. Obtener las secuencias de cDNA expresadas en la maduración del fruto. Identificar las homologías y las posibles relaciones con otras secuencias

contenidas en la base de datos del NCBI y en otros programas bioinformáticos con acceso gratuito a internet.

6. Realizar la hibridación de secuencias de cDNAs que codifican para ACCs, ACCo, poligalacturonasa, endo-1,4- β -glucanasa y α -expansina por medio de la técnica *Dot blot*, utilizando ARN total aislado de tejido de hoja, pedúnculo, y de 5 diferentes estadios de maduración del fruto de guayaba.

Metodología.

1. Obtención de Material Vegetal

Se colectó material vegetal proveniente del banco de germoplasma de guayabo, conservado en el campo experimental “Los Cañones” (CEDEC) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), localizado en el ejido San Pedro, municipio de Huanusco, Zacatecas (21° 45' LN; 102° 58' LO; 1500 msnm). De este germoplasma se trabajó con la selección 126 correspondiente a la variedad “Media china” de *Psidium guajava*, de la cual, a partir de un único árbol etiquetado como (45), se adquirió tejido juvenil de hoja, pedúnculo y de 5 diferentes estadios de desarrollo en el fruto de la guayaba; por lo que se realizaron 5 colectas en el transcurso del periodo Julio-Noviembre del año 2009. Basados en observaciones visuales de su tamaño, firmeza y pigmentación, fueron categorizados 5 diferentes estadios de maduración del fruto: fruto inmaduro 1 (F1) 100% verde, fruto inmaduro 2 (F2) 100% verde, fruto transición (F3 50% verde), fruto maduro (F4 100% amarillo) y fruto sobre-maduro (F5 50% café claro). En cada estadio se tomaron tres diferentes muestras, las cuales fueron maceradas en N₂ líquido y almacenadas a -70 °C para su posterior análisis.

2. Diseño de oligonucleótidos

Se realizó una búsqueda exhaustiva en la literatura, de oligonucleótidos específicos y degenerados dirigidos para los genes que codifican para ACCs, ACCo, poligalacturonasa, endo-1,4- β -glucanasa y α -expansina. Por otra parte, se realizó un diseño de oligonucleótidos específicos y degenerados basados en secuencias conservadas de aminoácidos, utilizando la base de datos del National Center for Biotechnology Information NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), la plataforma bioinformática *Biology Workbench 3.2 San Diego Supercomputer Center SDSC* (workbench.sdsc.edu) y del Laboratorio *European Molecular Biology Laboratory EMBL* (www.ebi.ac.uk), y el Software DNASTAR versión 1989-2001. Todos los oligonucleótidos diseñados se mandaron a sintetizar a Invitrogen™ (ACCESOLAB).

3. Extracción de ADN genómico

Para verificar la presencia de los genes en estudio, se aisló ADN genómico el cual se utilizó como molde para la amplificación de fragmentos de los genes mediante PCR. El método utilizado fue el propuesto por Murray M. G. and Thompson W. F. (1980) con algunas modificaciones en el laboratorio.

Para cada muestra de los diferentes tejidos en estudio, se pulverizó en un mortero, tejido fresco de hoja de guayaba congelado con N₂ líquido. Posteriormente, se tomó una muestra y se pesó 0.1 g colocándolo en un tubo para microcentrifuga. Inmediatamente se agregó 800 μ l de buffer de lisis (Anexo 1) y se colocó a 65 °C durante 15 minutos, pasado ese tiempo, se añadió 100 μ l NaCl 5 M y se dejó en hielo durante 30 minutos. Posteriormente se recuperó el sobrenadante por centrifugación a

12,000 rpm durante 5 minutos y la muestra se le realizó dos extracciones siempre recuperando la fase acuosa; la primera fue con 450 μ l de Fenol-Cloroformo 1:1 a 12,000 rpm durante 5 minutos y la otra con 450 μ l de cloroformo con las mismas condiciones. La precipitación de los ácidos nucleicos fue con un volumen de isopropanol a -20 °C durante 10 minutos. Posteriormente se recuperó la pastilla por centrifugación a 12000 rpm durante 5 minutos. A la pastilla se le realizó un lavado con etanol al 70% con el fin de eliminar el exceso de sal. Por último, se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 40 μ l de agua desionizada estéril. La integridad de la molécula fue verificada mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1% sumergido en TAE 1X corriendo 3 μ l de la muestra y 2.5 μ l de marcador de peso molecular TrackIt™ 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen™) a 90 volts durante 35 minutos. Inmediatamente después, se tiñó el gel durante un minuto en bromuro de etidio y se enjuagó por 5 minutos en agua destilada. Posteriormente fue visualizado bajo luz ultravioleta y fotografiado en el fotodocumentador DyNA Light Dual Intensity UV Transilluminator (Labnet).

4. Análisis de la presencia de los genes mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN genómico.

Tomando como molde el ADN genómico obtenido, se verificó la presencia de los genes mediante PCR. Para este análisis se utilizó el kit comercial 2X PCR Master Mix (Fermentas) siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 2). El PCR se realizó por tres ocasiones en el Termociclador de Gradiente Corbett Research Palm-Cycler. Para poligalacturonasa y endo-1,4- β -glucanasa, se utilizaron los oligonucleótidos degenerados A-B y C-D respectivamente (ver Tabla 2), bajo las siguientes condiciones: 35 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 40 °C durante 2 minutos y 72 °C durante 3 minutos. Para ACCs se utilizaron los oligonucleótidos degenerados E-F y para ACCo los oligonucleótidos degenerados G-H y específicos I-J, bajo las siguientes condiciones: 30 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 55 °C durante 2 minutos y 72 °C durante 3 minutos. Para expansinas, se utilizaron los oligonucleótidos degenerados K-L, bajo las siguientes condiciones: 40 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 50 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 3 minutos.

Todos los productos de PCR fueron verificados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% sumergido en TAE 1X corriendo 5 μ l de muestra y 2.5 μ l de marcador de peso molecular TrackIt™ 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen™) a 90 volts durante 35 minutos. Inmediatamente después, se tiñó el gel durante un minuto en bromuro de etidio y se enjuagó por 5 minutos en agua destilada. Posteriormente fue visualizado bajo luz ultravioleta y fotografiado en el foto documentador DyNA Light Dual Intensity UV Transilluminator (Labnet).

5. Extracción de ARN Total

Con el fin de obtener ARN total en calidad y cantidad suficiente para analizar la expresión en hoja, pedúnculo y diferentes estadios del fruto de guayaba mediante las técnicas de RT-PCR y *Dot blot*, se probaron 4 diferentes protocolos tres de ellos de kit comercial: Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen™), TRIzol® Reagent (Invitrogen™) y PureLink™ MICRO-TO-MIDI SYSTEM using TRIzol® Reagent (Invitrogen™) y el descrito por López-Gómez y Gómez-Lim (1992). Para los kits comerciales se siguieron los protocolos descritos en el Anexo 2, mientras que el de López-Gómez y Gómez-Lim (1992), consistió en pesar 3 g de tejido vegetal previamente pulverizado en N₂ líquido, el cual inmediatamente se homogenizó con tres volúmenes de Buffer de lisis (Anexo 1); se colocó en hielo y se adicionó ¼ de etanol

absoluto (del volumen del buffer de lisis) más un $\frac{1}{9}$ de acetato de potasio 5 M (del buffer de lisis) y se mezcló vigorosamente a temperatura ambiente. Posteriormente se colocó en hielo y se realizaron 3 extracciones, la primera con un volumen de Cloroformo-Alcohol-Isoamílico 49:1, la segunda con un volumen de Fenol-Cloroformo 1:1 y una última con un volumen de Cloroformo-Alcohol-Isoamílico 49:1. En cada extracción se llevo a cabo una centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos y la recuperación de la fase acuosa. Se realizó la precipitación de ARN con cloruro de Litio a una concentración final 3 M dejándose por toda la noche a -20 °C. La pastilla de ARN se recupero, centrifugando a 13,000 rpm durante 30 minutos y se lavó con 1 ml de Etanol al 70%. Por último se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente y se re-suspendió en 40 μ l de agua bi-destilada estéril. También se realizó la extracción de ARN total utilizando protocolos modificados del paquete comercial Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen™) y el descrito por López-Gómez y Gómez-Lim (1992); a los que se les adicionó una precipitación específica para polisacáridos Mehar *et al.*, (2000), la cual consistió en agregar un volumen de 1/30 de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y un volumen de 0.1 de etanol absoluto al 100%, sometiendo la mezcla a -20 °C durante 30 minutos, subsecuentemente se centrifugó durante 10 minutos a 12000 rpm y se recuperó la fase acuosa. Posteriormente se adicionó a la fase recuperada, acetato de amonio 3 M a una concentración final de 0.3 M junto con 3 volúmenes de etanol absoluto al 100% y se precipitó durante toda una noche a -70 °C. Finalmente se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos y la pastilla resultante se lavó con un volumen igual de etanol al 70%, re-suspendiendo en 30 μ l de agua bi-destilada.

Para todos los métodos de extracción de ARN total mencionados anteriormente a excepción del PureLink™ MICRO-TO-MIDI SYSTEM using TRIzol® Reagent (Invitrogen™), el producto fue verificado con una electroforesis en gel de agarosa al 1% sumergido en TAE 1X corriendo 3 a 5 μ l de muestra a 90 volts durante 35 minutos. Inmediatamente después, se tiñó el gel durante un minuto en bromuro de etidio y se enjuagó por 5 minutos en agua destilada. Posteriormente fue visualizado y fotografiado bajo luz UV. Para el caso del método PureLink™ MICRO-TO-MIDI SYSTEM using TRIzol® Reagent (Invitrogen™) el ARN total fue verificado con una electroforesis en gel de agarosa al 1% preparado con 0.05 μ l de bromuro de etidio, sumergido en TAE 1X corriendo 5 μ l de muestra a 100 volts durante 30 minutos. Inmediatamente después se visualizó y fotografió bajo luz UV.

6. RT-PCR

Con la finalidad de identificar fragmentos de cDNA y analizar la expresión en hoja, pedúnculo y diferentes estadios del fruto de guayaba, se realizó la técnica de RT-PCR en la cual, a partir del ARN total se probaron 4 diferentes kits de RT-PCR en dos pasos siguiendo las instrucciones de cada kit comercial (Anexo 2): RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas), SuperScript™ First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen™), ThermoScript™ RT-PCR System for First-Strand cDNA synthesis (Invitrogen™) SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen™). Para la PCR a partir de cDNA, se utilizó el kit 2X PCR Master Mix (Fermentas). Así también se probaron 2 Kits de un solo paso, el AccessQuick™ RT-PCR System (Promega) y Super Script™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq (Invitrogen™) cuya metodología fue desarrollada siguiendo las instrucciones de cada kit comercial. El RT-PCR se realizó por tres ocasiones en el Termociclador de Gradiente Corbett Research Palm-Cycler. Para poligalacturonasa y endo-1,4- β -gluconasa, se utilizaron los oligonucleótidos degenerados A-B y C-D respectivamente, bajo las siguientes condiciones: 35 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 40 °C durante 2 minutos y 72 °C durante 3 minutos. Para ACCs se utilizaron los oligonucleótidos degenerados E-F y para ACCo los oligonucleótidos degenerados G-H y específicos I-

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

J, bajo las siguientes condiciones: 30 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 55 °C durante 2 minutos y 72° C durante 3 minutos. Para expansinas, se utilizaron los oligonucleótidos degenerados K-L, bajo las siguientes condiciones: 40 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 50 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 3 minutos.

En todos los métodos utilizados para la RT-PCR, los resultados fueron verificados con una electroforesis en gel de agarosa al 1% sumergido en TAE 1X corriendo 5 µl de la muestra y 2.5 µl de marcador de peso molecular TrackIt™ 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen™) a 90 volts durante 35 minutos. Inmediatamente después, se tiñó el gel durante un minuto en bromuro de etidio y se enjuagó por 5 minutos en agua destilada. Posteriormente fue visualizado bajo luz ultravioleta y fotografiado en el fotodocumentador DyNA Light Dual Intensity UV Transilluminator (Labnet).

7. Recuperación de fragmentos amplificados mediante RT-PCR de geles de agarosa

Una vez identificados los fragmentos de interés amplificados mediante RT-PCR, estos fueron recuperados a partir del gel de agarosa al 1%, para su posterior secuenciación. Para esto se utilizó dos sistemas de extracción, uno con el Kit comercial Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas) y otro mediante columnas Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante (Ver Anexo 2). En ambos sistemas, la recuperación del fragmento se verificó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% sumergido en TAE 1X corriendo 3 µl de la muestra y 3.5 µl de marcador de peso molecular TrackIt™ 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen™) a 90 volts durante 35 minutos. Inmediatamente después, se tiñó el gel durante un minuto en bromuro de etidio y se enjuagó por 5 minutos en agua destilada. Posteriormente fue visualizado bajo luz ultravioleta y fotografiado en el fotodocumentador DyNA Light Dual Intensity UV Transilluminator (Labnet).

8. Secuenciación y análisis *in Silico*

Los fragmentos de cDNAs recuperados, se mandaron secuenciar al *Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad* (LANGEBIO) Cinvestav unidad Irapuato. A cada fragmento se le fue asignado un nombre. Posteriormente cada secuencia fue sometida a un análisis *in silico* utilizando la plataforma bioinformática y la base de datos *National Center for Biotechnology Information* NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), el *European Molecular Biology Laboratory* EMBL (www.ebi.ac.uk) y el *Swiss Institute of Bioinformatics* SIB (www.isb-sib.ch/index.php); con la finalidad de caracterizarlas bioinformáticamente.

Todas las secuencias se tradujeron de nucleótidos a aminoácidos utilizando la herramienta "*Translate tool*" disponible en el servidor *Expert Protein Analysis system* (ExpPASy) del SIB, con la finalidad de comparar nuestras secuencias de aminoácidos con otras disponibles en la base de datos del NCBI y de esta manera inferir su posible función. Dicha comparación fue realizada utilizando la herramienta bioinformática *Basic Local Alignment Search Tool* (blastp) (Zhang *et al.*, 2000; Altschul *et al.*, 1997, 2005), disponible en la plataforma bioinformática del NCBI. A todas las secuencias de aminoácidos que mostraron alguna similitud con otras secuencias de la base de datos, se les asignó un nombre tomando en cuenta las iniciales del género y especie de la guayaba, seguido de la forma abreviada correspondiente a la familia de genes con los que presento similitud y por último una numeración basada en el orden que fueron secuenciadas.

Posteriormente cada secuencia putativa de aminoácidos fue sometida a un alineamiento múltiple con seis secuencias homologas utilizando el programa de alineamiento múltiple *Clustal W2* (Larkin *et al.*, 2007), disponible en la plataforma bioinformática *EMBL-EBI*, con la finalidad de caracterizarlas bioinformáticamente. Las secuencias utilizadas en el alineamiento múltiple de *PgPG1*, corresponden a guayaba (Agüero-Chapin *et al.*, 2006) "AAX12520", de fruto de Melón (Hadfield *et al.*, 1998) "AAC26510 y AAC26512" y pera (Hiwasa *et al.*, 2003) "BAC22688 y BAC22689", así como una PG de abscisión floral y foliar en jitomate *TAPG2* (Kalaitzis *et al.*, 1997) "AAB09575"; Para *PgACO1* se utilizaron las secuencias correspondientes a ACCo de fruto de guayaba "AAM74522", de fruto y órganos florales de jitomate (Köck *et al.*, 1991; Holdsworth *et al.*, 1987) "PO5116, CAA68538 y P24157", de órganos florales de petunia (Tang *et al.*, 1993) "AAA33697" y de marchitamiento de hojas de tulipán (Momonoi *et al.*, 2007) "BAE20197"; Para *PgEG1* fueron las correspondientes a EG de fruto de fresa "CAB43937", de fruto y zonas de abscisión de jitomate (Lashbrook *et al.*, 1994) "AAA69908" y "AAD08699", de fruto de pera (Hiwasa *et al.*, 2003) "BAC22690 y BAC22691" y de elongación del tallo floral de *A. thaliana* "Q9CAC1"; y para *PgEXP1*, *PgEXP2* y *PgEXP3* se usaron las secuencias correspondientes a α -expansinas de fruto de guayaba "FJ44120", jitomate (Rose *et al.*, 1997) "AAC63088", de zona de crecimiento de hipocotilos en pepino (Shcherban *et al.*, 1995) "AAB37746", y de *A. thaliana* "NP180461".

Posteriormente *PgPG1* fue alineada con 19 secuencias de aminoácidos homologas a poligalacturonasas utilizando el programa de alineamiento múltiple *Clustal W2* (Larkin *et al.*, 2007). Las secuencias utilizadas con sus respectivos números de acceso a la base de datos del NCBI fueron: poligalacturonasas de fruto en kiwi (Atkinson and Gardner, 1993) "AAC14453", aguacate (Kutsunai *et al.*, 1993) "AAA32914", manzana (Atkinson, 1994) "AAA74452", melón (Hadfield *et al.*, 1998) "AAC26510, AAC26511, AAC26512", pera (Hiwasa *et al.*, 2003) "BAC22689", "BAC22688" y durazno "CCA54448"; poligalacturonasas de zona de abscisión en jitomate (Kalaitzis *et al.*, 1995, 1997) "AAB09575, AAB09576, AAA80489"; en zona de dehiscencia en jitomate (Gorguet *et al.*, 2009) "ABW38780" y soya "AAL30418"; poligalacturonasas de polen en canola (Robert *et al.*, 1993) "AAA70402", tabaco (Tebbutt *et al.*, 1994) "Q05967", algodón (John and Petersen, 1994) "AAA82167" y alfalfa "AAA62286"; y poligalacturonasa del hongo *Aspergillus flavus* (Whitehead *et al.*, 1995) "AAA85280". De igual manera, para *PgEG1* fueron utilizadas 19 secuencias de aminoácidos homologas de endo-1,4- β -glucanasa, las cuales fueron: de fruto de fresa "CAB43937 y AAT40310" (Spolaore *et al.*, 2003) "CAC94006"; implicada en la síntesis de celulosa en jitomate (Brummell *et al.*, 1997a), así como en fruto y zonas de abscisión (Lashbrook *et al.*, 1994) "AAC49704, AAA69908" y "AAD08699", de fruto de pera (Hiwasa *et al.*, 2003) "BAC22690 y BAC22691", de elongación del tallo floral y en la biosíntesis de celulosa en *A. thaliana* "Q9CAC1, BAH57006, Q9STW8, AtHG9B5 y AtHG9B7", de zona de abscisión de hoja y fruto en durazno (Trainotti *et al.*, 1997) "CAA65600", aguacate (Tucker *et al.*, 1987) "AAA32912", de fruto de D. longan (Chen *et al.*, 2009) "ACT54548", de fruto de manzana "AAQ55294"; de tabaco (Wang *et al.*, 2007) "AAZ93631"; y de *Dyctiostelium discoideum* "P22699". Para *PgACO1* fueron utilizadas las siguientes 19 secuencias homologas a ACO: de fruto en guayaba "AAM74522", de fruto (Köck *et al.*, 1991), y órganos florales de jitomate (Holdsworth *et al.*, 1987) "PO5116, CAA68538 y P24157", de órganos florales de petunia (Tang *et al.*, 1993) "AAA33697" y de marchitamiento de hojas de tulipán (Momonoi *et al.*, 2007) "BAE20197", de flores y hojas de petunia (Tang *et al.*, 1993) "AAC37381, AAA33698", de fruto de papaya "CAH65725, AAL78058"; de pétalo, hoja y tallo de tulipán (Momonoi *et al.*, 2007) "BAE20196, BAE20195, BAE20198 y BAD10865"; de proteína E8 de tomate "CAA31789"; de enzima flavonona-3-hidroxilasa de petunia y cebada (Britsch *et al.*, 1992) "Q07353, P28038"; de enzima A2 de maíz "CAA39022"; y de 1-

aminociclopropano-1-carboxilato deaminasa de *Pseudomona fluorescens* "Q51813". En el caso de *PgEXP1*, *PgEXP2* y *PgEXP3* fueron alineadas junto con otras 17 secuencias homologas de expansinas: α -expansina de fruto de guayaba "FJ44120", de jitomate (Rose *et al.*, 1997) "AAC63088", de fresa (Civello *et al.*, 1999) de zona de crecimiento de hipocotilos en pepino (Shcherban *et al.*, 1995) "AAB37746 y AAB37749", una correspondiente a *Arabidopsis thaliana* "NP180461" y de arroz "Q40637"; β -expansinas de polen de maíz (Wu *et al.*, 2001) "AAK56124", de *A. thaliana* "Q9SHY6 y Q9M012" y arroz "Q7XT40 y Q0DZ85"; parecidas a β -expansinas de *A. thaliana* "O23547" y arroz "Q850K7"; parecidas a α -expansinas de *A. thaliana* "Q9LZT4" y arroz "Q7XLCL0"; y una proteína parecida a expansina de *Dictyostelium discoideum* "XP_647352".

A partir de cada alineamiento múltiple, fue diseñado un dendograma usando el método de UPGMA basado en el porcentaje de identidad de las secuencias y se indicó en cada rama del dendograma la distancia media., con la finalidad de observar las relaciones entre la familia de genes correspondiente a cada una de nuestras secuencias. Este análisis fue realizado utilizando el programa de alineamiento múltiple *Clustal W2* (Larkin *et al.*, 2007). Posteriormente se identificaron los distintos grupos de dendograma en base a estudios filogenéticos realizados para la superfamilia de expansinas (Sampedro and Cosgrove, 2005); para endo-1,4- β -glucanasas (Libertini *et al.*, 2004); para poligalacturonasas (Hadfield *et al.*, 1998); y para la superfamilia Fe(II) y ascorbato (Tang *et al.*, 1993).

9. Hibridación mediante *Dot blot*

Para verificar la expresión de los genes implicados en la maduración del fruto de la guayaba y otros órganos, se utilizó el método propuesto por Sambrook and Russell (2001), el cual consistió en transferir ARN total de hoja, pedúnculo y 5 diferentes estadios de desarrollo del fruto a una concentración de 3 mg en un volumen de 10 ml de agua estéril. Por otro lado, se humedeció un pedazo de membrana HybondTM-N+ (Amersham) con agua estéril y posteriormente se colocó en agitación continua durante 1 hr con 20x SSC (Anexo 1) a temperatura ambiente. Se mezcló cada muestra con 30 μ l de solución desnaturante de ARN (Anexo 1) y se incubaron durante 5 minutos a 65 °C. Posteriormente se colocaron en hielo y se agregó un volumen igual de 20x SSC a cada muestra y se cargaron en la membrana HybondTM-N+ (Amersham) aplicando vacío. Se inmovilizó el ARN a la membrana mediante irradiación UV utilizando el Ultraviolet Crosslinkers (UVP).

Las condiciones de pre-hibridación e hibridación fueron realizadas conforme a las indicaciones del kit comercial Amersham Rapid-hybTM Buffer (GE Healthcare) (Anexo 2). Como sonda se usaron los cDNAs *PgPG1*, *PgEG1*, *PgACO1*, *PgACS1*, *PgEXP2* y *PgEXP3*; los cuales fueron marcados radiactivamente con P³² utilizando el kit comercial RediprimeTM II Random Prime Labelling System (GE Healthcare) (Anexo 2). Después de la hibridación, las membranas fueron lavadas durante 20 minutos con 2X SSC, SDS 0.1% (W/V) a temperatura ambiente y 2 lavados a 65 °C durante 15 minutos con 0.1X SSC, SDS 0.1% (W/V). Posteriormente la membrana se expuso a una película de rayos-X (Kodak) durante 3 y 12 horas a una temperatura de -70 °C.

Resultados:

1. Obtención de Material Vegetal

Para la toma de muestras, se acudió al banco de germoplasma de guayabo conservado en el campo experimental “Los Cañones” (CEDEC) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) (Figura 8). Se recolectaron muestras frescas de hoja, pedúnculo y de 5 diferentes estadios de maduración del fruto de *Psidium guajava*, de la variedad “Media China” selección 126 (Figura 9).



Figura 8. Ubicación del campo experimental “Los Cañones” (CEDEC) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).



Figura 9. Material Vegetal de *Psidium guajava*, variedad “Media China” selección 126. 1) Hoja; 2) Pedúnculo; 3) Fruto inmaduro 1; 4) Fruto inmaduro 2; 5) Fruto transición; 6) Fruto Maduro; y 7) Fruto Sobre-Maduro.

2. Búsqueda y diseño de oligonucleótidos

A partir de una búsqueda exhaustiva en la literatura y de un alineamiento múltiple de varias secuencias de aminoácidos, se diseñaron y eligieron los oligonucleótidos que se enlistan en la Tabla 2. Para el caso de los oligonucleótidos A-B y C-D correspondientes a poligalacturonasa y Endo-1,4- β -glucanasa respectivamente, fueron tomados del trabajo realizado por Hiwasa *et al.*, (2003). Los oligonucleótidos E-F y G-H, fueron tomados a partir del trabajo de Nakatsuka *et al.*, (1998) los cuales son dirigidos para la amplificación de secuencias de genes correspondientes a ACCs y ACCo respectivamente. En el caso de los oligonucleótidos específicos I y J dirigidos para la amplificación de ACCo fueron diseñados a partir de la secuencia de nucleótidos registrada en la base de datos (Número de acceso AF379855) del trabajo de López-Gómez *et al.*, (2004). Para el caso de los oligonucleótidos K-L, fueron diseñados utilizando herramientas bioinformáticas basados en los sitios conservados de aminoácidos, *DPBB-1 Rare Lipoprotein A (RlpA)* y *Pollen allergen 1*, características de las α -expansinas, utilizando 11 secuencias correspondientes a α -expansinas tomadas de la base de datos del NCBI cuyos números de acceso son los siguientes: FJ449891, AB218787, FJ619348, AB029083, FJ042664, AF159563, AB099927, AF350936, AF038815, EU340362, AB093028.

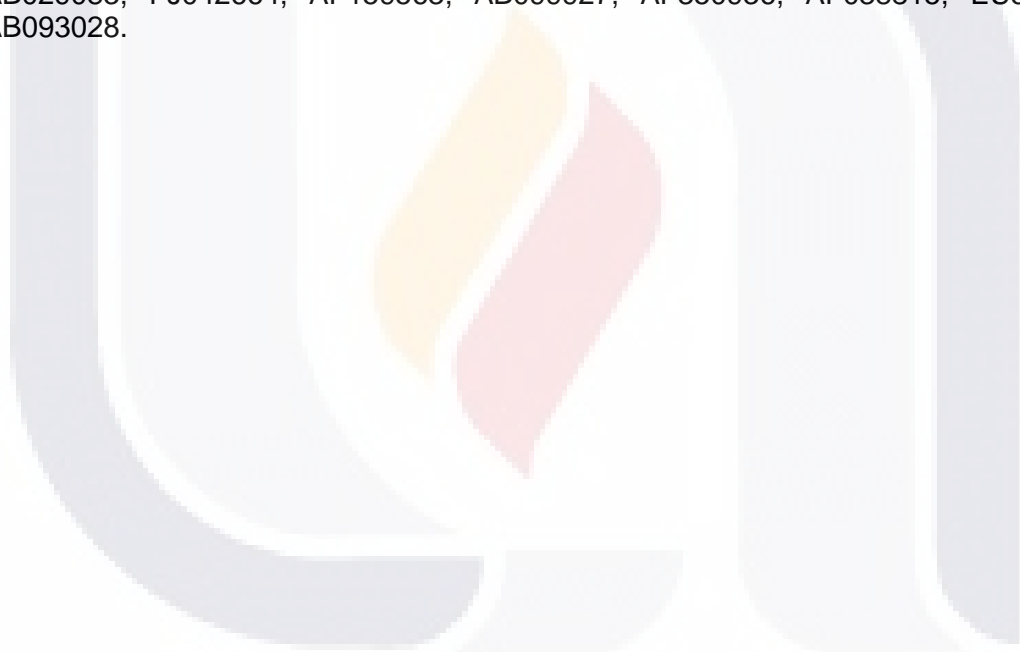


Tabla 2. Oligonucleótidos usados para la amplificación de secuencias mediante PCR y RT-PCR.

Nombre	Secuencia DNA	Tipo de secuencia	Fuente	
A	PGFdeg	AGYCCIAAYACIGAYGGIRTICA	Degenerado	Hiwasa <i>et al.</i> , (2003)
B	PGRdeg	CARTARTDYTGRTCDATIAYDATIGG	Degenerado	Hiwasa <i>et al.</i> , (2003)
C	EGFdeg	TGYTGGGARMGICIGARGA	Degenerado	Hiwasa <i>et al.</i> , (2003)
D	EGRdeg	ICCIARDATRTARTCIACYTG	Degenerado	Hiwasa <i>et al.</i> , (2003)
E	ACSFdeg	ATGGGYTNGCDGARAAYCAG	Degenerado	Nakatsuka <i>et al.</i> , (1998)
F	ACSRdeg	ACNARNCYRAARCTHGACAT	Degenerado	Nakatsuka <i>et al.</i> , (1998)
G	ACOFdeg	GCNTGYSARAANTGGGGNTT	Degenerado	Nakatsuka <i>et al.</i> , (1998)
H	ACORdeg	NGGYTCYTTNGCYTGRAAYTT	Degenerado	Nakatsuka <i>et al.</i> , (1998)
I	ACOFespCP	GCGTGCGAAAACCTGGGGCTT	Específico	López-Gómez <i>et al.</i> , (2004)
J	ACORespCP	TTCTTTCGCCTGAAATTT	Específico	López-Gómez <i>et al.</i> , (2004)
K	EXPF	GSNCAYGCNACNTTYTAYGGNG	Degenerado	Morales <i>et al.</i> , (2008) no publicado
L	EXPR	YTGCCARTTYTGNCCCCARTT	Degenerado	Morales <i>et al.</i> , (2008) no publicado

3. Extracción de ADN genómico

Se obtuvo ADN genómico a partir de 3 g de tejido fresco de hoja de guayaba (Figura 10), con una concentración de 0.53 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

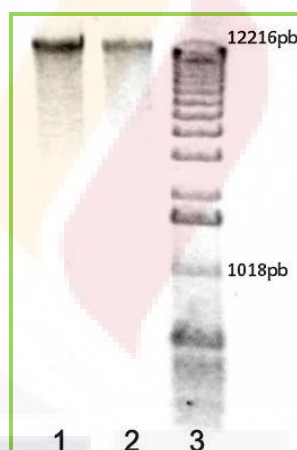


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de ADN genómico extraído de hoja de guayaba utilizando el protocolo modificado de Murray and Thompson (1980). Carril 1 y 2) ADN genómico de guayaba. Carril 3) Marcador de Peso Molecular de 1 Kb.

4. Análisis de la presencia de los genes mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN genómico.

Con la finalidad de verificar la funcionalidad de los oligonucleótidos descritos en la Tabla 2 y verificar la presencia de fragmentos genómicos correspondientes a poligalacturonasa, endo-1,4- β -glucanasa, ACCs, ACCo y α -expansina, se realizó una amplificación mediante PCR. La amplificación de los fragmentos fue positiva para los 5 genes de interés. En el caso de poligalacturonasa se obtuvo la amplificación de seis diferentes fragmentos genómicos dentro de un rango de tamaños entre los 1200 pb y

200 pb. Para endo-1,4- β -glucanasa se obtuvo la amplificación de cinco fragmentos de un rango entre los 1500 pb y 100 pb. En ACCs se obtuvo la amplificación de siete fragmentos en un rango de tamaños entre los 1600 pb y 200 pb. Para ACCo no se obtuvo amplificación de bandas utilizando los oligonucleótidos I-J, sin embargo se amplificaron cuatro fragmentos de un rango de tamaños entre los 1000 pb y 100 pb utilizando los oligonucleótidos G-H. Y para expansinas se obtuvo la amplificación de dos fragmentos, uno de 1000 pb y otro 750 pb aproximadamente (Figura 11).

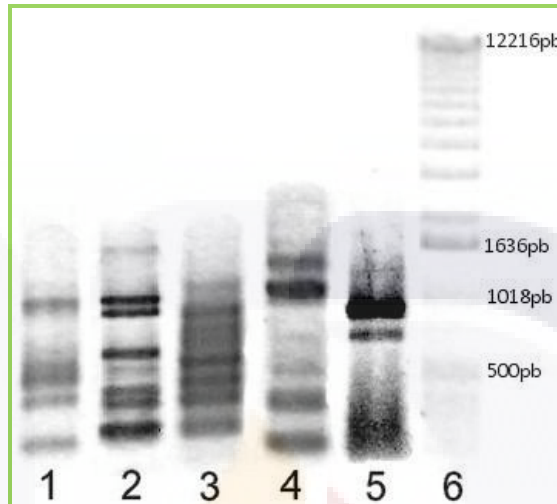


Figura 11. Visualización en gel de agarosa al 1%, de productos amplificados mediante PCR a partir de ADN genómico utilizando oligonucleótidos correspondientes a ACCs, ACCo, poligalacturonasa, endo-1,4- β -glucanasa y α -expansina; usando el kit 2X Master Mix (Fermentas). 1) Amplificación de cuatro fragmentos correspondientes a posibles ACCo; 2) Amplificación de siete fragmentos correspondientes a posibles ACCs; 3) Amplificación de seis fragmentos correspondientes a posibles poligalacturonasas; 4) Amplificación de cinco fragmentos correspondientes a posibles endo-1,4- β -glucanasas 5) Amplificación de dos fragmentos correspondientes a posibles expansinas y 6) Marcador de Peso molecular de 1 Kb.

5. Extracción de ARN Total

Para realizar los estudios de expresión mediante RT-PCR, fue necesario, extraer ARN total a partir de tejido de hoja, pedúnculo y de 5 diferentes estadios de desarrollo en el fruto de la guayaba. Para esto, se probaron diferentes protocolos con el fin de verificar la efectividad (Tabla 3).

Tabla 3. Efectividad de distintos métodos de extracción ARN total en diferentes tejidos de *Psidium guajava*.

Método de Extracción de ARN total				Efectividad	Tejidos
Concert™	Plant	RNA	Reagent	Positivo	Hoja, Pedúnculo y Fruto
(Invitrogen™)					
TRizol®	Reagent	(Invitrogen™)		Negativo	Fruto
PureLink™	MICRO-TO-MIDI	SYSTEM		Negativo	Fruto
using TRizol® Reagent (Invitrogen™)					
López-Gómez y Gómez-Lim (1992)				Positivo	Hoja, Pedúnculo y Fruto

Se obtuvo ARN total a partir de tejido de hoja, pedúnculo y de 5 diferentes estadios de desarrollo en el fruto de la guayaba utilizando Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen™) donde las concentraciones de ARN total obtenidas estuvieron dentro de un rango de entre 2.84 y 0.04 µg/µl (Figura 12), presentándose las concentraciones más bajas en los últimos dos estadios de maduración del fruto. Utilizando el método de López-Gómez and Gómez-Lim (1992) para los tejidos de hoja, pedúnculo y frutos inmaduros, no presentó problema alguno con la obtención de ARN, sin embargo para fruto maduro y sobre-maduro, se presentó problemas ya que el producto obtenido fue de calidad deficiente debido a la presencia de polisacáridos característicos de los estadios del fruto maduro y sobre-maduro. Para solucionar dicho problema se implemento una precipitación específica de polisacáridos propuesta por Mehar *et al.*, (2000). Para el caso de los dos protocolos restantes, no se obtuvo ningún resultado positivo.

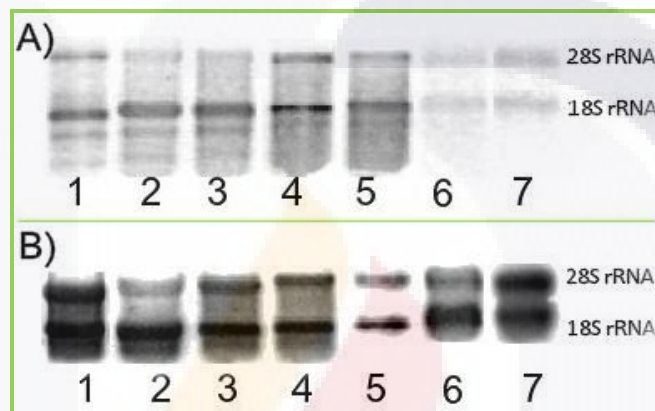


Figura 12. Visualización de ARN total aislado de diferentes tejidos vegetales de guayaba. A) Extracción utilizando el Kit Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen™); B) Método de extracción de López-Gómez y Gómez-Lim (1992), modificado con Mehar *et al.*, (2000). El ARN fue separado sobre gel de agarosa al 1% y fotografiado bajo luz ultravioleta. Carril 1) Pedúnculo; 2) Hoja; 3) Fruto inmaduro 1; 4) Fruto inmaduro 2; 5) Fruto transición; 6) Fruto maduro y 7) Fruto Sobre-Maduro.

6. RT-PCR

Para la expresión de los genes mediante RT-PCR, se probaron diferentes Kits comerciales, los cuales mostraron diferencias en cuanto a su efectividad como se muestra en la Tabla 4. Después de probar cada uno se eligió el kit comercial ThermoScript™ RT-PCR System for First-Strand cDNA synthesis (Invitrogen™) ya que fue el único método que generó resultados reproducibles en todos los tejidos probados. A partir de este Kit, se sintetizaron los cDNA correspondientes a los genes en estudio a partir de ARN total de tejido de hoja, pedúnculo y 5 diferentes estadios de maduración del fruto de guayaba.

Tabla 4. Efectividad de distintos métodos de RT-PCR en diferentes tejidos de *Psidium guajava*.

<i>Método de RT-PCR</i>	<i>Efectividad</i>	<i>Tejidos</i>
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)	2X PCR Master Mix (Fermentas) Negativo	Hoja, Pedúnculo y Fruto
SuperScript™ First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen™)	2X PCR Master Mix (Fermentas) Positivo	Hoja
SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen™)	2X PCR Master Mix (Fermentas) Positivo	Fruto
ThermoScript™ RT-PCR System for First-Strand cDNA synthesis (Invitrogen™)	2X PCR Master Mix (Fermentas) Positivo	Hoja, Pedúnculo y Fruto
AccessQuick™ RT-PCR System (Promega)	Negativo	Hoja, Pedúnculo y Fruto
Super Script™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq (Invitrogen™)	Negativo	Hoja, Pedúnculo y Fruto

Utilizando este Kit, se obtuvo tres fragmentos amplificados para poligalacturonasas; uno de aproximadamente 350 pb en fruto maduro, y dos fragmentos de 450 pb y 100 pb aproximadamente, en fruto sobre-maduro (Figura 13). Para endo-1,4- β -glucanasa, se amplificaron dos fragmentos, uno de ellos de 100pb, aparentemente con expresión constitutiva en todas las muestras analizadas; el otro fragmento de aproximadamente 900 pb se expresa únicamente fruto sobre-maduro (Figura 14). En el caso de expansinas, se logró la expresión de tres fragmentos, dos de ellos aparentemente de un mismo tamaño aproximado a 500 pb, pero en diferentes tejidos tales como pedúnculo y fruto sobre-maduro; el tercer fragmento de aproximadamente 530 pb, se observó solo en fruto maduro (Figura 15). Para la expresión de ACCs, se amplificaron varios fragmentos en pedúnculo cinco fragmentos de un tamaño de 800 pb, 500 pb, 400 pb, 300 pb y 200 pb aproximadamente; en hoja cuatro fragmentos correspondientes a 1000 pb, 800 pb, 700 pb y 400 pb; en tejido de fruto inmaduro 1, se amplificó cinco fragmentos de aproximadamente 1000 pb, 800 pb, 500 pb, 400 pb y 300 pb; y en fruto sobre-maduro se amplificó tres fragmentos de 400 pb, 300 pb y 200 pb (Figura 16). Para ACCo, únicamente se obtuvo un fragmento de aproximadamente 850 pb a partir de tejido de fruto sobre-maduro (Figura 17).

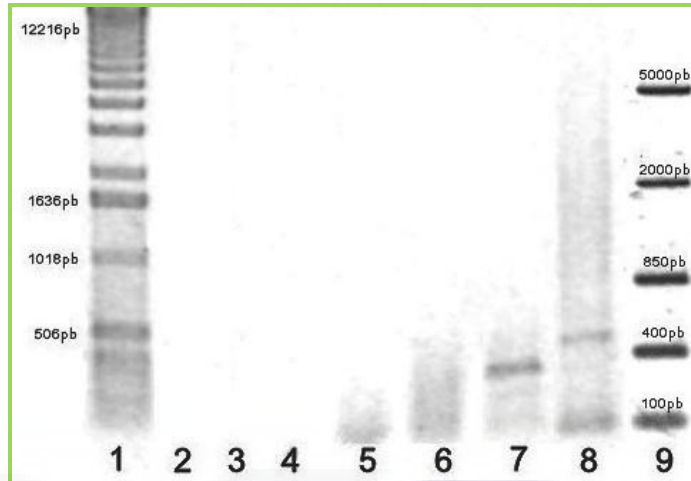


Figura 13. Imagen de fragmentos amplificados por RT-PCR usando oligonucleótidos degenerados para poligalacturonasa y analizados en gel de agarosa al 1%. Carril 1) Marcador de Peso Molecular 1 Kb 2) Pedúnculo; 3) Hoja; 4) Fruto inmaduro 1; 5) Fruto inmaduro 2; 6) Fruto transición; 7) Fruto maduro; 8) Fruto sobre-maduro y 9) Marcador de Peso Molecular 5000 pb.

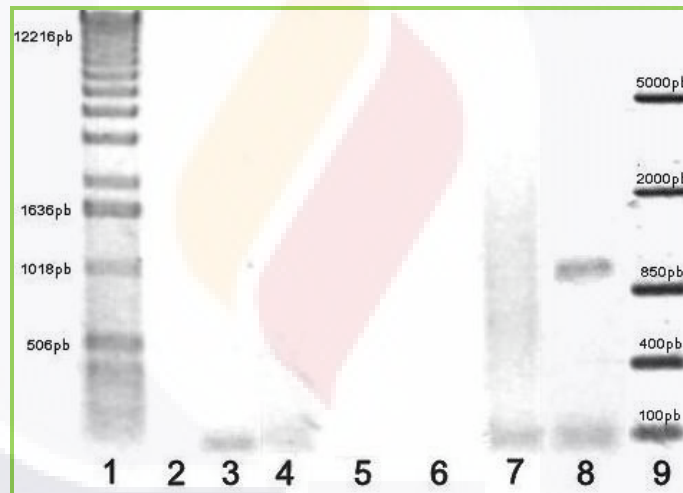


Figura 14. Imagen de fragmentos amplificados por RT-PCR usando oligonucleótidos degenerados para endo-1,4- β -glucanasa y analizados en gel de agarosa al 1%. Carril 1) Marcador de Peso Molecular 1 Kb 2) Pedúnculo; 3) Hoja; 4) Fruto inmaduro 1; 5) Fruto inmaduro 2; 6) Fruto transición; 7) Fruto maduro; 8) Fruto sobre-maduro y 9) Marcador de Peso Molecular 5000 pb.

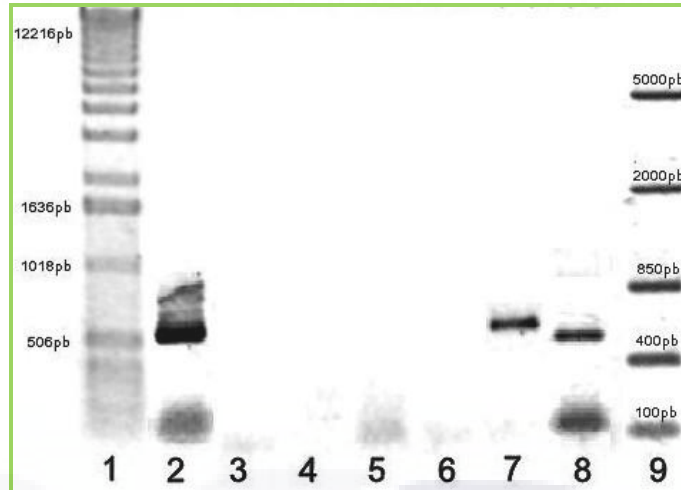


Figura 15. Imagen de fragmentos amplificados por RT-PCR usando oligonucleótidos degenerados para expansina y analizados en gel de agarosa al 1%. Carril 1) Marcador de Peso Molecular 1 Kb 2) Pedúnculo; 3) Hoja; 4) Fruto inmaduro 1; 5) Fruto inmaduro 2; 6) Fruto transición; 7) Fruto maduro; 8) Fruto sobre-maduro y 9) Marcador de Peso Molecular 5000 pb.

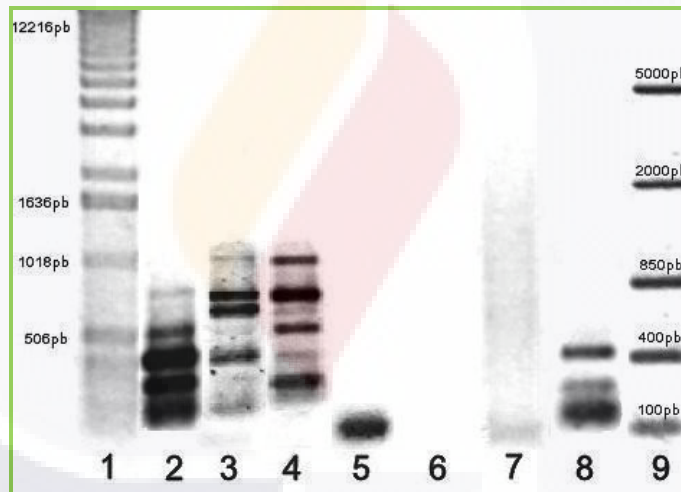


Figura 16. Imagen de fragmentos amplificados por RT-PCR usando oligonucleótidos degenerados para ACCs y analizados en gel de agarosa al 1%. Carril 1) Marcador de Peso Molecular 1 Kb 2) Pedúnculo; 3) Hoja; 4) Fruto inmaduro 1; 5) Fruto inmaduro 2; 6) Fruto transición; 7) Fruto maduro; 8) Fruto sobre-maduro y 9) Marcador de Peso Molecular 5000 pb.

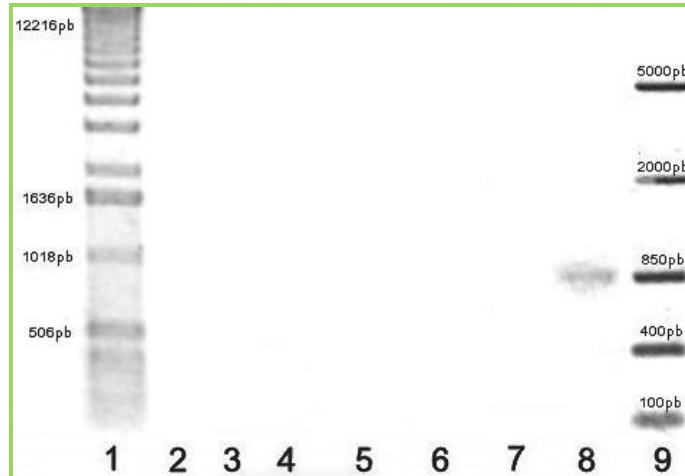


Figura 17. Imagen de fragmentos amplificados por RT-PCR usando oligonucleótidos degenerados para ACCo y analizados en gel de agarosa al 1%. Carril 1) Marcador de Peso Molecular 1 Kb 2) Pedúnculo; 3) Hoja; 4) Fruto inmaduro 1; 5) Fruto inmaduro 2; 6) Fruto transición; 7) Fruto maduro; 8) Fruto sobre-maduro y 9) Marcador de Peso Molecular 5000 pb.

7. Recuperación de fragmentos amplificados mediante RT-PCR de geles de agarosa

Una vez identificados los fragmentos de interés amplificados mediante RT-PCR, estos fueron recuperados a partir del gel de agarosa al 1%, para su posterior secuenciación. Las dos técnicas de recuperación de fragmentos de cDNA a partir del gel de agarosa descritas en la metodología, mostraron resultados positivos, sin embargo, para fines de secuenciación, la técnica de recuperación mediante sílica no fue favorable. Por ello, todas las recuperaciones de cDNAs fueron realizadas mediante la técnica de columnas, las cuales se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Fragmentos de cDNA recuperados a partir del gel de agarosa.

Fragmento de cDNA	Gen	Tamaño pb (aproximado)	Tejido
<i>PgPG1</i>	<i>Poligalacturonasa</i>	301	Fruto maduro
<i>PgEG1</i>	<i>Endoglucanasa</i>	603	Fruto sobre-maduro
<i>PgACO1</i>	ACCo	320	Fruto sobre-maduro
<i>PgEXP1</i>	α -Expansina	470	Fruto maduro
<i>PgEXP2</i>	α -Expansina	466	Fruto sobre-maduro
<i>PgEXP3</i>	α -Expansina	360	Pedúnculo
<i>PgACS1</i>	ACCs	*	Fruto verde 1

*Secuenciación en proceso

8. Secuenciación y análisis *in Silico*

La secuenciación de *PgPG1* obtenida a partir de fruto maduro de guayaba, mostró un fragmento de cDNA de 301 pb, la cual codifica para una proteína putativa de 100 aminoácidos (Figura 18). La comparación de la secuencia putativa *PgPG1* en la base de datos NCBI reveló una identidad por encima del 80% con respecto a otras secuencias de aminoácidos correspondientes a poligalacturonasas en plantas

superiores, en su mayoría relacionadas con la maduración del fruto (Figura 19). Todas ellas mostraron un dominio conservado correspondiente a PLN03003 el cual es miembro de la superfamilia cl14103, la cual posee cinco dominios correspondientes a poligalacturonasas. El dominio PLN03003 contiene una región denominada familia 28 glicosil hidrolasas, la cual, incluye a las poligalacturonasas (EC:3.2.1.15) enzimas importantes en el metabolismo de la pared celular.

A)	
GCTGGAAGAGGATGTTCTAGCGAAGCTGTTGCTCGGTCTAGCCCAGACTTGATCCTCACTCCATTTTGC GTGCCGGTG	80
AACGTGACCGTCTTAACCGTCACATTTTGGACACCGTCTCTTGTGATCCTTGCCAGGCTCCAATGCTGATGCCATG	160
TCCAGGTCCACAAGCGAGGTTTTCAATCCAGAGATTGTTGCTGCCCGGGCCGATAGAGACACAGTCGCTGCCGA	240
TCTTGGAGTTGAGGATGGTAACGCCAGTAGAGGCCCAATGTGCACMMRTCCGTRTTCGG	301
B)	
PXTXXVHIGASTGVTLNSKIGTGDDCVSIGPGSNNLWIENLACGPGHGISIGSLGKDQQEDGVQNVTVTKVTFTGTQNG	80
VRIKSWARPSNSFARNILFQ	100

Figura 18. Secuenciación de *PgPG1*. A) Parcial secuencia de 301 nucleótidos correspondiente a *PgPG1*. B) Secuencia de 100 aminoácidos correspondiente a *PgPG1*.



Figura 19. Búsqueda de secuencias similares a *PgPG1* en la base de datos del NCBI utilizando el programa BLASTp (Altschul et al., 1997, 2005). Se muestra la detección de un dominio conservado incluido en poligalacturonasas, así como 100 secuencias similares de aminoácidos correspondientes a poligalacturonasas, con una identidad por encima de 80% con respecto a la secuencia putativa *PgPG1*.

En un alineamiento múltiple de *PgPG1* con seis secuencias de proteínas de poligalacturonasas, mostró una región rica en glicina en la posición de aminoácidos 44-54, altamente conservada en PGs de plantas, hongos y bacterias. Dentro de esta región se localiza un residuo histidina encontrado en todas las PGs secuenciadas, al

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

cual se le atribuye una función catalítica. También contiene un sitio N-glicosilación localizado en la posición de aminoácidos 66-68 que es conservado entre una gran cantidad de poligalacturonasas de plantas. Posee cuatro dominios conservados de las PGs en las posiciones de aminoácidos (1-7), (24-27), (44-54) y (82-84). Por último presenta dos de ocho residuos de cisteína altamente conservados entre PGs de especies de plantas superiores y hongos. Comparte más de 30 aminoácidos idénticos con respecto a las seis PGs analizadas (Figura 20). Este análisis demuestra que debido al tamaño de la secuencia putativa *PgPG1* que corresponde a 100 aminoácidos, esta es considerada una secuencia parcial que codifica para PG.



PC-PG2	-----MANPKLSLY	9
PgPG1	-----	
TAPG2	-----M	1
MPG1	-----MM	2
GuayabaPG	-----	
MPG3	MCRRLGRRPCCLSLTLFLVVVVNFDTFSTCFGSYPDVDNPLPSISSGDKEDYGQHYE	60
PC-PG1	MALKTQLLWSFVVVVFVSTSTSCSGSSFQEVNALSIVDHDVDRVSGYNSRAYPSYMDT	60
PC-PG2	PAAAVFALLMMAISITNVDA--VTFSVSSLGAKADGSIDSTKAFLS	55
PgPG1	-----	
TAPG2	SPLAIFFLFLIN---SSLAANT---NIYDVQNYGAKSDGKTDSSKAFLN	44
MPG1	VVVIIFLALLLKKHALTAAAGG---LTFDIVNLGAKPDGKTDASHALQS	48
GuayabaPG	-----	
MPG3	HSSSEFSSMLRTRLEKMVSSPL---ASPEIFNVDDYDYGAMGDGE-DDTEAFKE	108
PC-PG1	IEGLKFMELIRPRTLQSSSRKLNITITGGIATSSAPAKTISVDDDFGAKNGA-DDTQAFVK	119
PC-PG2	AWSNACASVNPAVIYVPAGRFLLGNVAFSGP-CKSNAITFRIAGTIVAPSDYRVI-GNAG	113
PgPG1	-----	
TAPG2	AWAACASNTPTSTINVPAGKYLHNANFNGQTCKSKAITMHDGTLTLLAPSDYINVI-GNEE	103
MPG1	AWARACSSTVASTVYVPKGRFYVQSGNFIGP-CNYNSITFLINGLVASSNFVKL-AKSR	106
GuayabaPG	-----	
MPG3	TWKDACSSTNAIFLVPCDRVYHLKPIITFSGP--CNSPLLFQIEGTVKASPHISDYEKDRR	166
PC-PG1	AWKACSSSGAIVLVFPQKKYLVRPIDFSGP--CKSQLTVQIYGTIEASEDRSIY-KDID	176
PC-PG2	NWLLFQHVNGVTISG-GVLDGQGTGLWDCKS-SGKSCPS---GATTLFSNSNNIVVSGL	168
PgPG1	-----	
TAPG2	NWIKFEKVNALSIYS-GTFDQGQASLWACKNPNNKNCPD---GTTALTFFYNSNNIIMSGV	159
MPG1	TWISFSRINGLSIYG-GILDGQGTTLWACKNSGINTCSL---GATTLVSDSNQILINGL	162
GuayabaPG	-----	
MPG3	HWIIFQNLGLRVEGKGIINGNRKWWLNSCKVWKLPC-KEAPTAVTFYQCTNLRVEGL	225
PC-PG1	HWLIFDNVQNLVVGPGTINGSGNIWWKNSCKRKPQPPCGTHAPTAVTFNRCNNLVVKNL	236
PC-PG2	ISLNSQMFHIVVNGCQNVKMQGVKVAAGNSPNTDGIHVQMSSGVTILDSKIETGDDCVS	228
PgPG1	-----PXTXXVHIGASTGVTILNSKIGTGDDCVS	29
TAPG2	TVQNSQKFQILVDGCRNVKLGQVKVSAPGNSPNTDGIHVKLSSGVSINSHIGTGDDCIS	219
MPG1	SSVNSQMYHIVVYDQDVKIQGVKVAASNBPNTDGIHVERSSNVILNSNIRTGDDCIS	222
GuayabaPG	-----IGIHVGRSTGVNITGADIRTGDDCVS	26
MPG3	RFRNAQQMLLSFQRQNNVKALNLWIYAPGNSPNTDGIHVGTQFIVIKNCLIMTGDDCIS	285
PC-PG1	KIQDAQMHVRFQNCINVQASRLTVTAPEDBPNTDGIHVNTQNTITSSSVIGTGDDCIS	296
	* * * * *	
PC-PG2	VGPGTTLNWIENVACGPGHGISIGSLGKDQOEAGVQNVTVKTVTFTGTENGVRIKSNGRP	288
PgPG1	IGPGSNLWNIENLACGPGHGISIGSLGKDQOEDGVQNVTVKTVTFTGTQNGVRIKSNARP	89
TAPG2	IGPGTSLNWIENLACGPGHGISIGSLGKWKQOELGVQNVTVKTVTFTSGTNGVRVKNARP	279
MPG1	IGPGTSHLWMERLACGPGHGISIGSLGKWWEAGVEVTLKTAHFKGTMGVRIKSNGRP	282
GuayabaPG	LGDSGQQVNVESVTCGPGHGISIGSLGKYHDEQPVVGVTVRNCNTLNTNGLRVTNWPAS	86
MPG3	IVSGSKNVRAKGITCGPGHGISIGSLGAGKSEAEVSNVVVDTAKFSGTNGVRIKTNQGG	345
PC-PG1	IVSGSRVQATDITCGPGHGISIGSLGEDGSKDHVSGVCVNGAKLSGTSNGLRIKTNQGG	356
	* * * * *	
PC-PG2	STGFARSILFQHIVMTNVQNPVIDQ-NYCPND-KGCPGQASGVKVSVDVTVQGIHGTSAT	346
PgPG1	SNSFARNILFQ-----	100
TAPG2	SNGFVRNILFQHIVMNVKNPIIIDQ-NYCPNH-ESCPHQGSGGIKISDITYQDIHGTSAT	337
MPG1	SNGFAKNILFKHIVFDNVNPLIIDQ-NYCPNH-QGCPGQASGVKISNVRYEDIHGTSAT	340
GuayabaPG	PGGVATNMHFEDITVKNVSTPILIDQKNYCPSI-----	119
MPG3	K-GYAQNIIIFQNVMDNVINPIIINQ-NYCDQK-EPCTQQADAVAVSNVMYQNIIRGTSAS	402
PC-PG1	S-GSATNIVFQNVQMNVTNPIIIDQ-NYCDHKTKDCKQKQSAVQVKNVLYQNIIRGTSAS	414
	*	
PC-PG2	EVAVKFDCCSSMYPNGIRLQDVKLTYNNQ-----AAEASCIHAGGTAGTVQPTSCF--	398
PgPG1	-----	
TAPG2	KIAVKLDCSKTNPCSGITLEGVNLVYQVQVQ-----QTEASCVNARGRVSGLQKTTNCLLE	391
MPG1	EVGINFECSPARPONEIRLKDVKLIFKQ-----IAQASCEYATGTTLGLVQPSNCLL-	393
GuayabaPG	-----	
MPG3	EVAVKFDCCSKSVPCQGILLQDINLVHKGKNDKSAQAEASCKNVKWKNRGRVSPQCGGG-	461
PC-PG1	GDAITLNCSSQVPCRGIALQSVRLQN-----GRAECNNVQPAYKGVASPRC----	460

Figura 20. Comparación mediante un alineamiento múltiple de *PgPG1* y seis secuencias de aminoácidos que codifican para proteínas de PG (GuayabaPG [No. Acceso AAX12520], jitomate *TAPG2* [No. Acceso AAB09575], Melón *MPG1* y *MPG3*

[No. Acceso AAC26510 y AAC26512] y pera *PC-PG1* y *PCPG2* [No. Acceso BAC22688 y BAC22689]), utilizando el programa de alineamiento múltiple *Clustal W2* (Larkin *et al.*, 2007). Los guiones indican “Gaps” que fueron introducidos para maximizar la similitud. Los asteriscos indican secuencias idénticas. Indicado en un cuadro rojo se muestra una región rica en glicina altamente conservada en PGs de plantas, hongos y bacterias; y en sombra azul dentro de esta región se señala un residuo de histidina encontrado en todas las PGs secuenciadas. Sombreado de color verde se muestran potenciales sitios de glicosilación (N-X-T/S). (Hadfield *et al.*, 1998; Kalaitzis *et al.*, 1997). En cuadros azules se marcan dominios conservados de PGs (Gorguet *et al.*, 2009; Redondo-Nevaldo *et al.*, 2001). En sombreado gris se muestran residuos de cisteína altamente conservados entre PGs de especies de plantas superiores y hongos (Redondo-Nevaldo *et al.*, 2001).

El dendograma diseñado a partir del porcentaje de identidad de 19 secuencias de aminoácidos correspondientes a poligalacturonasas descritas en la metodología, incluyendo la secuencia de *PgPG1*, mostró tres grandes grupos de poligalacturonasas. En el grupo A se incluye poligalacturonasas que son expresadas en fruto o en zonas de dehiscencia. El grupo B incluye poligalacturonasas que son expresadas en fruto y/o en zonas de abscisión, en el cual, quedo incluida la poligalacturonasa putativa correspondiente a *PgPG1*. El grupo C es comprendido principalmente por poligalacturonasas que son expresadas en polen y anteras, en cuyos tejidos predomina principalmente, actividad de exo-poligalacturonasas. Por último como grupo externo se muestra una poligalacturonasa correspondiente a hongo *Aspergillus flavus* (Figura 21). *PgPG1* mostró una estrecha relación con una secuencia de pera *PC-PG2* la cual es expresada en la maduración del fruto.

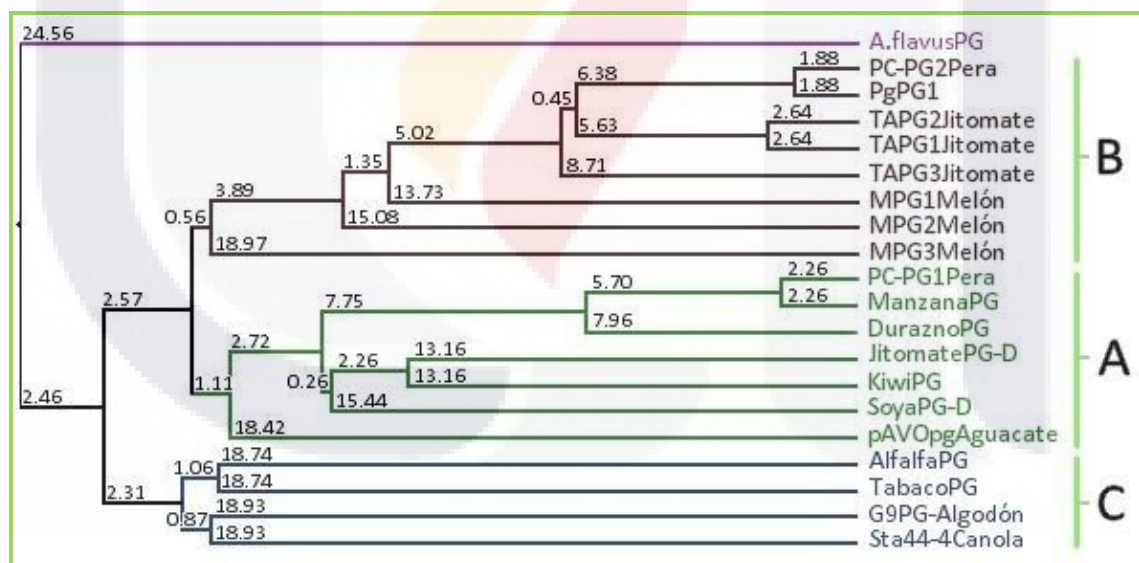


Figura 21. Dendograma diseñado tomando en cuenta el porcentaje de identidad entre 19 secuencias de aminoácidos correspondientes a poligalacturonasas y la secuencia putativa *PgPG1* correspondiente a una poligalacturonasa. El dendograma fue generado utilizando el programa *Clustal W2* (Larkin *et al.*, 2007) y las secuencias de aminoácidos descritas en la “metodología”. Las distintas poligalacturonasas se agrupan en tres diferentes grupos denominados A, B y C según (Hadfield *et al.*, 1998), donde *PgPG1* se incluye dentro del grupo B. En cada rama se indica la distancia media basada en el porcentaje de identidad de la secuencias.

La secuenciación de *PgEG1* obtenida a partir de fruto sobre-maduro, tiene una secuencia parcial de 603 pb, la cual codifica para una proteína putativa de 201

aminoácidos (Figura 22). La comparación de la secuencia putativa *PgEG1* en la base de datos del NCBI reveló un dominio conservado perteneciente a la superfamilia Glico_hidro_9 (Figura 23), la cual comprende algunos dominios correspondientes a enzimas con actividad de endo-1,4-β-glucanasas (EC. 3.2.1.4).

A)		
GCGGCAGCCATGGCGGCAGCCTCCATTGTGTTAGGGAAACAAACCCACATTACTCCACCTGCTATTGCACCACGCCCG		80
GCAGGTACATTGAGACCGTTATAGCGACGTCGGTTGAGCGATGTACCAGCTGGTAAACCACATGATACCAAAAATGGTT		160
TGCGTTTAGGTGAACCATAGCATTGAACTAGAACCACCGCGCTCTTACTCTTCTTAAATGGAGTGAGTTTGTTA		240
AATTGCTGGTTGGCTGCGCAGTTGTTGAGTTTGAGACAAAAGAAGGGGGAAGTATGACGCGAGCGTGGTGGCGGGCAA		320
GGGGTACTATCCGTCGGTGAGCGGGTACAACGACGAGCTGTTGTGGGCTGCTCTGTGGCTCTACAAGGCCACCGGCAGCG		400
TTGGCTACTTGGCGTACCGGATGGACAATGCGGTGTCGCTAGGTGGGATCACCTGGGCCATCGCGGAGTTTACGCTGGAC		480
ATCAAGTTCGCCGGCTCAAATTCGCTCCATGGTATGCCACTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTTTATTGCTGCATTA		560
CTCTTGATTGATCGAGCTTCGATCGGATTTGGGTGACAGT		603
B)		
AAAMAASIVFRETNPHYSHLLLHHRQVH-DRYSDVR-AMLPAGKPHDTKNGRLGEP-HLN-NRTALSYFFNGVSL		80
NCWLAAQLFEFGDKRRGKYDASVVAAKGYPSVSGYNDELLWAALWLYKATGSVGYLAYAMDNAVSLGGITWIAIEFSWD		160
IKFAGVQILASMVCHSLSLSALYCCINS-LIDVSYRILGAV		201

Figura 22. Secuenciación de *PgEG1*. A) Parcial secuencia de 603 nucleótidos correspondiente a *PgEG1*. B) Secuencia de 201 aminoácidos correspondiente a *PgEG1*.

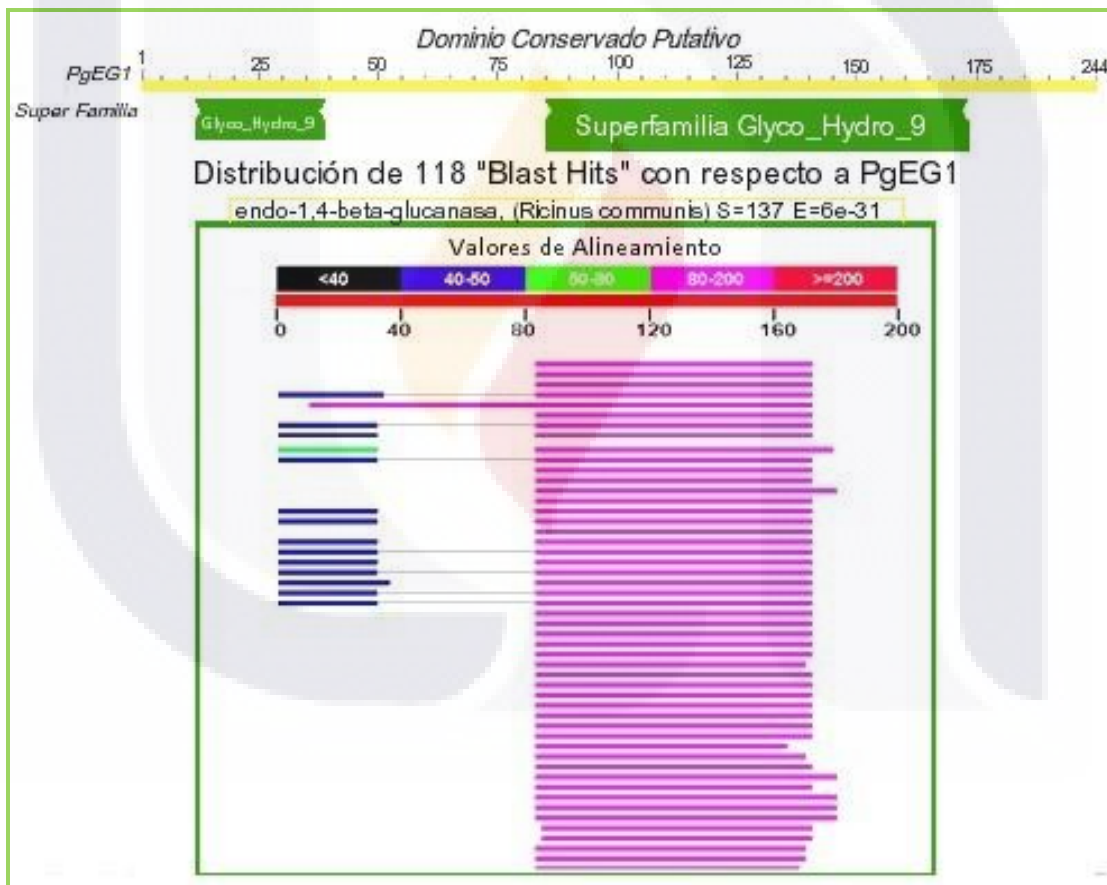


Figura 23. Búsqueda de secuencias similares a *PgEG1* en la base de datos del NCBI utilizando el programa BLASTp (Altschul et al., 1997, 2005). Se muestra la detección de un putativo dominio conservado incluido en endo-1,4-β-glucanasas, así como 118 secuencias similares con respecto a la secuencia putativa *PgEG1*.

Tomcel8	-----	
PC-EG2	-----	
faEG1	-----	
A.thalianaEG	-----	
Tomcell	-----	
PC-EG1	MSMYGRDPWGGPLEINTDSATDDDRSRNLQDLDRALSSRPLDETTQQSW	50
PgEG1	-----	
Tomcel8	-----MKGFVGS�-----VFVILLVVPVA	19
PC-EG2	-----MEKFVRVVS-----MAPLLLLLCFPFA	22
faEG1	-----MARNGLCPLGNAPAFRATLVLSLLLLLQPIR	31
A.thalianaEG	-----MARKSLIFP-----VILLAVLLFSPPYI	23
Tomcell	-----MACSKNIWV-----IVIFFLCILAGPII	23
PC-EG1	LLGPSGEQKKKYVDLGCIVSRKIFVWTVGTLVSAFLAGFITLIVKTVP	100
PgEG1	-----	
Tomcel8	L-----AGHNYGEALS KSF LFYEAQRSGYLPRNQVRQWRGNSGLNDG--	61
PC-EG2	L-----AGHDYGOALSNSILFFEAQRSGFLPPNQVVTWRNSNGLYDG--	64
faEG1	-----AGHDYHDALRKSILFFEQRSGLKPPDQRLKWRSDALHDG--	72
A.thalianaEG	S-----AGHDYRDALRKSILFFEQRSGLKPPDQRLKWRSDALRDG--	65
Tomcell	-----AQDYNDLGLKAILFFEQRSGLKPPVSRVQVWKRGSALIDG--	63
PC-EG1	RHRHSRPPPDNYTLALRKS LMF FNAQRSGKLPKHNNVSWRGNCLRIDGND	150
PgEG1	-----AAAMAAASIVFRETNPHYSHLLLHHRQVH--DRYSDVR--	37
	* * * * *	
Tomcel8	-KASGIDL VGGYDAGDNVKFGLP--MAFTVTMLSWSILEYGRQMAASGE	108
PC-EG2	-KANGVDLVGGYDAGDNVKFGLP--MAFTVTMMSWSIEYGSQMAASGE	111
faEG1	-STAGVDLTGGYDAGDNVKFGFP--MAFTTTLLAWSIIDFGRVMG--TE	117
A.thalianaEG	-SSAGVDLSGGYDAGDNKIFGFP--MAFTTTMLSWSIIDFGKTMG--PE	110
Tomcell	-IEHVNLIGGYDAGDNVKFGWP--MAYSLTLLSWAAIEYQTQISSNQ	110
PC-EG1	PSTTFKDLAGGFYDAGDAIKFNFP--ASFAMTMLSWSVIEYSAKYEAAGE	198
PgEG1	----AMLPAKGPHDTKNGRLGEP--HLN-NRALSYSFFNG-----	72
	* * * * *	
Tomcel8	LSHAMDAVKWGTDYLLKAHPPEY----VLYGEVGDGN-----TDHYC	146
PC-EG2	LGHAMDAVKWGTDYFIKAHPPEP----VLYGEVGDGN-----TDHYC	149
faEG1	QRNAV KALRWGTDYLLKATAVPG----VVFVQVGDY-----SDHNC	155
A.thalianaEG	LRNAV KAVKWTDYLLKATAIPG----VVFVQVGDY-----SDHNC	148
Tomcell	LVHLQNAIRWGTNFLIRAHTSST----TLYTQVGDGN-----ADHQC	148
PC-EG1	LSHVKEIKWGSDFYFLKTFNHSADSIDRLVAQVGVGSTAGGSTPNNDHYC	248
PgEG1	-----VSLNCWL-----	80
Tomcel8	WQRPEDMTTSRAAYRIDPNHPGSDLAGETAAMAAASIVFRRYNPGYSNE	196
PC-EG2	WQRPEDMTTNRQAYKISPSNPGSDLAGETAAMAAASIVFRRSNPAYSRE	199
faEG1	WERPEDMDTRRTVYKIDHNNPGSDVAGETAALAAASIVFRSRDPAYSRL	205
A.thalianaEG	WERPEDMDTLRTVYKIDRAHPGSDVAGETAALAAASIVFRKRDPAYSRL	198
Tomcell	WERPEDMDTPRTLYKITSNSPGSEVAADVAAAFAAASIVFKNIDSNYSTK	198
PC-EG1	WMPEDIDYQR---PVSQCHSCSDLAEMAAALAAASIVFKD-NKAYSQK	294
PgEG1	-----	
Tomcel8	LLNHAHQLFEFADKYRKYDSS-ITVAQKYYSVSGYADELLWGAAWLYK	245
PC-EG2	LLSHAYQLFDFADKYRKYDSS-ITVAQKYYSVSGYNDELLWAAAWLFQ	248
faEG1	LLNRVAVKVFEFADTHRGAYSSSLKNAVCPFYCDVNGFQDELLWGAAWLHK	255
A.thalianaEG	LLDRATR VFAFANRYRGAYSNSLYHAVCPFYCDFNGYQDELLWGAAWLHK	248
Tomcell	LLKRSRSLFAFADKYRGSY----QASC PFYCSYSGYKDELLWAAAWLYK	243
PC-EG1	LVHGAKTLFRFSREQRGRYSAGGSTDAATFYFNSTSYWDEFIWGGAWMY	343
PgEG1	----AAQLFEFGDKRRGKYDAS-VVAAKGYYPSVSGYNDELLWAAWLYK	125
	* * * * *	
Tomcel8	ASNNQFYLNLYLGRNGDALGGTGWSMT---EFGWVVKYAGVQTLVAQFLM	291
PC-EG2	ASNNQYLDYLGNGDSMGGTGWSMT---EFGWVVKYPGVQTLVAKFLM	294
faEG1	ASRRRQYREYIVRNEVILRAGDTIN---EFGWVVKYAGVQTLVAQFLM	300
A.thalianaEG	ASRRRQYREYIVRNEVILRAGDTIN---EFGWVVKYAGVQTLVAQFLM	293
Tomcell	AGGGNNYLNYSINQGSQVAVS-----EFSWDDKFAQAQTLLAKEYL	285
PC-EG1	ATGNSSYLQLATTPGLAKHAGAFWGGPDYGVLSWVNDKLAGAQVLLSRLXL	393
PgEG1	ATGSVGYLAYAMDNAVSLGGITWAI---EFSWVVKYAGVQTLVAQFLM	167
	* * * * *	
Tomcel8	SGKAGHN-APVFEKYQQAENFMCSMLGK-GNRNTQKTPGGLIYRQRW--	337
PC-EG2	QKGAGSH-TAVFQKYQQAENFMCSVCGK-GSQNARKTPGGLIYRQRW--	340
faEG1	MGKADY----FESFKQADGFICSVLPGLAHTQAQYSPGGILFKPGG--	343
A.thalianaEG	MGKAAY----FESFKQADGFICSVLPGLAHTQAQYSPGGILFKPGG--	336
Tomcell	NGKSN----LEKFKKDADSFICGLMPESSSIQIKTTPGGLIYRQRW--	327
PC-EG1	FLSPGYPYEEILRTFHNQTSIIMCSYLP--VFTTFNRKTKGGLIQLNHGRP	441
PgEG1	-----MVCHSLSLSALYCCINS-----	184
	* * * * *	



Figura 24. Comparación mediante un alineamiento múltiple de *PgEG1* y seis secuencias de aminoácidos que codifican para proteínas de EG (Pera *PC-EG1* y *PC-EG2* [No. Acceso BAC22690 y BAC22691], jitomate *Tomcel1* y *Tomcel8* [No. Acceso AAA69908 y AAD08699], fresa *faEG1* [No. Acceso CAB43937] y *A. thaliana* [No. Acceso Q9CAC1]), utilizando el programa de alineamiento múltiple *Clustal W2* (Larkin *et al.*, 2007). Los guiones indican “Gaps” que fueron introducidos para maximizar la similitud. Los asteriscos indican secuencias idénticas. Sombreado de color verde se muestran potenciales sitios de glicosilación (N-X-T/S). (Lashbrook *et al.*, 1994; Trainotti *et al.*, 1999). Sombreado de amarillo se indica los triptófanos conservados en todas las EGs y en gris se muestra las secuencias de dos CBD (dominio de unión a celulosa) correspondiente a pera y jitomate (Trainotti *et al.*, 2006).

En un alineamiento múltiple de *PgEG1* con seis secuencias de proteínas de endo-1,4-β-glucanasa se observa aminoácidos bien conservados como triptófano (Figura 24).

El dendograma diseñado a partir del porcentaje de identidad entre 19 secuencias de aminoácidos alineadas, correspondientes a endo-1,4-β-glucanasas descritas en la metodología, incluyendo la secuencia de *PgEG1*, mostró tres grandes

grupos de endo-1,4-β-glucanasas. El grupo α y β incluyen endo-1,4-β-glucanasas que son expresadas en maduración del fruto, en zonas de abscisión y en procesos de elongación, como es el caso de tubos polínicos. El grupo γ incluye endo-1,4-β-glucanasas que poseen un dominio que permite atravesar la membrana, algunas vinculadas con la biosíntesis de celulosa. La secuencia putativa de endo-1,4-β-glucanasas correspondiente a *PgEG1* quedó dentro del grupo α. Por último como grupo externo se muestra una endo-1,4-β-glucanasa correspondiente a *Dyctiostelium discoideum* (Figura 25).

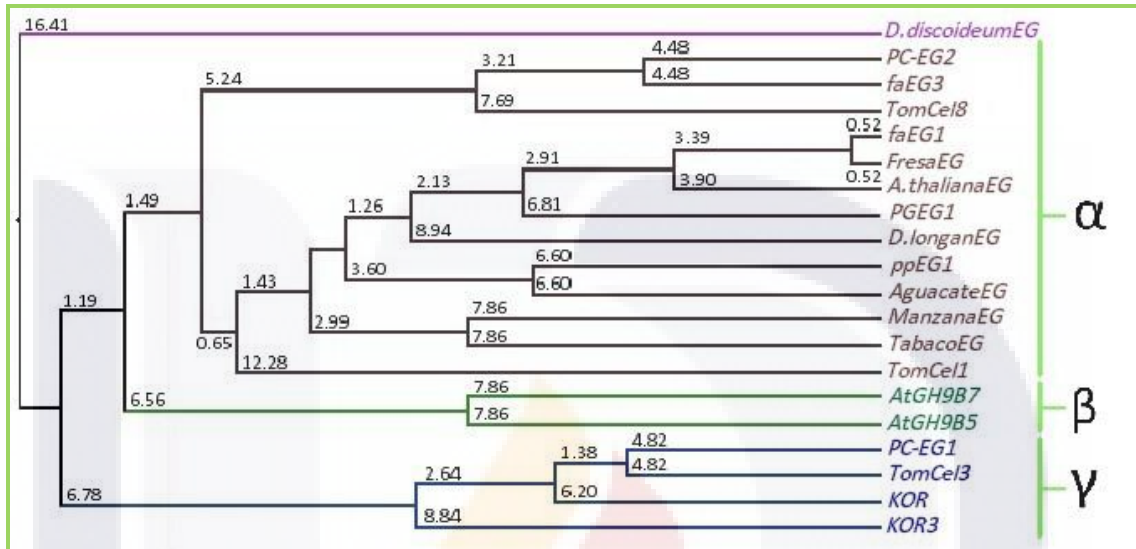


Figura 25. Dendograma diseñado tomando en cuenta el porcentaje de identidad entre 19 secuencias de aminoácidos correspondientes a endo-1,4-β-glucanasa y la secuencia putativa *PgEG1* correspondiente a una endo-1,4-β-glucanasa. El dendograma fue generado utilizando el programa *Clustal W2* (Larkin *et al.*, 2007) y las secuencias de aminoácidos descritas en la “metodología”. Las distintas endo-1,4-β-glucanasas se agrupan en tres diferentes subfamilias denominados α, β y γ según (Libertini *et al.*, 2004), donde *PgEG1* se incluye dentro de la subfamilia α. En cada rama se indica la distancia media basada en el porcentaje de identidad de la secuencias.

La secuenciación de *PgACO1* obtenida a partir de fruto sobre-maduro, mostró un fragmento de cDNA de 320 pb, la cual codifica para una proteína putativa de 106 aminoácidos (Figura 26). La comparación de la secuencia putativa *PgACO1* contra la base de datos del NCBI reveló una identidad por encima del 80% con respecto a otras secuencias de aminoácidos correspondientes a ACCo en plantas superiores, en su mayoría relacionadas con la maduración del fruto. Mostró un dominio PLN02299 el cual corresponde a ACCo (Figura 27).

A)	
GATGGACACGGTTGAGAGACTGACAAAGGGGACACTACAAGAAGTGAATGGAGCAAAGGTTGAGAGAGTTGGTGGCGAGCA	80
AGGGGCTCGAGTATGTCCAAAAAGAGGTCCATGACTTGGATTGGGAAAGCACCTTCCACTTGAAGCATCTTCTGAATCC	160
AACATCTCCAGATCCAGACCTTGATGATGACTATCGGAAAGTCATGAAGGATTTGCAGTGAAACTGGAGAAGCTGGC	240
AGAAGAGCTATTGGACCTGCTGTGTGAGAACTTAGGGCTGGAGAAAGGGTACTTGAAGAATGCCTTTCATGGGTCMAATG	320
B)	
MDTVERLTGKHYKK-MEQRFRELVASKGLEYVQKEVHDLWESTFHLKHPESNIFQIPDLDDYRKVMKEFAVKLEKLA	80
EELDLLCENLGLKGYLKNAFHGXX	106

Figura 26. Secuenciación de *PgACO1*. A) Parcial secuencia de 320 nucleótidos correspondiente a *PgACO1*. B) Secuencia de 106 aminoácidos correspondiente a *PgACO1*.

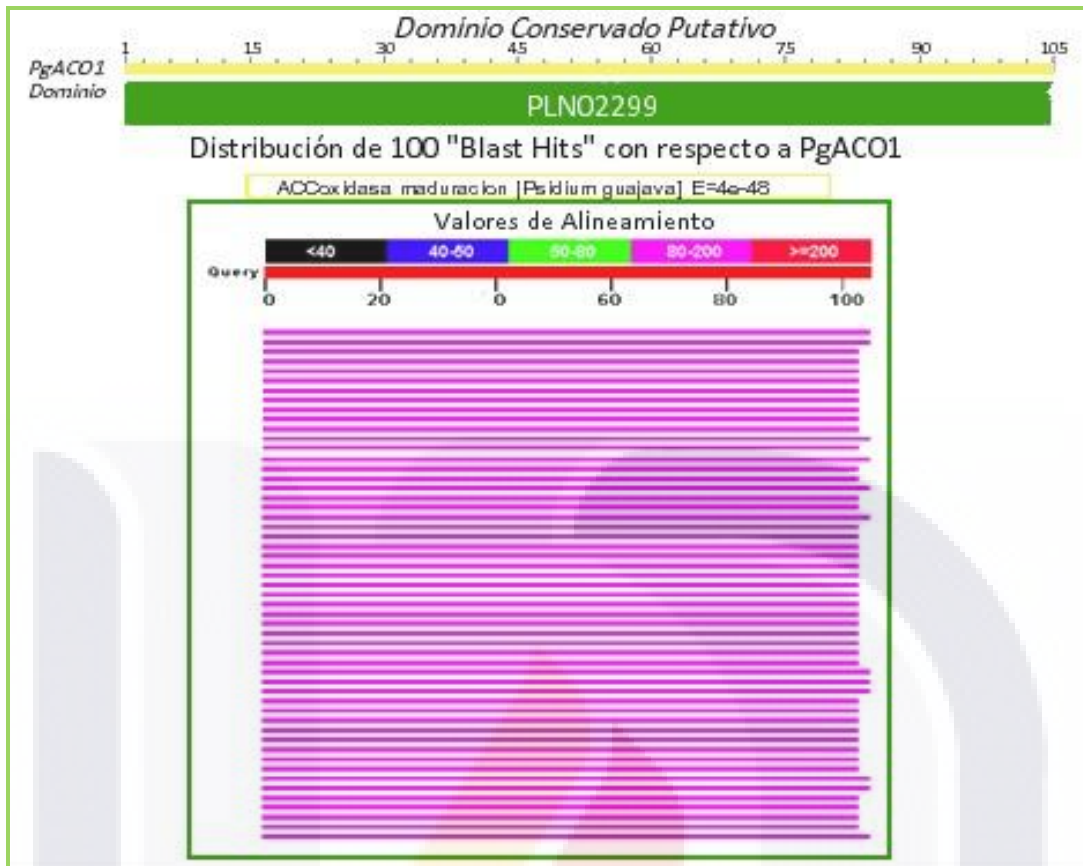


Figura 27. Búsqueda de secuencias similares a *PgACO1* en la base de datos del NCBI utilizando el programa BLASTp (Altschul et al., 1997, 2005). Se muestra la detección de un putativo multi-dominio PLN02299 el cual corresponde a ACCo, así como 100 secuencias similares con respecto a la secuencia putativa *PgACO1*.

En un alineamiento múltiple de *PgACO1* con seis secuencias de proteínas de ACCo específicas de la maduración, mostró dos regiones altamente conservadas en ACCo localizados en las posiciones de aminoácidos 38-46 y 83-93 (Figura 28). Comparte más de 50 aminoácidos idénticos con respecto a las seis ACCo analizadas. Este análisis demuestra que debido al tamaño de la secuencia putativa *PgACO1* que corresponde a 106 aminoácidos, esta es considerada una secuencia parcial que codifica para ACCo.

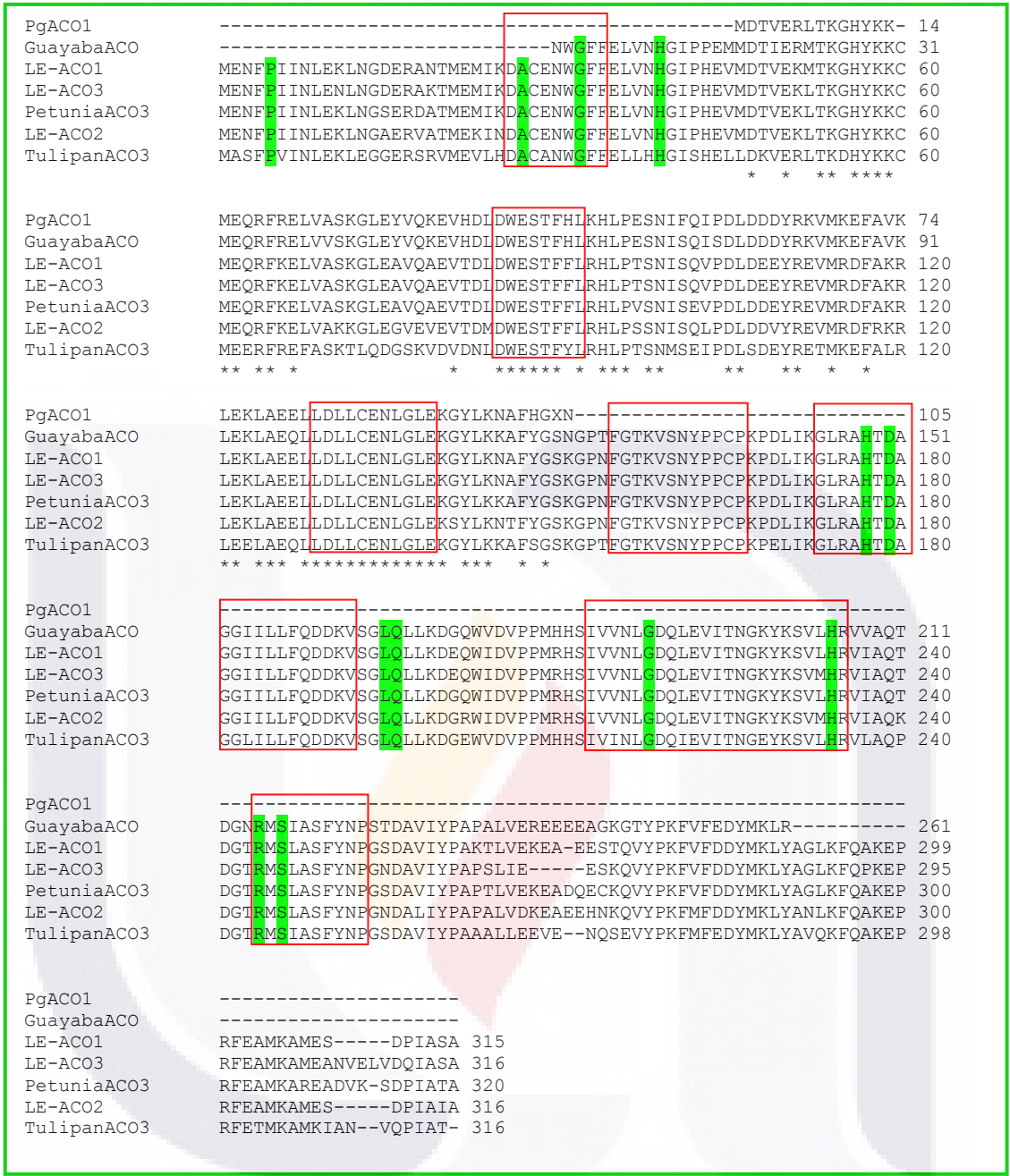


Figura 28. Comparación mediante un alineamiento múltiple de *PgACO1* y seis secuencias de aminoácidos que codifican para proteínas de ACCo (GuayabaACO [No. Acceso AAM74522], jitomate *LE-ACO1*, *LE-ACO3*, *LE-ACO2* [No. Acceso PO5116, CAA68538, P24157], *PetuniaACO3* [No. Acceso AAA33697] y *TulipanACO3* [No. Acceso BAE20197]), utilizando el programa de alineamiento múltiple *Clustal W2* (Larkin *et al.*, 2007). Los guiones indican “Gaps” que fueron introducidos para maximizar la similitud. Los asteriscos indican secuencias idénticas. Las regiones altamente conservadas en ACCo se indican en un cuadro rojo, y en sombra verde se señalan los doce residuos de aminoácidos conservados en todos los miembros de la familia Fe(II) y ascorbato dioxigenasas (Momonoi *et al.*, 2007; Nakatsuka *et al.* 1998).

El dendograma diseñado a partir del porcentaje de identidad entre 19 secuencias de aminoácidos correspondientes a miembros de la superfamilia Fe(II) y ascorbato descritas en la metodología, incluyendo la secuencia de *PgACO1*, mostró cuatro

familias. La familia A incluye secuencias correspondientes a ACCo involucradas en la maduración de fruto, en respuesta a heridas de hojas y en el marchitamiento de pétalos, hojas y tallos. La familia B incluye una secuencia correspondiente a la proteína E8 la cual participa en la regulación en la biosíntesis de etileno y cuya expresión es específica de la maduración en fruto. La familia C incluye enzimas flavonona 3-Hidroxilasas implicadas en la biosíntesis de varias clases de flavonoides cuya expresión se observa en flores. La familia D incluye una secuencia de una proteína A2 de maíz la cual se expresa en la capa de aleurona en granos de maíz e interviene en la biosíntesis de pigmentos de antocianina. Por último como grupo externo se muestra una ACC deaminasa correspondiente a *Pseudomona fluorescens* (Figura 29). La secuencia putativa de ACCo correspondiente a *PgACO1* quedó dentro de la familia A mostrando una alta similitud con respecto a proteínas correspondientes a ACCo implicadas en la maduración del fruto.

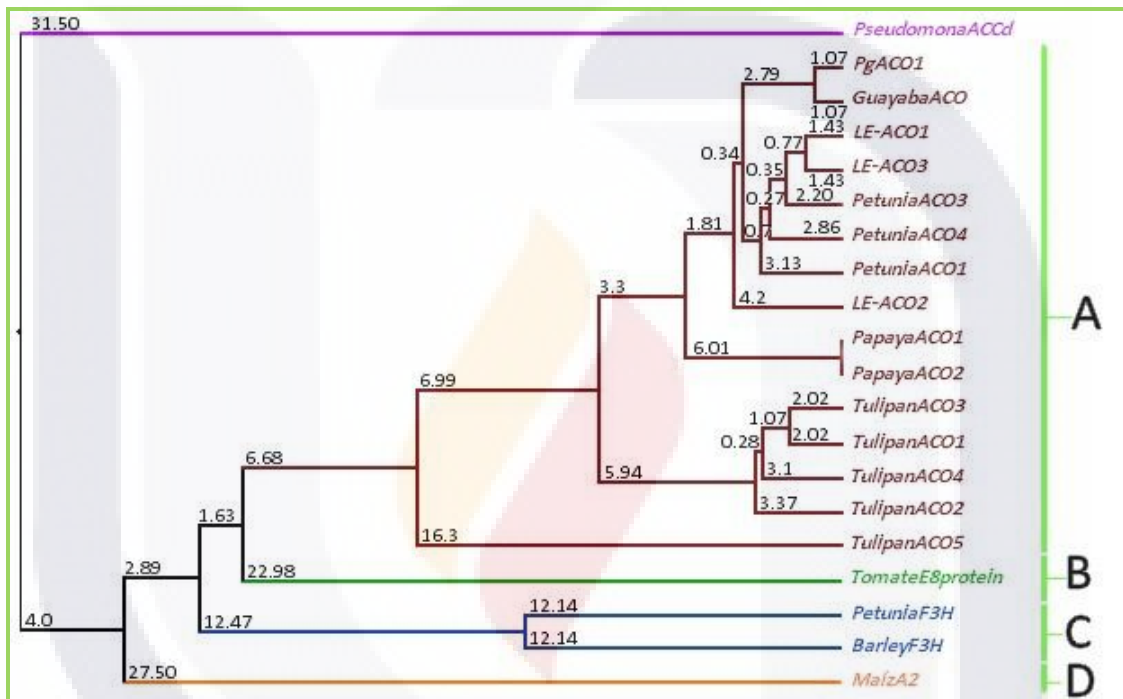


Figura 29. Dendrograma diseñado tomando en cuenta el porcentaje de identidad entre 18 secuencias de aminoácidos correspondientes a la superfamilia Fe(II) y ascorbato, la secuencia putativa *PgACO1* y como control externo una secuencia de aminoácidos correspondiente a una ACC deaminasa. El dendrograma fue generado utilizando el programa *Clustal W2* (Larkin *et al.*, 2007) y las secuencias de aminoácidos descritas en la “metodología”. Las distintas secuencias pertenecientes a la superfamilia Fe(II) y ascorbato se agrupan en cuatro diferentes familias A, B, C y D según (Tang *et al.*, 1993), donde *PgACO1* se incluye dentro de la familia A correspondiente a ACCo. En cada rama se indica la distancia media basada en el porcentaje de identidad de las secuencias.

La secuenciación de *PgEXP1* obtenida a partir de fruto maduro, mostró un fragmento de cDNA de 470 pb, la cual codifica para una proteína putativa de 156 aminoácidos (Figura 30). La comparación de la secuencia putativa *PgEXP1* en la base de datos del NCBI reveló una identidad por encima de 80% con respecto a otras secuencias de aminoácidos correspondientes a expansinas. Además la secuencia contiene dos dominios conservados correspondientes a las superfamilias DPBB_1 y Pollen_alerg_1 (Figura 31), la cual comprende proteínas con actividad de expansinas.

A)	
ACGGCAACTGTACAGCCAGGGCTACGGGACCAACACCGCAGCCCTCAGCACTGCTCTGTTCAACGACGGCTGAGCTGC	80
GGGTCTGCTACGAGATGAAGTGCAACGACGACCCCGAGTGGTCTCCCGGGACCATCACCGTCACCGCCACCAACTT	160
CTGCCCTCGAACAACGCCCTTCCAACGACAACGGCGGCTGGTGAACCCCGCTCCAGCACTTCGATATGGCCGAGC	240
CCGCGTTCCTCAAATTGCCAATACCGAGCCGGGATCGTCCCATTTCTACAGAAGGGTCCCTTGCCTGAAGAAAGGA	320
GGCGTAAGGTTACGATCAACGGCCACTCTACTTCAATCTGGTCTGATCACGAACGTGGCCGGCAGGGGATGTGCA	400
CTCGGTGTCGATCAAGGGCTCAAAGACCGGGTGCAACCATGTCCAGGAAGTGGGGCAGAACTGGCAG	470
B)	
GNLYSQGYGTNTAALSTALFNDGLSCGSCYEMKCNDDPQWCLPGTITVTATNFCPPNNALPNDNGGWCNPPHQHFDMAEP	80
AFLQIAQYRAGIVPISYRRVPCVKKGGVRFINGHSYFNLVLTNVAGAGDVHSVSIKGS KTGWQTM SRN WGQNWQ	156

Figura 30. Secuenciación de *PgEXP1*. A) Parcial secuencia de 470 nucleótidos correspondiente a *PgEXP1*. B) Secuencia de 156 aminoácidos correspondiente a *PgEXP1*.

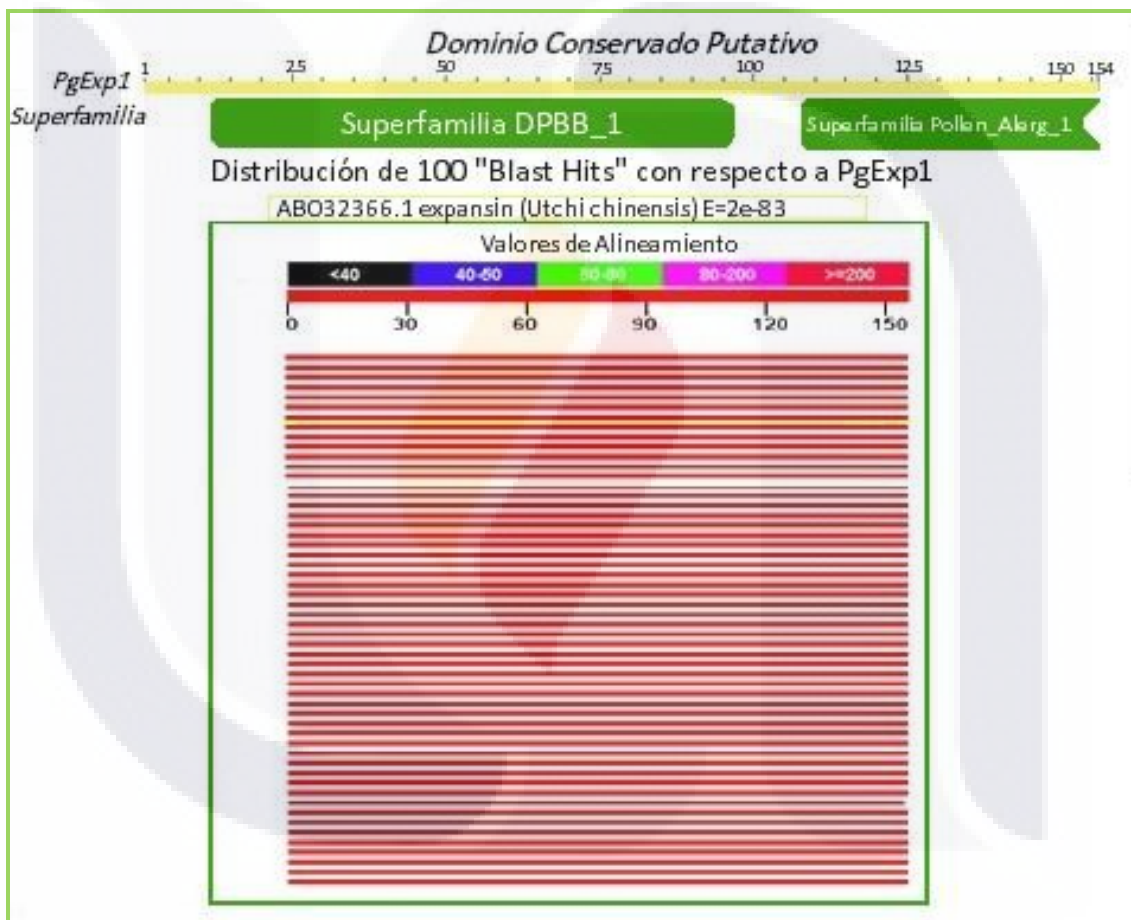


Figura 31. Búsqueda de secuencias similares a *PgExp1* en la base de datos del NCBI utilizando el programa BLASTp (Altschul et al., 1997, 2005). Se muestra la detección de dos dominios conservados de las superfamilias DPBB_1 y Pollen_alerg_1 los cuales son característicos de las proteínas expansinas, así como 100 secuencias similares con una identidad por encima de 80% con respecto a la secuencia putativa *PgExp1*.

La secuenciación de *PgEXP2* obtenida a partir de fruto sobremaduro, mostró un fragmento de cDNA de 466 pb, el cual codifica para una proteína putativa de 154 aminoácidos (Figura 32). La comparación de la secuencia putativa *PgEXP2* contra la base de datos del NCBI reveló una identidad por encima de 80% con respecto a otras secuencias de aminoácidos correspondientes a expansinas. Además la secuencia

contiene dos dominios conservados correspondientes a las superfamilias DPBB_1 y Pollen_alerg_1 (Figura 33), los cuales comprenden proteínas con actividad de expansinas.

A)	
TATGGGACTTGTACAGCCAAGGCTACGGCACCAACACCGCGGCTGAGACTGCCCTTTCAACAACGGCCTGAGCTGC	80
GGGTCGTGCTACGAGATCCGGTGCCTGAACGACCGCAAGTGGTGCTCCCCACGACCATCGTGGTCACCGCCACCAACTT	160
CTGCCCCCAACGACGCGCTCCCCAACGACGCGGGCGGTTGGTGCAACCCCTCTCCACCACTTCGACCTCTCTCAGC	240
CCGTCTCGAGAGCATGGCCCGTACCGAGCTGGCATCGTGCCGGTCGCGTACCGGAGGG TGCCCTGCCAGAGGAGGGGA	320
GGCATAAGGTTACGATCAACGGCCACTCTACTTCAACCTGGTCTCATCAACACGTCGGCGGGGCCGGCAGCTCCA	400
CGCCGTGCCGTGAAAGGGTCGAGGACCGG GTGGATGCCATGTCGAGGA ACTGGGGCCAGAAGT	466
B)	
WDLYSQGYGTNTAALSTALFNGLSCGSCYEIRCVNDRQWCLPTTIVVTATNFCPPNDAPNDAGGWCPPLHHFDLSQP	80
VFESMARYRAGIVPVAYRRVPCQRRGGIRFTINGHSYFNLVITNVGGAGDVHAVSVKGSRTGWMPPMSRNWQGN	155

Figura 32. Secuenciación de *PgEXP2*. A) Parcial secuencia de 466 nucleótidos correspondiente a *PgEXP2*. B) Secuencia de 154 aminoácidos correspondiente a *PgEXP2*.

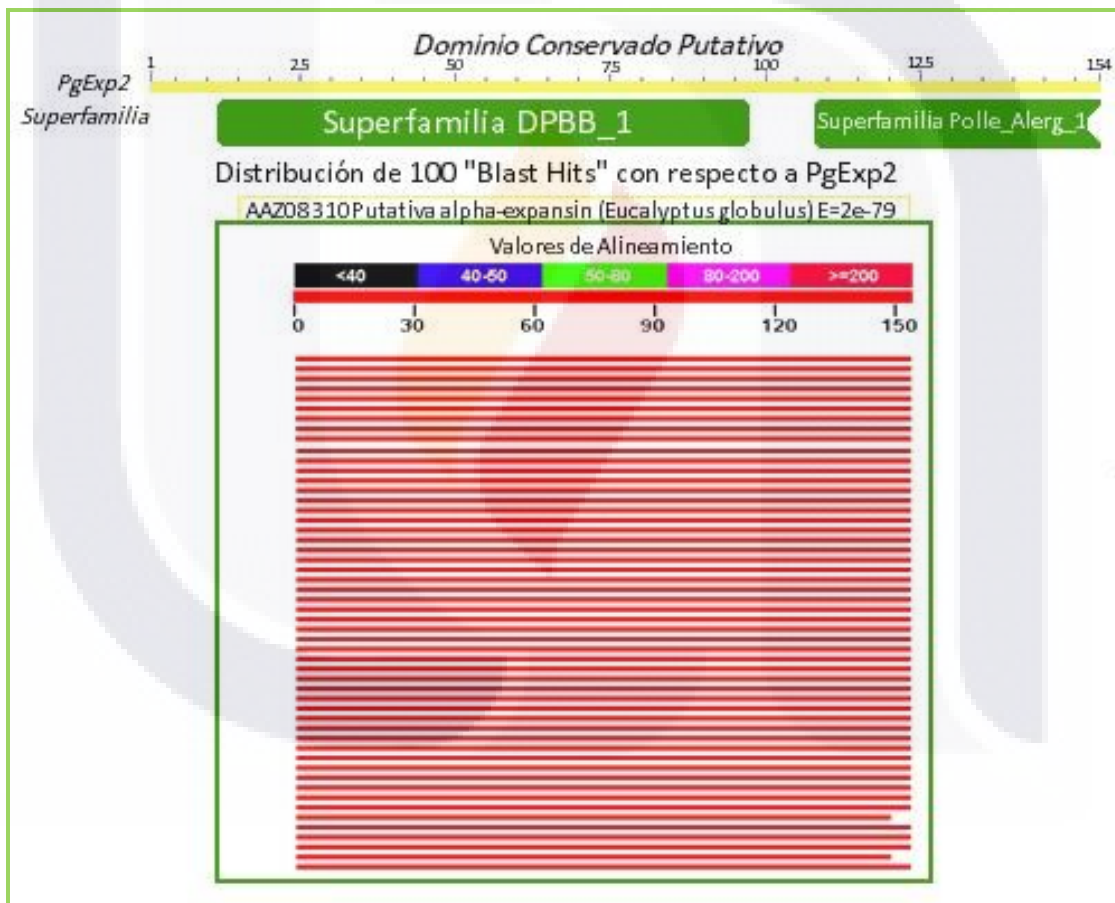


Figura 33. Búsqueda de secuencias similares a *PgExp2* en la base de datos del NCBI utilizando el programa BLASTp (Altschul et al., 1997, 2005). Se muestra la detección de dos putativos dominios conservados de las superfamilias PDBB_1 y Pollen_alerg_1 los cuales son característicos de las proteínas expansinas, así como 100 secuencias similares con una identidad por encima de 80% con respecto a la secuencia putativa *PgExp2*.

La secuenciación de *PgExp3* obtenida a partir de pedúnculo, mostró un fragmento de cDNA de 360 pb, el cual codifica para una proteína putativa de 119 aminoácidos (Figura 34). La comparación de la secuencia putativa *PgEXP3* contra la

base de datos del NCBI reveló una identidad por encima de 80% en su mayoría, con respecto a otras secuencias de aminoácidos correspondientes a expansinas. Además la secuencia contiene dos dominios conservados correspondientes a la superfamilia PDBB_1 y PLN00193 está última clasificada como una región “provisional α -expansina” (Figura 35). Tales dominios comprenden proteínas con actividad de expansinas.

A)	
GGCAACTTGTACAGCCAAGGCTATGGCACCAACACTGCCCTTTGAGCACTGCCCTGTTCAACACGGCCTGAGCTGCGGG	80
TCGTGCTACGAGATCGATGYAACGACGACCCMRGTGGTGCTCCCSGSACCATCATTGTSACMGCCACCAACTTTTGC	160
CCYCCYAAGTWSGCCCTCTCCAATGACAACGGMGGSTGGTGCAACCCWCTCTCCWRCACTTCGATTGGCYGAGCCGGC	240
TTTCTTGCAATTGCCAGTACAGAGCTGGGATTGTCCAGTTTCCTTCAGAAGGGTCCGTGTGGAAGAAAGGAGGCA	320
TAAGTTTACCRTAAACGGCCACTCTACTTCAACTTGGT	360
B)	
ATCTAKAMAPTLPL-ALPCSTRPELRVVLDRXNDDPXWCLPXTIIXXATNFCXXNXALSNDNXXWCNXLPHFDLXEPA	80
FLQIAQYRAGIVPVSFRRVPCVKKGIRFTXNGHSYFNL	119

Figura 34. Secuenciación de *PgEXP3*. A) Parcial secuencia de 360 nucleótidos correspondiente a *PgEXP3*. B) Secuencia de 119 aminoácidos correspondiente a *PgEXP3*.

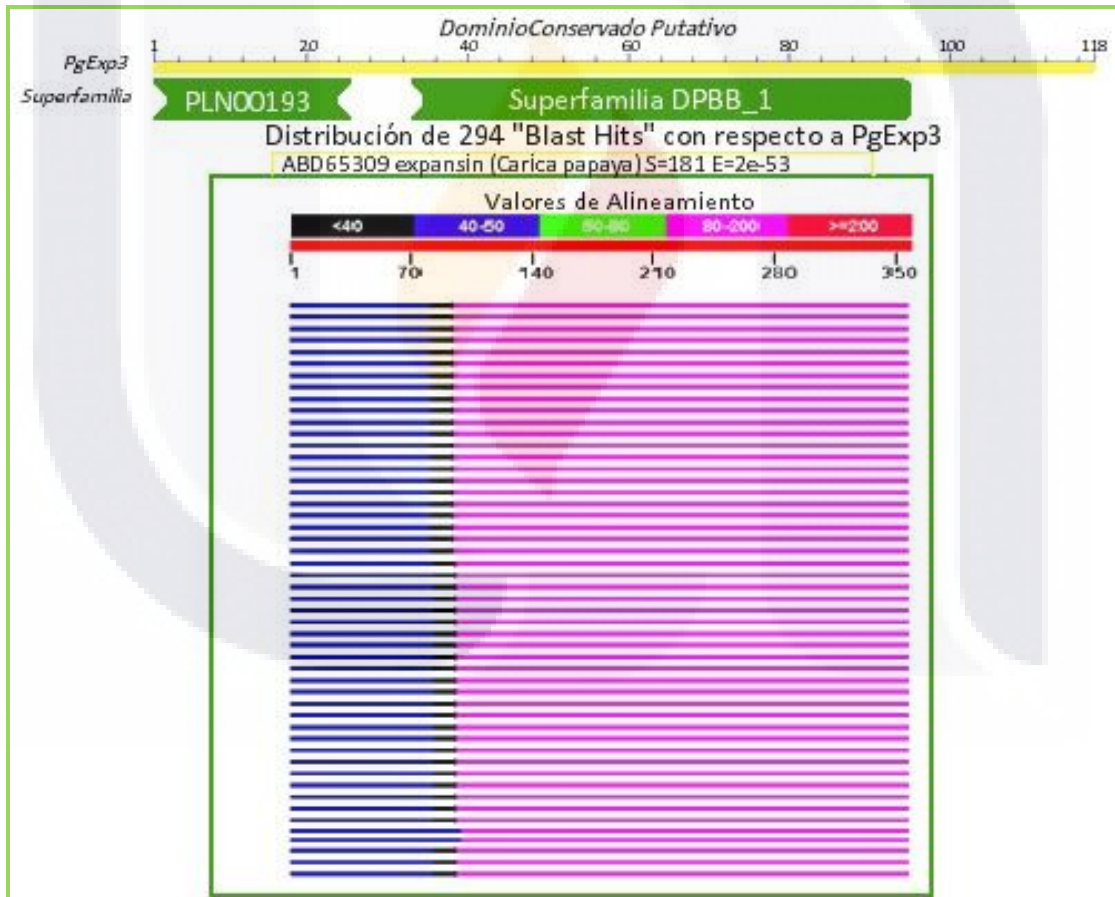


Figura 35. Búsqueda de secuencias similares a *PgExp3* en la base de datos del NCBI utilizando el programa BLASTp (Altschul et al., 1997, 2005). Se muestra la detección de dos putativos dominios conservados, uno de ellos de la superfamilia PDBB_1 y otro correspondiente a PLN00193, ambos presentes en proteínas de expansinas; También se muestran 294 secuencias similares con respecto a la secuencia putativa *PgExp3* todas ellas expansinas.

En un alineamiento múltiple de *PgEXP1*, *PgEXP2* y *PgEXP3* con cuatro secuencias de proteínas de expansinas, se observó la presencia de dos dominios conservados característicos de todas las clases de expansinas, cuyos límites se indican con flechas en color azul y rojo (Figura 36). Comparten más de 40 aminoácidos idénticos con respecto a las cuatro expansinas analizadas. Se encuentran presentes los ocho residuos de cisteína y cuatro residuos de triptófano presentes en la mayoría de las expansinas secuenciadas. También poseen una región (HFD) altamente conservada en la mayoría de las α -expansinas y β -expansinas, la cual está flanqueada por una región de inserción de 10 aminoácidos y un sitio de delección indicado con una flecha verde, las cuales están presentes únicamente en α -expansinas. Este análisis demuestra que debido al tamaño de las secuencias putativas *PgEXP1*, *PgEXP2* y *PgEXP3* que corresponden a 156, 155 y 119 aminoácidos respectivamente, estas son consideradas secuencias parciales que codifica para α -expansinas.



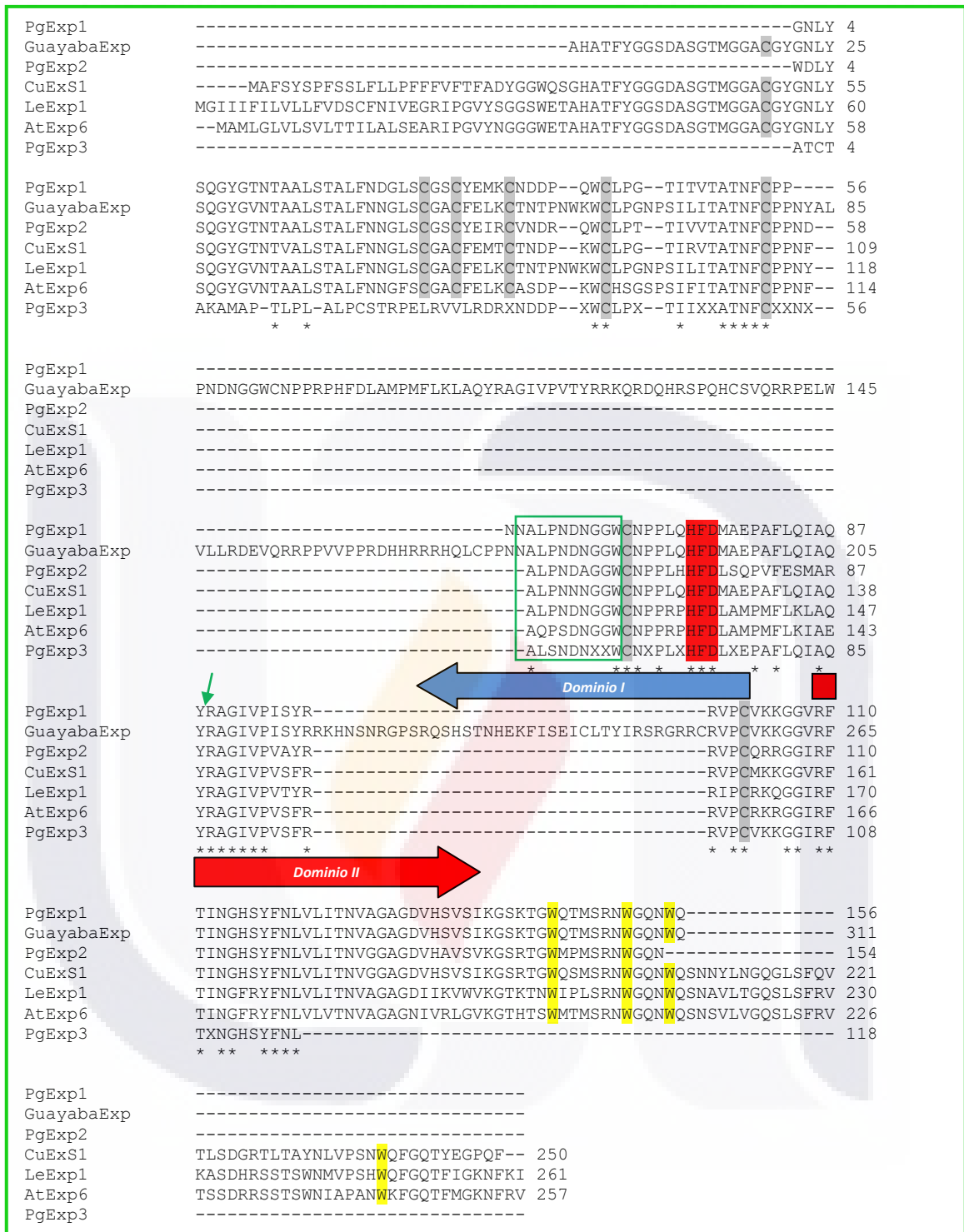


Figura 36. Comparación mediante un alineamiento múltiple de *PgEXP1*, *PgEXP2*, *PgEXP3* y cuatro secuencias de aminoácidos que codifican para proteínas de expansinas (GuayabaExp [No. Acceso FJ44120], jitomate *LeExp1* [No. Acceso AAC63088], *Arabidopsis thaliana* [No. Acceso NP180461] y pepino [No. Acceso AAB37746]), utilizando el programa de alineamiento múltiple *Clustal W2* (Larkin *et al.*, 2007). Los guiones indican “Gaps” que fueron introducidos para maximizar la similitud. Los asteriscos indican secuencias idénticas. En sombra gris se señalan los ocho residuos de cisteína y en amarillo los cuatro residuos de triptófano conservados en todas las expansinas (Brummell *et al.*, 1999; Rose *et al.*, 1997; Shcherban *et al.*, 1995). El límite entre el dominio I y II, está indicado por flechas en azul y rojo

respectivamente. En sombra roja se observan los residuos (HFD) que son conservados en el dominio I de algunas α -expansinas y β -expansinas. En cuadro verde se encuentra una región de inserción y con flecha verde un sitio de delección, ambos característicos de las α -expansinas (Sampedro and Cosgrove, 2005)

El dendograma diseñado a partir del porcentaje de identidad entre 19 secuencias de aminoácidos correspondientes a expansinas descritas en la metodología, incluyendo las tres secuencias *PgEXP1*, *PgEXP2* y *PgEXP3*, mostró cuatro familias. La familia “ α -Expansinas” incluye secuencias correspondientes a α -expansinas involucradas en la maduración de fruto y en crecimiento de hipocotilos. La familia “ β -Expansinas” incluye secuencias correspondientes a β -expansinas de polen de maíz, de *Arabidopsis thaliana* y arroz. La familia “Parecidas α -Expansinas” incluye secuencias de proteínas parecidas a α -expansinas correspondientes a *Arabidopsis thaliana* y arroz. La familia “Parecidas a β -Expansinas” incluye secuencias de proteínas parecidas a β -expansinas correspondientes a *Arabidopsis thaliana* y arroz. Por último como grupo externo se muestra una proteína “Parecida a expansina” correspondiente a *Dictyostelium discoideum* (Figura 37). Las secuencias putativas de *PgEXP1*, *PgEXP2* y *PgEXP3* están dentro de la familia “ α -expansinas”.

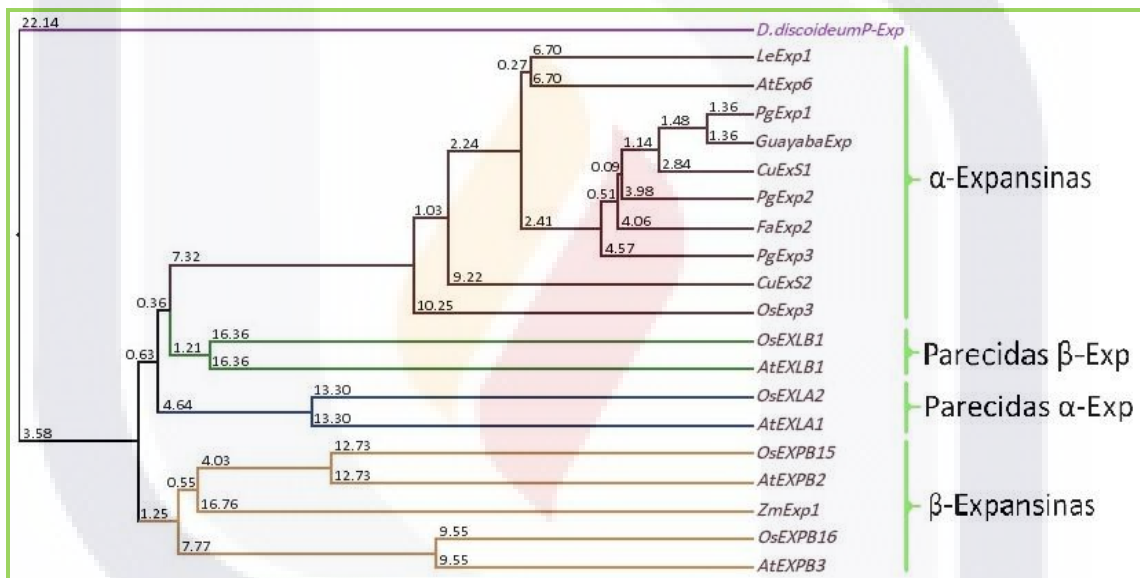


Figura 37. Dendograma diseñado tomando en cuenta el porcentaje de identidad entre 16 secuencias de aminoácidos correspondientes a expansinas, las secuencias putativas *PgEXP1*, *PgEXP2* y *PgEXP3* y como control externo una secuencia de aminoácidos correspondiente a una proteína parecida a expansina. El dendograma fue generado utilizando el programa *Clustal W2* (Larkin *et al.*, 2007) y las secuencias de aminoácidos descritas en la “metodología”. Las distintas secuencias pertenecientes a la superfamilia de expansinas se agrupan en cuatro diferentes familias “ α -expansinas, β -expansinas, parecidas a α -expansinas y parecidas a β -expansinas” según (Sampedro and Cosgrove, 2005), donde *PgEXP1*, *PgEXP2* y *PgEXP3* se incluyen dentro de la familia α -expansina. En cada rama se indica la distancia media basada en el porcentaje de identidad de las secuencias.

9. Hibridación mediante Dot blot

El estudio de expresión en hoja, pedúnculo y diferentes estadios de maduración del fruto de guayaba, mostró diferencias para cada uno de los genes analizados (Figura 38). Para el caso de *PgPG1* su expresión fue localizada en los cinco estadios

del fruto y en pedúnculo, sin embargo su expresión incrementa a partir del fruto verde 2 hasta el fruto maduro teniendo su máximo nivel en este último. En *PgEG1* su expresión se observa en los cinco estadios del fruto y en pedúnculo. Su expresión incrementa a partir del fruto verde 2 hasta el fruto maduro, sin embargo, los niveles de expresión en los tres estadios del fruto permanecen homogéneos. La expresión de *PgEXP2* fue la única localizada en todos los estadios del fruto, en hoja y pedúnculo, la cual, está presente en todo el proceso de maduración del fruto sin embargo, se incrementa a partir del fruto verde 2 hasta el fruto sobre-maduro teniendo su máxima expresión cuando el fruto se encuentra en un estadio maduro. Además en pedúnculo se observa un nivel de expresión muy similar al observado al inicio de la maduración del fruto. Para *PgEXP3* su expresión fue observada en cuatro estadios del fruto y en pedúnculo, estando ausente en el estadio del fruto en transición y en hoja. Su expresión presenta incremento únicamente en el fruto maduro. En *PgACO1* la expresión se localiza únicamente en los estadios del fruto, teniendo los máximos niveles de expresión en el fruto de transición. En *PgACS1* su expresión se observa en los dos primeros estadios de la maduración del fruto y en fruto maduro.

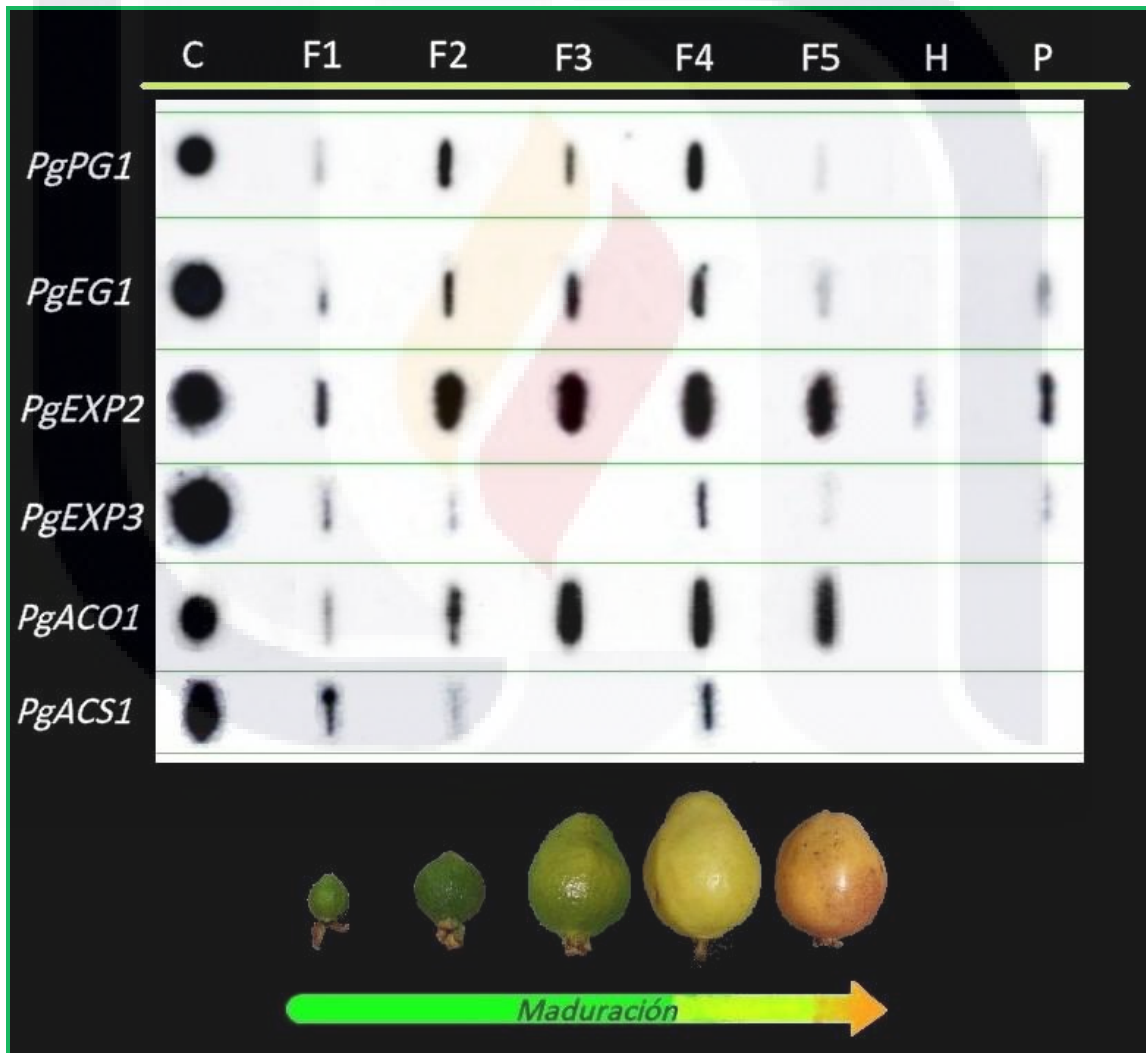


Figura 38. Expresión de *PgPG1*, *PgEG1*, *PgEXP2*, *PgEXP3*, *PgACO1* y *PgACS1* en hoja, pedúnculo y en fruto de guayaba durante su desarrollo y maduración. Columna “C” control positivo; “F1” estadio en fruto verde 1; “F2” estadio en fruto verde 2; “F3” estadio en fruto transición; “F4” estadio en fruto maduro; “F5” estadio en fruto

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

sobremaduro; “H” hoja y “P” pedúnculo. La flecha indica el proceso de maduración del fruto de guayaba. La cantidad de ARN utilizado por cada prueba fue de 3 µg.

Discusión:

Con el fin de estudiar la expresión de genes implicados en la maduración del fruto de guayaba, fue necesario implementar una técnica para la extracción de ARN total con una alta calidad y cantidad, que fuera útil para el Dot-blot y RT-PCR. Sin embargo el tejido del fruto de guayaba presenta diversos compuestos que dificultan la extracción óptima del ARN. En algunos trabajos en donde se han estudiado eventos de la maduración en frutos como en mango (López-Gómez and Gómez-Lim, 1992), frambuesa (Jones *et al.*, 1997) y plátano (Asif M. H. *et al.*, 2000), han presentado dificultades similares. Para solucionar dicho problema se probaron cuatro diferentes estrategias para la obtención de ARN total a partir de tejido del fruto de guayaba, de los cuales únicamente dos protocolos fueron efectivos, sin embargo la calidad y cantidad del ARN resulto deficiente particularmente en los estadios del fruto maduro y sobremaduro, esto pudo haber sido a que los principales cambios bioquímicos en el fruto de guayaba se presentan en el estadio maduro, el cual se caracteriza principalmente por el incremento de polifenoles totales y carotenoides (Marquina *et al.*, 2008), así como el aumento de polisacáridos solubles (Jain *et al.*, 2001), los cuales dificultan la obtención de ARN total ya que muestran propiedades fisicoquímicas similares.

Para solucionar la extracción deficiente de ARN total del fruto de guayaba maduro y sobremaduro debido a la alta contaminación de polisacáridos presentes en las muestras, fue necesario modificar los protocolos implementando un paso adicional de precipitación con Acetato de Sodio al 3 M y Etanol absoluto al 100%, el cual ha sido utilizado en el aislamiento de ARN total del fruto de plátano, (Asif M. H. *et al.*, 2000), con estas modificaciones permite mantener el ARN total en solución mientras los polisacáridos precipitan, eliminando de esta manera la contaminación por polisacáridos, permitiendo mayor calidad y cantidad (Figura 12). Es de suma importancia estandarizar un eficiente protocolo de extracción de ARN total, para garantizar resultados confiables en experimentos posteriores que impliquen un análisis de expresión tales como RT-PCR, hibridaciones, entre otros más.

Una vez diseñados y sintetizados los oligonucleótidos, se verifico su funcionalidad mediante amplificación de los fragmentos de los genes mediante PCR. Para esto, se utilizó como molde ADN genómico de guayaba y los correspondientes oligonucleótidos para cada gen. En todos los casos, existió amplificación de varios fragmentos genómicos (Figura 11), lo cual sugiere que en el genoma de guayaba, los genes que codifican para poligalacturonasa, endo-1,4-β-gluconasa, ACCs, ACCo y expansinas, forman parte de familias multigénicas. El múltiple bandeo observado en todos los genes en estudio puede ser debido a que existen distintas actividades de estos genes asociadas con diferentes fases del desarrollo de las plantas (Atkinson, 1994). Según Hadfield and Bennett (1998), las poligalacturonasas son codificadas por familias multigénicas con miembros diferencialmente regulados en términos de expresión espacial y temporal, como ya se ha reportado en fresa (Redondo-Nevedo *et al.*, 2001), kiwi (Wang *et al.*, 2000) y melón (Hadfield *et al.*, 1998). Para el caso de endo-1,4-β-glucanasa en estudios filogenéticos con diferentes secuencias, tanto en durazno como en jitomate (Libertini *et al.*, 2004; Trainotti *et al.*, 1997; Brummell *et al.*, 1994), se identificó la presencia de una familia multigénica. En expansinas se ha reportado para algunas especies tanto para monocotiledoneas como el arroz, y dicotiledóneas como *Arabidopsis thaliana* y pepino (Brummell *et al.*, 1999; Shcherban

et al., 1995). Jakubowicz and Sadowski (2002), mencionan que la ACCs se encuentra codificada por familias multigénicas en cada especie de planta, por ejemplo en jitomate y en *Arabidopsis thaliana*. Así también, las ACCo pueden estar codificadas por familias multigénicas como en el caso de melón (Lasserre, 1996).

Una vez comprobada la funcionalidad de los oligonucleótidos y estandarizado los factores de amplificación, se realizaron los análisis de expresión mediante RT-PCR en cinco etapas de maduración del fruto, pedúnculo y hoja. Mediante electroforesis se observó la presencia de diferentes bandas correspondientes a posibles poligalacturonasas, esto puede observarse en la (Figura 13) donde se aprecia claramente diferencia de expresión de bandas correspondientes a poligalacturonasas entre fruto maduro y sobremaduro. Para el estadio maduro amplificó una banda de aproximadamente 400 pb, sin embargo para el estadio sobremaduro amplifican dos bandas, una de ellas de aproximadamente 500 pb y otra aproximadamente de 100 pb. En estudios con otros frutos como en fresa (Redondo-Nevado et al., 2001), pera (Hiwasa et al., 2003), melón (Hadfield et al., 1998) y manzana (Atkinson, 1994); los cDNAs reportados correspondientes a poligalacturonasa poseen un tamaño de entre 588 pb a 1790 pb, por lo cual, no fue tomada en cuenta la banda de 100 pb correspondiente al fruto sobremaduro para su posterior secuenciación.

El cDNA amplificado en fruto maduro fue denominado *PgPG1* y su secuenciación generó un pequeño fragmento de 301 pb, con una secuencia putativa de 101 aminoácidos. Con esta última secuencia, se realizó una comparación contra la base de datos del NCBI revelando una identidad por encima del 80% con respecto a otras secuencias de aminoácidos correspondientes a poligalacturonasas en plantas superiores, en su mayoría relacionadas con la maduración del fruto. Todas ellas mostraron un dominio conservado correspondiente a PLN03003 el cual es característico de poligalacturonasas (Figura 19). Al igual que en todas las secuencias de poligalacturonasas eucariontes y procariontes, *PgPG1* posee los cuatro dominios conservados (Figura 20) a los que se les atribuye una actividad catalítica. Dentro del dominio III, se observó una secuencia de octapeptidos rica en glicina (GHGISIGS) altamente conservada en poligalacturonasas de plantas, hongos y bacterias. Además presenta un residuo de histidina el cual se ha visto es esencial para la actividad catalítica y se encuentra presente en todas las poligalacturonasas registradas en la base de datos. Estos resultados coinciden con trabajos realizados en fresa (Redondo-Nevado et al., 2001), manzana (Atkinson, 1994); donde se identificaron cDNAs correspondientes a poligalacturonasas. También en la misma secuencia se observa un sitio N-glicosilación (N-X-T/S), el cual, es característico de proteínas que son secretadas o que forman parte de la superficie celular, además este sitio se encuentra presente en la mayoría de poligalacturonasas en plantas, como en el caso de pera, melón y jitomate (Hiwasa et al., 2003; Hadfield et al., 1998; Kalaitzis et al., 1997). Sin embargo debido al tamaño de la secuencia, fue imposible visualizar algunas regiones como el péptido señal hidrofóbico en el extremo N-terminal, así como seis de ocho residuos de cisteína, los cuales están conservados en todas las poligalacturonasas de plantas superiores, por esta razón *PgPG1* se considera una secuencia parcial.

De acuerdo a nuestro estudio filogenético basado en el porcentaje de identidad entre secuencias de aminoácidos, la secuencia *PgPG1* posee una estrecha identidad con otras poligalacturonasas, particularmente con una secuencia correspondiente a la maduración del fruto de pera (Hiwasa et al., 2003), la cual también es amplificada con los mismos oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo. Ambas secuencias junto con seis más implicadas en la maduración de frutos y en procesos de abscisión formaron un grupo denominado B (Figura 21). También, este análisis apoyado con el estudio de expresión, nos permite descartar que la poligalacturonasa que codifica

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

PgPG1 se encuentre implicada en procesos de dehiscencia u otros procesos localizados en polen y anteras. El hecho de que en nuestro dendograma se separen los grupos A y B con respecto del C, soporta la hipótesis de que *PgPG1* tiene una actividad de endo-poligalacturonasa ya que Kalaitzis *et al.*, (1997) menciona que la separación de poligalacturonasas implicadas en procesos de abscisión y de la maduración del fruto, con respecto de las poligalacturonasas del polen y anteras, puede reflejar una diferencia funcional de la actividad endo y exo enzimática entre esos dos grupos. Esto también concuerda con Hadfield *et al.*, (1998) ya que menciona que el grupo C probablemente se relaciona en términos de especificidad de tejido y función ya que todos se encuentran en anteras y polen y son presumiblemente exopoligalacturonasas. El agrupamiento de tres grupos denominados A, B y C concuerda con otros estudios filogenéticos de poligalacturonasas (Hiwasa *et al.*, 2003; Hadfield *et al.*, 1998).

Una distinción basada en el modo de acción o especificidad del tejido entre las poligalacturonasas miembros del clado B y A no es evidente. Sin embargo, según Hadfield *et al.*, (1998) un rasgo que distingue al clado B de los otros dos cladogramas es la presencia de una pro-secuencia seguida de una secuencia señal hidrofóbica N-terminal. Se sabe que este pro-péptido se escinde de la proteína madura durante el transporte a través del sistema de secreción en camino a la pared celular. El propósito de la pro-secuencia es desconocido pero se cree que su función es mantener a la proteína inactiva hasta que la proteína llegue a su destino final en la célula, o que esté involucrada en una localización subcelular. Sin embargo, esta pro-secuencia no es necesaria para definir los tres grupos, por ello el hecho de que *PgPG1* no presente esta pro-secuencia no influye en los resultados de agrupamiento. También se puede observar gracias a las distancias medias, que los miembros de los grupos A y B parecen estar más estrechamente relacionados unos con otros en comparación con los miembros del clado C, además de que muestran un aparente ancestro común.

La expresión de *PgPG1* observado en fruto maduro de guayaba (Figura 38), sugiere un incremento en la actividad de poligalacturonasas con la concomitante degradación de polisacáridos de pectina y el ablandamiento del fruto. Este patrón de expresión se ha observado en algunos otros frutos como pera (Hiwasa *et al.*, 2003), kiwi (Wang *et al.*, 2000), melón (Hadfield *et al.*, 1998), durazno (Lester *et al.*, 1994) manzana (Atkinson, 1994) y jitomate (Holdsworth *et al.*, 1987). Además concuerda con los estudios bioquímicos realizados por Abu-Bark *et al.*, (2003), donde se observaron cambios en la actividad de enzimas implicadas en la degradación de la pared celular en el fruto de la guayaba, ya que la actividad de las poligalacturonasas se incrementa progresivamente durante la maduración, presentando una alta correlación entre una alta actividad de la enzima y la pérdida de firmeza en el fruto. Esto se ha observado en numerosos frutos, los cuales incluyen al melocotón, pera, pepino, papaya, manzana, pitaya, entre otros, donde la presencia de poligalacturonasas es asociada con altos niveles de pectinas solubles en agua. Por ello, se puede asumir, que *PgPG1* posee una relación en cuanto a su expresión con respecto a la pérdida de firmeza del fruto, al igual que otros genes reportados en melón (Hadfield *et al.*, 1998) y durazno (Lester *et al.*, 1994). No obstante, este gen presenta una alta expresión en el estadio del fruto "F2" el cual no se caracteriza por su ablandamiento. Este resultado no soporta una clara relación entre la expresión y el proceso de ablandamiento del fruto, sin embargo, un patrón semejante fue reportado en fruto de fresa, donde se sugiere, que la actividad de dicha enzima actúan sobre pectinas para generar oligosacarinas biológicamente activas, las cuales participan como señales moleculares potencialmente involucradas en la regulación de algunos procesos metabólicos relacionados a la maduración del fruto (Redondo-Nevado *et al.*, 2001), esta hipótesis soportaría el patrón de expresión de *PgPG1* durante el desarrollo del fruto.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Basados en nuestro estudio de expresión, aunque no se realizaron estudios con la adición o supresión con etileno, se puede sugerir que *PgPG1* puede ser dependiente de etileno, ya que el gen correspondiente a *PgACO1* el cual está implicado en el último paso en la biosíntesis de etileno, muestra una actividad desde la primera hasta la última etapa de desarrollo del fruto. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en fruto de pera donde hubo un incremento en la expresión de genes de poligalacturonasas, los cuales mostraron un incremento en su expresión con el encendido de la biosíntesis de etileno (Hiwasa *et al.*, 2003). También en otros frutos como durazno (Trainotti *et al.*, 2006), kiwi (Zhong-Yan *et al.*, 2000) y jitomate (Sitrit and Bennett, 1998) se ha comprobado que el gen de poligalacturonasa responde rápidamente al etileno, no obstante, es necesario realizar otros estudios con la finalidad de esclarecer la relación entre *PgPG1* y el etileno.

A pesar de que *PgPG1* tiene su máxima expresión en fruto maduro y considerando una alta actividad de poligalacturonasas en esta misma etapa según lo reportado por Jain *et al.*, (2003) no se puede atribuir la regulación del ablandamiento del fruto, únicamente a esta enzima. En otros frutos como jitomate se pensaba que la endo-poligalacturonasa, era la principal enzima responsable en la ruptura de la pectina y la subsiguiente pérdida de firmeza (Dris and Jain, 2004). Así también en melón, el rol de la enzima poligalacturonasa en la degradación de pectina, durante el ablandamiento del fruto, sigue siendo controversial, ya que probablemente la enzima poligalacturonasa, podría no estar involucrada en el proceso de solubilización de la pared celular durante las etapas tempranas de la maduración (Nuñez-Palenius *et al.*, 2008). Por lo tanto la degradación de pectina causada por la actividad de la enzima poligalacturonasa en fruto de guayaba, no puede por sí sola explicar los principales cambios en la textura de la fruta que acompañan la maduración.

Con respecto a endo-1,4- β -glucanasa, el análisis de expresión mediante RT-PCR mostró la presencia de una banda de aproximadamente 1000 pb en estadio sobremaduro, el cual fue denominado *PgEG1* (figura 13). En estudios con otros frutos como en pera (Hiwasa *et al.*, 2003), fresa (Trainotti *et al.*, 1999), jitomate (Brummell *et al.*, 1997, Lashbrook *et al.*, 1994); los cDNAs reportados correspondientes a endo-1,4- β -glucanasa poseen un tamaño de entre 1098 pb a 2502 pb. Debido a que nuestra banda se encuentra dentro de los tamaños reportados, fue secuenciada para su posterior análisis.

La secuenciación parcial de *PgEG1* generó un fragmento de 603 pb, con una secuencia putativa de 201 aminoácidos. La comparación de nuestra secuencia contra la base de datos del NCBI, reveló una identidad por encima del 70% con respecto a otras secuencias de aminoácidos correspondientes a endo-1,4- β -glucanasas, en su mayoría relacionadas con la maduración del fruto. Todas ellas mostraron un dominio conservado correspondiente a la superfamilia Glico_hidro_9 (Figura 23), la cual comprende algunos dominios correspondientes a enzimas con actividad de endo-1,4- β -glucanasas (EC. 3.2.1.4). Al igual que en todas las endo-1,4- β -glucanasas, *PgEG1* posee tres residuos de triptófano conservados. Además presenta un sitio de glicosilación (N-X-T/S), el cual, es característico de proteínas que son secretadas o que forman parte de la superficie celular (Figura 24). No obstante, debido al tamaño de la secuencia no se pudo observar si nuestra secuencia presenta una región C-Terminal la cual posee un dominio de unión a celulosa el cual le atribuye capacidad de degradar la celulosa cristalina (Trainotti *et al.*, 2006). Basados en la comparación de tamaños con otras secuencias de aminoácidos correspondientes a endo-1,4- β -glucanasas, se considera que *PgEG1* es una secuencia parcial.

En un estudio filogenético basado en el porcentaje de identidad entre secuencias de aminoácidos correspondientes a endo-1,4- β -glucanasas, *PgEG1* mostro una estrecha identidad con algunas de ellas, particularmente con dos secuencias implicadas en la maduración del fruto de fresa (Spolaore *et al.*, 2003). Nuestro estudio filogenético arrojó tres diferentes grupos denominados α , β y γ (Figura 25), resultados similares fueron encontrados en el estudio realizado por Libertini *et al.*, (2004) en *Arabidopsis thaliana*. Quince secuencias y dentro de ellas *PgEG1*, formaron el grupo α y β todas ellas implicadas en la maduración del fruto, en procesos de abscisión y elongación. Este análisis, apoyado con el estudio de expresión, nos permite descartar que nuestra secuencia pueda estar implicada en la biosíntesis de celulosa, ya que la secuencias *PgEG1* se encuentra fuera del grupo γ el cual, agrupa endo-1,4- β -glucanasas implicadas en la biosíntesis de dicho polímero. Además la expresión de *PgEG1* muestra su máxima nivel en el estadio maduro del fruto (Figura 38), el cual se caracteriza por la despolimerización de celulosa.

En una clasificación según Trainotti *et al.*, (2006), las endo-1,4- β -glucanasas de plantas superiores, pueden ser divididas en tres grupos. El grupo más común y numeroso, está formado por enzimas de secreción, al cual pertenece nuestra secuencia *PgEG1*. Un segundo grupo que consiste de endo-1,4- β -glucanasas de secreción con un dominio putativo de unión a celulosa en el extremo C-terminal, en él se encuentra la secuencia de jitomate *TomCel8*, *PC-EG2* y *faEG3* y un tercer grupo que consiste de endo-1,4- β -glucanasas que contienen un dominio hidrofóbico transmembranal en el extremo N-terminal el cual corresponde al grupo γ . Esta clasificación, no explica la distinción entre el grupo α y β , sin embargo, basados en las distancias medias del dendograma, si concuerda con la formación de un subgrupo dentro del grupo α , cuyas secuencias poseen el dominio de unión a celulosa el cual, está presente en enzimas capaces de degradar la celulosa cristalina.

PgEG1 se expresó durante todo el desarrollo del fruto mostrando una mayor actividad en fruto maduro (Figura 38), este patrón de expresión se ha observado en fruto de pera (Hiwasa *et al.*, 2003), fresa (Trainotti *et al.*, 1999) y jitomate (Lashbrook *et al.*, 1994). En un estudio bioquímico realizado por Abu-Bark *et al.*, (2003) mencionan que existe un mayor cambio en la actividad de enzimas degradadoras de la pared celular durante el proceso de maduración y una alta actividad de endo-1,4- β -glucanasas. Esto sugiere que *PgEG1* puede estar implicada en el ablandamiento del fruto, no obstante, en otros estudios se ha reportado que las endo-1,4- β -glucanasas están implicadas en procesos del desarrollo tales como la expansión celular en hipocotilos, pistilos y hojas, así como en abscisión de órganos (Trainotti *et al.*, 2006, 1999; Brummell *et al.*, 1997, 1999). En fresa Trainotti *et al.*, (1999), reportó una endo-1,4- β -glucanasa cuya expresión está presente en todos los estadios de fruto, en hojas y plántulas en crecimiento y le atribuyó una función en la hidrólisis de xiloglucanos que recubren las microfibrillas de celulosa, con lo cual hace más susceptible la pared celular a la actividad hidrolítica posterior. El hecho de que *PgEG1* muestre expresión en otros tejidos como pedúnculo descarta la posibilidad de que se trate de una endo-1,4- β -glucanasa específica de la maduración, además permite sugerir que este gen está implicado en otros procesos como la expansión celular o la abscisión del fruto.

Nuestro estudio, no revela ningún tipo de evidencia con respecto a la regulación de *PgEG1*. Se tiene demostrado en jitomate que dos genes de endo-1,4- β -glucanasa son regulados por la acción del etileno (Lashbrook *et al.*, 1994), no obstante en fruto de durazno (Trainotti *et al.*, 2006) y pera (Hiwasa *et al.*, 2003), existe evidencia de que el etileno no influye en la expresión de endo-1,4- β -glucanasas. Por otro lado, en fresa Trainotti *et al.*, (1999), demostró una regulación negativa con la aplicación de auxinas. Esto demuestra una amplia alternativa en cuanto a la regulación de *PgEG1* por lo que

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

es necesario estudios posteriores para esclarecer los factores de regulación de este gen.

El análisis de expresión mediante RT-PCR también nos permitió observar la presencia de tres cDNAs correspondientes α -expansinas *PgEXP1*, *PgEXP2* y *PgEXP3*. En la Figura 15 se puede observar que existe una diferencia en la expresión de cada uno de los cDNAs, debido a que dos de ellos *PgEXP1* y *PgEXP2* amplifican en diferentes estadios del fruto, maduro y sobremaduro respectivamente, y *PgEXP3* en diferente tejido. Las tres secuencias tienen un tamaño de entre 360 pb a 470 pb. En estudios con otras especies como maíz (Wu *et al.*, 2001) se reportan cDNAs con tamaño entre 660 pb y 1029 pb. Con respecto a otros frutos como fresa (Harrison *et al.*, 2001), jitomate (Catalá *et al.*, 2000; Rose *et al.*, 1997) y pepino (Shcherban *et al.*, 1995), las secuencias amplificadas mediante RT-PCR poseen un tamaño entre 71 pb y 540 pb, por esta razón, ninguna de las secuencias fue descartada para su posterior secuenciación.

PgEXP1, *PgEXP2* y *PgEXP3* en una comparación contra la base de datos del NCBI revelaron una identidad por encima del 80% con respecto a otras secuencias de aminoácidos correspondientes a α -expansinas, en su mayoría relacionadas con la maduración del fruto. Todas ellas mostraron un dominio conservado correspondiente a la superfamilia DPBB_1 el cual es característico de todas las expansinas, además las dos primeras secuencias presentan un dominio pequeño conocido como Pollen_alerg_1. *PgEXP3* muestra un dominio denominado PLN00193 el cual también se encuentra presente en expansinas (Figuras 31,33 y 35). Las tres secuencias poseen los dos dominios típicos de expansinas (Sampedro and Cosgrove, 2005; Cosgrove, 2000). El dominio I es el que se encuentra mayormente conservado entre todas las familias de expansinas (Figura 36). Este dominio posee una distante homología a la familia de proteínas glicosido hidrolasa 45, la mayoría de las cuales son β -1,4-D-endoglucanasas de hongos. Si bien las proteínas de α -expansinas y β -expansinas contienen algunos residuos que forman el sitio catalítico de las endoglucanasas de la familia glicosido hidrolasa 45, no se ha detectado actividad hidrolítica, por ello no son consideradas enzimas. Por otro lado, este dominio posee ocho residuos de cisteína conservado entre todas las α -expansinas (Harrison *et al.*, 2001; Brummell *et al.*, 1999; Civello *et al.*, 1999; Rose *et al.*, 1997), los cuales forman una serie de puentes disulfuro intramoleculares que estabilizan la estructura de la proteína (Shcherban *et al.*, 1995). Además dentro de este dominio se distingue la presencia de una inserción y una delección de aproximadamente 10 pb y 12 pb respectivamente, los cuales se encuentran en ambos lados de un motivo conservado (HFD) que es parte del sitio activo de las enzimas de la familia glicosido hidrolasa 45, cuyo motivo se encuentra conservado entre todas las α -expansinas y β -expansinas (Sampedro and Cosgrove, 2005). El dominio II se caracteriza por la presencia de cuatro residuos de triptófano presentes en todas α -expansinas y β -expansinas como por ejemplo en maíz (Wu *et al.*, 2001), fresa (Civello *et al.*, 1999) y jitomate (Rose *et al.*, 1997). Estos cuatro residuos de triptófano potencialmente forman un dominio de unión a celulosa (Civello *et al.*, 1999; Shcherban *et al.*, 1995). Aunque los cDNAs *PgEXP1*, *PgEXP2* y *PgEXP3* por ser secuencias parciales, no tienen el tamaño típico de las expansinas que es de 250-270 aminoácidos, según Sampedro and Cosgrove (2005), poseen las típicas características de la familia de las expansinas. Además poseen las principales características que distinguen a las α -expansinas de otras expansinas. Una característica es la presencia de un motivo (HFD) el cual está ausente de las expansinas parecidas a las α -expansinas y β -expansinas, sin embargo está presente en las β -expansinas. Las α -expansinas pueden ser distinguidas de las β -expansinas por la presencia de una inserción y una delección dentro del dominio I. Además dicha inserción diferencia entre α y β -expansinas en el número de residuos de cisteína ya

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

que dos de ocho residuos característicos de las α -expansinas se encuentran en esta región, por lo que en las β -expansinas solo se encuentran seis residuos de cisteína, esta característica fue observada por Wu *et al.*, (2001) donde se identificó ambas α -expansinas y β -expansinas de maíz. Aunque nuestras secuencias no presentan los ocho residuos de cisteína debido al tamaño parcial de las secuencias se puede afirmar que corresponden a α -expansinas, ya que presentan la inserción y delección característica de esta clase de expansinas.

De acuerdo a nuestro estudio filogenético basado en el porcentaje de identidad entre secuencias de aminoácidos, la secuencias *PgEXP1*, *PgEXP2* y *PgEXP3* poseen una estrecha identidad con otras α -expansinas, particularmente *PgEXP1* con una secuencia correspondiente a una α -expansina de la maduración del fruto de guayaba descrita por Morales-Domínguez *et al.*, (*en prensa*), la cual también es amplificada en fruto maduro. Ambas secuencias junto con *PgEXP2* *PgEXP3* y dos secuencias más de α -expansinas, forman un subgrupo dentro del grupo de las α -expansinas (Figura 37). No obstante, dicho subgrupo no evidencia ninguna relación en cuanto a la especificidad o función de estas expansinas. El hecho de que en nuestro dendograma se separen los grupos α -expansinas, β -expansinas, parecidos a α -expansinas y parecidos a β -expansinas, concuerda con varios trabajos (Choi *et al.*, 2006; Sampedro and Cosgrove, 2005; Kende *et al.*, 2004) donde clasifican a las proteínas de la superfamilia de expansinas en cuatro familias designadas de igual manera que en nuestro dendograma. La clasificación y el análisis de las secuencias nos permiten afirmar que nuestras secuencias pertenecen a la clase de las α -expansinas.

En nuestro estudio de expresión, únicamente se analiza las secuencias *PgEXP2* y *PgEXP3* correspondientes a α -expansinas (figura 38). La actividad de *PgEXP2* está presente en todos los tejidos analizados, sin embargo su máxima expresión se observa en el estadio del fruto maduro. Este patrón de expresión coincide con el patrón de expresión bajo-alto-bajo observado en fruto de fresa (Harrison *et al.*, 2001), donde se reportó una α -expansina cuya expresión está presente en tejido de raíz, hoja, estolón y fruto, en este último presente durante el desarrollo y maduración. Por el contrario, el patrón de expresión observado para *PgEXP3* fue alto-bajo-alto, presente en tejido de fruto y pedúnculo. El cual también está presente en expansinas de fruto de fresa (Harrison *et al.*, 2001). Ambas secuencias participan de manera simultánea en el desarrollo y maduración del fruto de guayaba, esto concuerda con Brummell *et al.*, (1999), quien menciona que al menos seis genes de expansinas son expresados durante el desarrollo del fruto de jitomate y tres de ellos también son expresados en hoja y flores, esto demuestra que la expresión de las expansinas puede ser simultánea o bien altamente específica limitándose a un solo tipo de tejido, ya que por el contrario del patrón de expresión obtenido en este trabajo, en otros frutos como jitomate se observa una expresión específica en los primeros días del desarrollo del fruto (Catalá *et al.*, 2000), y en la maduración (Rose *et al.*, 1997), ambos muestran un patrón de expresión en incremento. *PgEXP2* tiene una alta actividad durante el proceso de maduración, ya que su nivel más alto de expresión se encuentra en el estadio del fruto maduro lo cual sugiere que pueda tener implicaciones directa o indirectamente con el ablandamiento del fruto, no obstante debido a que su actividad se presenta en otros tejidos parece tener una implicación indirecta, esto es, permitiendo el fácil acceso de enzimas modificadoras de la pared celular. Este tipo de función se ha sugerido por Civello *et al.*, (1999) en fresa, donde enzimas como endo-1,4- β -glucanasa puede actuar sinérgicamente junto con las expansinas a efecto de completar el desemblaje de la pared celular. En el caso de *PgEXP3* no se muestra una clara relación de su expresión con alguna función dentro del desarrollo y maduración del fruto.

En nuestro estudio, no podemos reportar la manera en que se regulan las expansinas en fruto de guayaba. En otros frutos como jitomate se ha reportado que las expansinas son reguladas por etileno (Brummell *et al.*, 1999; Rose *et al.*, 1997), por otro lado, no puede descartarse la regulación a partir de señales no-climatéricas como las auxinas como se ha reportado en fresa (Civello *et al.*, 1999).

En un análisis de expresión mediante RT-PCR en cinco etapas de maduración del fruto, pedúnculo y hoja, se observó la presencia de una banda correspondiente a ACCo (Figura 17) amplificada en fruto sobremaduro, la cual se le nombró *PgACO1* y cuyo tamaño aproximado es de 850 pb y que coincide con otros cDNAs de ACCo reportados en frutos como en café (Pereira *et al.*, 2005), papaya (López-Gómez *et al.*, 2004), plátano (López-Gómez *et al.*, 1997) y manzana (Dong J. G. *et al.*, 1992), los cuales poseen un tamaño de entre 800 pb y 1119 pb. Por otro lado, también se observó la presencia de varias bandas correspondientes a posibles ACCs, en su mayoría amplificadas en tejido de pedúnculo, hoja y fruto en estadio verde y sobremaduro. Fue seleccionada y nombrada como *PgACS1*, una banda amplificada en fruto sobremaduro que corresponde a un tamaño aproximado de 410 pb, esto a razón de su tamaño ya que es similar al reportado en fruto de jitomate por Nakatsuka *et al.*, (1998), el cual es amplificado con los oligonucleótidos utilizados en el presente estudio.

La secuenciación de *PgACO1* generó un pequeño fragmento de 320 pb, con una secuencia putativa de 106 aminoácidos. Con esta última secuencia, se realizó una comparación contra la base de datos del NCBI revelando una identidad por encima del 80% con respecto a otras secuencias de aminoácidos correspondientes a ACCo en plantas superiores. Todas ellas mostraron un dominio conservado correspondiente a PLN02299 el cual es característico de este tipo de enzima (Figura 27), perteneciente a la superfamilia de Fe(II) ascorbato dioxigenasa y cuya actividad enzimática requiere como cofactor al Fe(II) y ascorbato, según Momonoi *et al.*, (2007), doce residuos de aminoácidos de ACCo participan en la interacción con esos cofactores (Figura 28). Sin embargo, debido al tamaño de la secuencia *PgACO1*, no se pueden observar ninguno de los doce residuos, pero si se observa dos de ocho regiones bien conservadas entre todas las secuencias de ACCo (Momonoi *et al.*, 2007; Nakatsuka *et al.*, 1998).

De acuerdo a nuestro estudio filogenético basado en el porcentaje de identidad entre secuencias de aminoácidos, *PgACO1* posee una estrecha identidad con ACCo, particularmente con una correspondiente a la maduración del fruto de guayaba enana (Agüero *et al.*, 2003), así como con jitomate, ambas especies climatéricas. En total quince secuencias, todas ellas ACCo pertenecen al grupo A, separadas de otros tres grupos de la superfamilia de Fe(II) y ascorbato (Figura 29). Este agrupamiento concuerda con un estudio filogenético realizado en petunia (Tang *et al.*, 1993).

La expresión de *PgACO1* observado en el desarrollo y maduración del fruto de guayaba (Figura 38), sugiere un aumento en la actividad enzimática de ACCo con la concomitante biosíntesis de etileno. Este patrón de expresión se ha observado en otros frutos climatéricos como papaya (López-Gómez *et al.*, 2004), jitomate (Nakatsuka *et al.*, 1998) y plátano (López-Gómez *et al.*, 1997). Además, *PgACO1* tiene una expresión específica en desarrollo y maduración del fruto, este resultado está apoyado con la alta identidad que presenta la secuencia con otras ACCo específicas de la maduración. Por otro lado, a pesar de que *PgACS1* no logró ser secuenciada, fue sometida a un estudio de expresión en el cual se observó implicada en el primer estadio del desarrollo y maduro del fruto, y ausente en tejido de pedúnculo y hoja, lo cual indica que es específica del fruto. En otros frutos climatéricos como plátano (Liu *et al.*, 1999) y jitomate (Nakatsuka *et al.*, 1998), se ha observado la expresión de genes

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

de ACCs en estadio preclimático y en maduración, lo cual concuerda con la expresión observada en *PgACS1*. En jitomate, la producción de etileno en estado climatérico ha sido demostrado que es debido a la acumulación de dos genes de ACCs y un ACCo (Nakatsuka *et al.*, 1998), lo cual sugiere que nuestras dos secuencias *PgACO1* y *PgACS1* estén implicadas en la producción de etileno específica del desarrollo y maduración del fruto de guayaba. No obstante, el factor regulatorio de ambas secuencias no puede ser determinado en el presente estudio, ya que tomando en cuenta lo que ocurre en fruto de melón donde los multigenes de ACCo y ACCs son diferencialmente activados y expresados debido diversos factores ambientales y del desarrollo (Nuñez-Palenius *et al.*, 2008), el determinar los factores implicados en la expresión de *PgACO1* y *PgACS1* en guayaba requiere de estudios más específicos.

En general la maduración del fruto se caracteriza por ser un proceso complejo, genéticamente programado que culmina en el dramático cambio de color, textura, sabor y aroma del fruto (Alexander and Grierson, 2002). En frutos climatéricos, este proceso es acompañado por una alta producción de etileno, el cual es fundamental para una maduración normal del fruto, además se ha observado que el etileno afecta la transcripción de muchos genes relacionados con la maduración del fruto entre ellos, los implicados en la modificación de la pared celular. El fruto de guayaba es un típico fruto climatérico que se caracteriza por el ablandamiento acelerado, lo cual es atribuido en gran parte a la degradación de la pared celular primaria. Durante el ablandamiento del fruto pectinas y hemicelulosas son solubilizadas y depolimerizadas lo cual contribuye al desdoblamiento de la pared (Hadfield and Bennett, 1998; Rose *et al.*, 1997), en el que están implicadas enzimas como las poligalacturonasas y endo-1,4- β -glucanasas, así como proteínas como las α -expansinas. En algunos frutos climatéricos entre ellos el jitomate, se ha observado un incremento en los niveles de ARNm de poligalacturonasa durante la maduración, lo cual concuerda con la degradación de polisacáridos de pectina y con el ablandamiento del fruto (Giovannoni, 2004; Hadfield and Bennett, 1998). Apoyados con el estudio bioquímico de Jain *et al.*, (2003) donde observa una disminución en contenido total de pectina durante la maduración del fruto de guayaba y lo observado en nuestro estudio de expresión, sugiere que *PgPG1* tienen una relación estrecha, con el ablandamiento del fruto de guayaba durante su maduración. No obstante, estudios en fruto de jitomate donde fue suprimida la expresión del gen de poligalacturonasa, demostró no ser esencial para el ablandamiento del fruto (Giovannoni, 2004). Por otro lado, la hemicelulosa también sufre una substancial depolimerización durante el desarrollo del fruto de guayaba (Jain *et al.*, 2003), lo cual es reflejado en el ablandamiento, por ello, *PgEG1* puede estar relacionado directamente en ese proceso. Esto concuerda con algunos otros frutos como jitomate, melón y pera (Hiwasa *et al.*, 2003). En el caso de las α -expansinas se ha propuesto que el rol y el sitio de acción de estas proteínas es la disrupción de uniones no-covalentes entre hemicelulosas y celulosas (Cosgrove, 2005; Rose *et al.*, 1997), lo cual podría tener un efecto en la exposición de polímeros previamente estructuralmente inaccesibles, a la acción de enzimas de la pared celular relacionadas con la maduración tales como endo-1,4- β -glucanasas entre otras más. Esto sugiere que los genes *PgEXP1*, *PgEXP2*, *PgEXP3*, *PgEG1* y *PgPG1* trabajan de manera cooperativa para el desmontaje de la pared celular durante la maduración del fruto de guayaba.

Conclusión:

Se estandarizó un protocolo para la extracción de ARN total a partir de diferentes órganos y estadios de maduración del fruto de guayaba.

PgPG1 codifica para una poligalacturonasa, y su comparación de aminoácidos putativos indica una identidad por encima del 80% con otras poligalacturonasas. Este gen muestra una alta expresión durante la maduración del fruto.

PgEG1 codifica para una endo-1,4- β -glucanasa, y su comparación de aminoácidos putativos indica una identidad por encima del 70% con otras endo-1,4- β -glucanasas y mostró su máxima expresión en el estadio de fruto maduro.

PgEXP1, *PgEXP2*, *PgEXP3*, codifican para α -expansinas y su comparación de aminoácidos putativos indica una identidad por encima de 90%, 80% y 60% respectivamente, con otras expansinas. Las tres secuencias están implicadas en el proceso de maduración del fruto de guayaba.

PgACO1 codifica para una ACCo y su comparación de aminoácidos putativos indica una identidad por encima del 80% con otras ACCo y mostró un incremento en su expresión conforme madura el fruto de guayaba.

PgACS1 posiblemente codifica para una ACCs, este gen mostró una expresión específica en la maduración del fruto

El presente trabajo es el primer estudio en guayaba, que integra a nivel molecular cinco diferentes genes implicados en la maduración del fruto. Demostrando que todos ellos están implicados en el proceso de maduración del fruto de guayaba. De esta manera y con la integración de estudios bioquímicos y fisiológicos del fruto de guayaba nos permitirá entender mejor el proceso de maduración del fruto de guayaba, lo cual nos abrirá nuevas investigaciones que nos permitan un mejor manejo postcosecha.

Perspectivas:

Debido a la rentabilidad del fruto de guayaba, su cultivo se ha incrementado en gran parte del mundo, sin embargo, su comercialización se dificulta por su acelerada maduración característica de los frutos climatéricos y también por el alto costo en la tecnología del manejo postcosecha. El presente estudio contribuye con un conocimiento básico a nivel molecular sobre la dinámica en el desarrollo del fruto de guayaba, generando con esto, herramientas moleculares que permitan una futura manipulación genética como una alternativa que nos permita retrasar el proceso de maduración de este fruto. Por otro lado, una futura caracterización de mutantes implicados en la maduración en conjunto con estudios adicionales sobre la bioquímica de la maduración, serán esenciales para un completo entendimiento del proceso de maduración en fruto de guayaba.

Anexo 1

Buffer de Lisis de ADN genómico		
Para 50ml		
Tris pH 8.0	1M	5ml
NaCl	5M	14ml
EDTA pH 8.0	0.5M	2ml
CTAB	5%	20ml
B-Mercaptoetanol		0.15ml
H ₂ O destilada		9ml

Buffer de Lisis de RNA		
Para 10ml		
2% SDS	5ml	
0.5% β-Mercaptoetanol	14ml	
EDTA 50mM	2ml	
Tris-Borato pH 7.5	150mM	20ml
H ₂ O destilada	9ml	

20xSSC (Standard Saline Citrate)	
Para 1L	
3M NaCl	175.3g
300mM Citrato Tri-sodio	88.2g
H ₂ O destilada	800ml
Ajustar pH a 7.0 con 1M HCl y aforar a 1L con H ₂ O destilada	

Solución para desnaturalizar el ARN	
37% (w/v) Formaldehido	210μl
Formamida	660μl
10X MOPS	130μl

Anexo 2

1. Protocolo para PCR

- a) Todas las soluciones deben ser descongeladas en hielo, y suavemente agitadas.

Para un total de 20 μ l

Componente	Volumen	Concentración Final
PCR Master Mix (2X)	10 μ l	1X
Forward Primer	1 μ l	0.1-1 μ M
Reverse Primer	1 μ l	0.1-1 μ M
Muestra ADN	2 μ l	10pg-1 μ g
Agua libre de nucleasas	6 μ l	-

- b) Mezclar suavemente la muestra en vortex y centrifugar por 6 segundos para colectar las gotas en el fondo del tubo
- c) Colocar las muestras en el termociclador y comenzar el programa de amplificación correspondiente.

2. Protocolo de Concert™ Plan RNA Reagent

- a) Agregar 0.5ml de Concert Plant Reagent a 4°C para un máximo de 0.1gr de tejido, mezclar en vortex hasta re-suspender la muestra de tejido.
- b) Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Coloque el tubo horizontalmente.
- c) Aclarar la solución por centrifugación durante 2 minutos a 12000rpm a temperatura ambiente. Transferir el sobrenadante a un tubo libre de RNAasa.
- d) Agregar 0.1ml de NaCl 5M y mezclar
- e) Agregar 0.3ml de cloroformo y mezclar por inmersión
- f) Centrifugar la muestra a 4°C durante 10 minutos a 12000rpm y separar las fases. Transferir la fase acuosa.
- g) Agregar a la fase acuosa un volumen igual de alcohol isopropil. Mezclar y dejar reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- h) Centrifugar la muestra durante 10 minutos a 12000rpm a 4°C
- i) Decantar el supernadante sin perder la pastilla. Añadir 1ml de etanol 75%
- j) Centrifugar a temperatura ambiente por 1 minuto a 12000rpm. Eliminar todo el líquido
- k) Agregar 10-30 μ l de agua libre de RNAsas y disolver. Si se observa alguna nubosidad, se centrifuga por 1 minuto a 12000rpm y transferir el sobrenadante

3. Protocolo de TRIzol® Reagent

- a) Homogenizar la muestra de tejido en 1ml de TRIzol® Reagent por cada 50-100mg de tejido. El volumen de la muestra no debe exceder 10% del volumen de TRIzol® Reagent usado para homogenizar.
- b) Remover el material insoluble del homogenizado, mediante centrifugación a 12000rpm durante 10 minutos y coleccionar a un tubo nuevo el sobrenadante.
- c) Incubar la muestra durante 5 minutos a 30°C. Posteriormente agregar 0.2ml de cloroformo por cada 1ml de TRIzol® Reagent. Mezclar vigorosamente el tubo con la mano durante 15 segundos e incubar de 15°C a 30°C durante 2 a 3 minutos. Centrifugar la muestra no más de 12000rpm durante 15 minutos en un rango de temperatura de 2°C a 8°C.
- d) Separar la fase acuosa y colocarla en otro tubo.
- e) Precipitar el RNA utilizando 0.5ml de alcohol isopropílico por cada 1ml de TRIzol® Reagent utilizado. Incubar la muestra de 15°C a 30°C durante 10 minutos y centrifugar a no más de 12000rpm durante 10 minutos a una temperatura entre 2°C y 8°C.
- f) Remover el sobrenadante. Lavar la pastilla de RNA con al menos 1ml de etanol al 75% por cada 1ml de TRIzol® Reagent. Mezclar la muestra y centrifugar a no más de 7500rpm durante 5 minutos a una temperatura de 2°C a 8°C.
- g) Secar la pastilla y re-suspender en agua tratada con DEPC.

4. Protocolo de TRIzol® Reagent with the PureLink™ RNA Mini Kit

- a) Homogenizar la muestra de tejido en 1ml de TRIzol® Reagent por cada 50-100mg de tejido. El volumen de la muestra no debe exceder 10% del volumen de TRIzol® Reagent usado para homogenizar.
- b) Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- c) Agregar 0.2ml de cloroformo por cada 1ml de TRIzol® Reagent. Mezclar vigorosamente el tubo con la mano durante 15 segundos.
- d) Incubar a temperatura ambiente durante 2 a 3 minutos.
- e) Centrifugar la muestra a 12000rpm durante 15 minutos en una temperatura de 4°C.
- f) Separar la fase acuosa y colocarla en otro tubo.
- g) Agregar un volumen de etanol al 70% y mezclar con Vortex.
- h) Transferir 700µl de la muestra a un Spin Cartridge con su respectivo tubo colector.
- i) Centrifugar a 12000rpm durante 15 segundos a temperatura ambiente.
- j) Descartar el líquido resultante y colocar de nuevo el tubo colector.
- k) Repetir los pasos 8-10 hasta que se colecciona toda la muestra.
- l) Agregar 700µl de Buffer de lavado I al Spin Cartridge.
- m) Centrifugar a 12000rpm durante 15 segundos a temperatura ambiente y descartar el líquido resultante.
- n) Agregar 500µl de Buffer de lavado II al Spin Cartridge.

- o) Centrifugar a 12000rpm durante 15 segundos a temperatura ambiente y descartar el líquido resultante.
- p) Repetir los pasos 12-15.
- q) Centrifugar a 12000rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente e insertar el Spin Cartridge en el tubo de recuperación.
- r) Agregar 30µl de Agua libre de RNasa e incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- s) Colectar el RNA centrifugando a 12000rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente.

5. Protocolo para RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)

- a) Colocar en hielo un tubo de 0.2ml libre de nucleasas la siguiente reacción para 12µl en el siguiente orden.

RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)		
Componente	Volumen	Concentración Final
Muestra RNA	Xµl	0.1ng-5µg
Oligo (dT) ₁₈ dNTP Mix 10µM	1µl	-
Agua libre de RNasa	Ajustar a 12µl	-

- a) Mezclar la reacción.
- b) Incubar la reacción a 65°C durante 5 minutos y colocar en hielo.
- c) Agregar en el siguiente orden los siguientes componentes.

RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas)	
Componente	Volumen
5X Reaction Buffer	4µl
RiboLock™ RNasa inhibitor (20u/µl)	1µl
10 mM dNTP Mix	2µl
RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/µl)	1µl

- d) Mezclar y centrifugar el tubo de reacción.
- e) Incubar la reacción a 42°C durante 60 minutos y posteriormente a 70°C durante 5 minutos.
- f) Preparar muestras para PCR. Colocarlas en el termociclador y comenzar el programa de amplificación correspondiente.

6. Protocolo para SuperScript™ First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen™)

- a) Por cada reacción, agregar en un tubo estéril de 0.2ml libre de nucleasas los siguientes componentes.

SuperScript™ First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen™)		
Componente	Volumen	Concentración Final
Muestra RNA	Xµl	1ng-5µg
10mM dNTP Mix	1µl	-
Oligo (dT) ₁₂₋₁₈	1µl	-
Agua libre de RNasa	Ajustar a 10µl	-

- b) Mezclar la reacción.

- c) Incubar la reacción a 65°C durante 5 minutos y colocar en hielo durante 1 minuto.
- d) En otro tubo preparar la siguiente reacción en el orden indicado.

SuperScript™ First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen™)	
Componente	Volumen
10X RT Buffer	2µl
25mM MgCl ₂	4µl
0.1 M DTT	2µl
RNAsaOUT (40 U/µl)	1µl

- e) Mezclar y centrifugar y agregar la mezcla al tubo con RNA.
- f) Incubar la reacción a 42°C durante 2 minutos.
- g) Agregar 1µl de SuperScript™ II RT.
- h) Incubar la reacción a 42°C durante 50 minutos.
- i) Parar la reacción incubando a 70°C durante 15 minutos y colocar en hielo.
- j) Agregar 1µl de RNAsaH e incubar durante 20 minutos a 37°C.
- k) Preparar muestras para PCR. Colocarlas en el termociclador y comenzar el programa de amplificación correspondiente.

7. Protocolo para ThermoScript RT-PCR System for First-Strand cDNA synthesis (Invitrogen™)

- a) Prepara en un tubo de 0.2ml la siguiente reacción para 12µl.

ThermoScript RT-PCR System for First-Strand cDNA synthesis (Invitrogen™)		
Componente	Volumen	Concentración Final
Oligo (dT) ₂₀ 50µM	1µl	
dNTP Mix 10µM	2µl	
Muestra RNA	Xµl	10pg-5µg
Agua libre de RNAsa	Ajustar a 12µl	-

- b) Mezclar la reacción.
- c) Incubar la reacción a 65°C durante 5 minutos y colocar en hielo.
- d) Preparar en un tubo de 0.2ml la reacción de síntesis de cDNA.

ThermoScript RT-PCR System for First-Strand cDNA synthesis (Invitrogen™)		
Componente	Volumen	Concentración Final
5X cDNA Synthesis Buffer	4µl	1X
0.1 M DTT	1µl	1µM
RNAsaOUT™ (40U/µl)	1µl	1µM
DEPC agua	1µl	1pg-1µg
ThermoScript™RT (15units/µl)	1µl	-

- e) Agregar 8µl de la reacción de síntesis de cDNA al tubo con RNA
- f) Incubar la reacción a 55°C durante 60 minutos y posteriormente a 85°C durante 5 minutos.
- g) Agregar 1µl de RNAsa H e incubar durante 20 minutos a 37°C.
- h) Preparar muestras para PCR utilizando 2µl de cDNA. Colocarlas en el termociclador y comenzar el programa de amplificación correspondiente.

8. Protocolo para SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen™)

- a) Por cada reacción, agregar en un tubo estéril de 0.2ml libre de nucleasas los siguientes componentes.

SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen™)		
Componente	Volumen	Concentración Final
Muestra RNA	Xµl	1ng-5µg
10mM dNTP Mix	1µl	-
Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ (500µg/ml)	1µl	-
Agua libre de RNAsa	Ajustar a 12µl	-

- b) Mezclar la reacción.
- c) Incubar la reacción a 65°C durante 5 minutos y colocar en hielo.
- d) Agregar los siguientes componentes.

SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen™)	
Componente	Volumen
5X First-Strand Buffer	4µl
0.1 M DTT	2µl
RNAsaOUT™ (40 U/µl)	1µl

- e) Mezclar y centrifugar y agregar la mezcla al tubo con RNA.
- f) Incubar la reacción a 42°C durante 2 minutos.
- g) Agregar 1µl de SuperScript™ II RT.
- h) Incubar la reacción a 42°C durante 50 minutos.
- i) Parar la reacción incubando a 70°C durante 15 minutos y colocar en hielo.
- j) Agregar 1µl de RNAsaH e incubar durante 20 minutos a 37°C.
- k) Preparar muestras para PCR. Colocarlas en el termociclador y comenzar el programa de amplificación correspondiente.

9. Protocolo para AccessQuick™ RT-PCR System (Promega)

- a) Prepara en un tubo para PCR la siguiente reacción para 20µl.

AccessQuick™ RT-PCR System (Promega)		
Componente	Volumen	Concentración Final
AccessQuick™ Master Mix, 2X	10µl	1X
Primer Forward	1µl	1µM
Primer Reverse	1µl	1µM
Muestra RNA	1-5µl	1pg-1µg
Agua libre de RNAsa	Ajustar a 20µl	-

- b) Mezclar la reacción.
- c) Agregar 1µl de AMV Reverse Transcriptase y mezclar
- d) Incubar la reacción a 45°C durante 45 minutos.
- e) Colocar las muestras en el termociclador y comenzar el programa de amplificación correspondiente.

10. Protocolo para Super Script™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq (Invitrogen™)

a) Prepara en un tubo para PCR la siguiente reacción para 20µl.

AccessQuick™ RT-PCR System (Promega)		
Componente	Volumen	Concentración Final
2X Reaction Mix	10µl	1X
Primer Forward (10µM)	1µl	1µM
Primer Reverse (10µM)	1µl	1µM
Muestra RNA	Xµl	10pg-1µg
RT/Platinum® Taq Mix	1µl	-
Agua libre de RNAsa	Ajustar a 20µl	-

b) Mezclar la reacción.

c) Incubar la reacción a 50°C durante 30 minutos y a 94°C durante 2 minutos.

d) Colocar las muestras en el termociclador y comenzar el programa de amplificación correspondiente.

11. Protocolo para extracción de bandas Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas)

a) Extraer del gel la banda de DNA utilizando una navaja, tratando de llevarse lo menos posible de gel sin el fragmento. Colocar en un tubo y pesar. Si el fragmento es para futura clonación este debe de ser visualizado rápidamente para no dañar con la exposición al UV

b) Agregar un volumen de 3:1 (volumen:peso) de Binding Buffer al fragmento.

c) Incubar la mezcla a 55°C durante 5 minutos o hasta que el gel sea completamente disuelto. (Mezclar el tubo por inversión facilita la disolución).

d) Agregar Silica Powder Suspension al tubo. Para ≤ 2.5µg de DNA agregar 5µl. Para >2.5µg de DNA agregar 2µl

e) Incubar la mezcla durante 5 minutos a 55°C. Mezclar con vortex de vez en cuando. Si es una cantidad mayor a 1.5 ml incrementar la incubación hasta por 15 minutos.

f) Realizar un Spin durante 5 segundos para formar una pastilla. Descartar el sobrenadante cuidadosamente.

g) Agregar 500µl de Washing buffer frío y re-suspender la pastilla

h) Realizar un Spin por 5 segundos y descartar el sobrenadante. Repetir este proceso por tres ocasiones. En el último lavado remover con una pipeta los residuos de agua. Si es necesario dejar secar la pastilla para evitar residuos de etanol en la muestra.

i) Re-suspender la pastilla en un volumen deseado de agua destilada estéril e incubar a 55°C durante 5 minutos (El óptimo volumen de elución es igual al volumen de suspensión de Silica Powder que fue agregado en el paso 4.

j) Realizar un Spin al tubo y remover el sobrenadante evitando la pastilla.

k) Colocar el supernadante en un tubo y repetir la elución con otra alícuota de agua destilada estéril.

l) Para remover el residual silica Powder, realizar un Spin otra vez durante 30 segundos y pasar el supernadante a otro tubo.

12. Protocolo para extracción de bandas Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (ZYMO RESEARCH)

- a) Extraer del gel la banda de DNA utilizando una navaja, tratando de llevarse lo menos posible de gel sin el fragmento. Colocar en un tubo y pesar.
- b) Agregar 3 volúmenes de ADB Buffer respecto al peso del fragmento.
- c) Incubar la mezcla a 55°C durante 5 minutos o hasta que el gel sea completamente disuelto.
- d) Pasar la solución dentro de una columna y colocarla dentro de su respectivo tubo colector.
- e) Centrifugar por 30 segundos. Vaciar el tubo colector si es necesario.
- f) Agregar a la columna 200µl de Buffer de lavado y centrifugar durante 30 segundos.
- g) Repetir el paso anterior
- h) Colocar la columna en un tubo nuevo y agregar 6-10µl de H₂O destilada estéril. Centrifugar y recuperar el DNA.

13. Protocolo para Hibridar Rapid-hyb buffer (GE-Healthcare Amersham)

- a) Precalentar el buffer de hibridación Rapid-hyb(GE-Healthcare) a 70°C
- b) Pre-hibridar la membrana, sumergiéndola completamente durante 15 minutos.
- c) Agregar la sonda marcada y permitir la hibridación con agitación continua durante 1-3hr o toda la noche (opcional) a 70°C.

14. Protocolo para Marcaje Rediprime II Random Prime Labelling System Protocol (GE-Healthcare Amersham)

- a) Diluir el DNA para marcaje a una concentración de 2.5-25ng en 45µl de 10mM Tris HCl pH8.0 1mM EDTA. (TE buffer)
- b) Desnaturalizar el DNA por calentamiento a 95°C durante 5 minutos en baño de agua.
- c) Colocar en hielo durante 5 minutos
- d) Centrifuga para obtener botón de pastilla
- e) Agregar el DNA desnaturalizado al tubo de reacción (Rediprime II)
- f) Agregar 1µl de Redivue [³²P] dCTP y mezclar por pipeteo (La solución de DNA desnaturalizado cambiará a color púrpura cuando la pastilla azul ha sido completamente disuelta)
- g) Incubar a 37°C durante 10 minutos
- h) Parar la reacción adicionando 5µl de 0.2M EDTA.
- i) Desnaturalizar el DNA etiquetado por calentamiento a 95-100°C durante 5 minutos y colocar en hielo durante 5 minutos.
- j) Centrifugar el tubo y mezclar el contenido
- k) Se recomienda que si 25ng de muestra fue usado en la reacción de marcaje, entonces 14µl de esta muestra etiquetada es usada por cada 5ml de buffer de hibridización (Opcional)

Abreviaturas:

ACC	=	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
ACCs	=	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico sintasa
ACCo	=	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidasa
ADN	=	Ácido desoxiribonucleico
Ado Met	=	S-Adenosil Metionina
AP	=	Apiogalacturonanos
ARN	=	Ácido ribonucleico
ARNm	=	Ácido ribonucleico mensajero
CBD	=	Dominio de unión a celulosa por sus siglas en ingles
cDNA	=	Ácido desoxiribonucleico complementario por sus siglas en ingles
EG	=	Endo-1,4- β -glucanasa
EST	=	Secuencias de expresión etiquetadas por sus siglas en ingles
Fe(II)	=	Oxido de hierro II
g	=	Gramos
ha	=	hectárea
Hg	=	Hectogramos
HG	=	Homogalacturano
hr	=	hora
IU	=	Unidades Internacionales por sus siglas en ingles
kb	=	kilo bases
Kcal	=	Kilocalorías
kDa	=	kilodalton
KDO	=	Ácido 2-keto-3-deoxy-D-mano-octulosónico
L	=	Litro
LN	=	Longitud Norte
LO	=	Longitud Oeste
μ g	=	Micro gramo
μ l	=	Micro litro
M	=	Molar
mg	=	miligramo
ml	=	mililitro
N ₂	=	Nitrógeno líquido
NaCl	=	Cloruro de sodio
nm	=	nanómetro

OGAs = Pectinolígalacturonanos

°C = Grados centígrados

P³² = Fósforo 32

Pb = Pares de bases

PCR = Reacción en cadena de la polimerasa por sus siglas en ingles

PG = Polígalacturonasa

pH = potencial de hidrogeno

RGI = Ramnogalacturonanos I

RGII = Ramnogalacturonanos II

rpm = revoluciones por minuto

RT-PCR = Reacción de la Cadena de Polimerasa en Transcripción Reversa por sus siglas en ingles.

SDS = Dodecilsulfato sódico

SSC = Citrato Salino Estandar por sus siglas en ingles.

ton = Toneladas

UPGMA = Agrupamiento pareado no ponderado utilizando media aritmética, por sus siglas en ingles

UV = Luz ultravioleta

W/V = Peso sobre volumen por sus siglas en ingles.

XGA = xilogalacturonanos

Glosario:

Aminoácido Un péptido; los bloques de construcción básicos de las proteínas (o polipéptidos).

Amplificación Producción de muchas copias de DNA a partir de una región maestra de DNA.

Base nucleotídica Base nitrogenada (púrica o pirimidínica) que forma parte de un nucleótido.

Bioinformática Sistemas de información computacional y métodos analíticos aplicados a problemas biológicos como el análisis genómico.

Delección La pérdida de un segmento cromosómico de un complemento cromosómico.

Desnaturalización Separación de dos cadenas de una doble hélice de DNA o pérdida de la estructura de cualquier molécula compleja sin la rotura de los enlaces principales de su cadena.

DNA (ácido desoxirribonucleico) Cadena de nucleótidos enlazados (que tienen desoxirribosa como azúcar). Dos de estas cadenas enrolladas en una doble hélice constituyen la sustancia fundamental de los genes.

DNA complementario (cDNA) DNA sintético transcrito a partir de un RNA específico por acción de la transcriptasa inversa.

Dominio Región de una proteína asociada con una determinada función. Algunas proteínas contienen más de un dominio.

Electroforésis en gel Método de separación molecular en el que el DNA, el RNA o las proteínas se separan en una matriz de gel según su peso molecular, gracias a la aplicación de un campo eléctrico para atraer a las moléculas a través del gel en una dirección determinada.

Enzima Proteína que funciona como catalizador.

Etileno Es la más simple olefina que existe en estado gaseoso bajo condiciones fisiológicas normales, regula muchos aspectos del crecimiento de la planta, desarrollo y senescencia; es biológicamente activo en cantidades traza. Está involucrado en otros procesos tales como respuesta al ataque por patógenos, heridas, así como entre otras causas de estrés bióticas y abióticas.

Familia génica Conjunto de genes en un mismo genoma que descienden del mismo gen ancestral.

Gen Unidad fundamental, física y funcional, de la herencia, que transmite la información de una generación a la siguiente; porción de DNA compuesto de una región que se transcribe y de una secuencia reguladora que hace posible la transcripción.

Gen estructural Parte de un gen que codifica la secuencia aminoacídica de una proteína.

Genética Estudio de los genes.

Genética molecular. Estudio de los procesos moleculares subyacentes a la estructura y la función génicas.

Hibridación mediante sonda Método muy utilizado para detectar macromoléculas específicas: se expone una mezcla de macromoléculas (DNA, RNA o proteínas) a una molécula (sonda) que únicamente se unirá con la molécula buscada.

Hibridar Unir cadenas complementarias de ácidos nucleicos de diferente origen.

Homogalacturonanos (HG): Tipo de pectina compuesta por residuos de ácido D-galacturónico unidos por un enlace $\alpha(1 \rightarrow 4)$.

Ingeniería genética Proceso de producción de DNA modificado *in vitro* y de introducción de este DNA a un organismo hospedador.

Kilobase Mil pares de nucleótidos.

Macromolécula Polímero grande como el DNA, una proteína o un polisacárido.

Maduración de los frutos Es un número de procesos genéticos, bioquímicos y fisiológicos que alteran la firmeza, el color, el sabor, el aroma y la textura del fruto

Metilación Modificación de una molécula por adición de un grupo metilo.

mRNA (RNA mensajero) Molécula de RNA transcrita del DNA de un gen cuya traducción en los ribosomas genera una proteína.

Nucleótido Molécula compuesta por una base nitrogenada, una azúcar y un grupo fosfato; se trata del elemento estructural de los ácidos nucleicos.

Oligonucleótido Pequeño segmento de DNA sintético.

Pectinas Mezcla de polímeros ácidos y neutros muy ramificados. Constituyen el 30% del peso seco de la pared celular primaria de células vegetales. Determinan la porosidad de la pared, y por tanto el grado de disponibilidad de los sustratos de las enzimas implicadas en las modificaciones de la misma.

Polipéptido Cadena de aminoácidos unidos entre sí; una proteína.

Proteína Macromolécula compuesta de una o más cadenas de aminoácidos; es el componente principal de la expresión fenotípica.

Puente de hidrógeno Enlace débil en el que un átomo comparte un electrón con un átomo de hidrógeno; los puentes de hidrógeno son importantes en la especificidad del emparejamiento de las bases de los ácidos nucleicos y en la determinación de la forma de la proteína.

Ramnogalacturonano I (RGI): Tipo de pectina compuesta por ácido D-galacturónico enlazado en $\alpha(1-4)$ con restos de L-ramnosa intercalados con un enlace $\alpha(1-2)$; es decir: $[(1-2)\text{-}\alpha\text{-L-Rha}(1-4)\text{-}\alpha\text{-D-GalU}]_n$, donde n puede ser mayor de 100.

Ramnogalacturonano II (RGII): Tipo de pectina pequeño de estructura muy compleja; formado por ácido D-galacturónico, L-ramnosa, arabinosa, galactosa y pequeñas cantidades de azúcares poco frecuentes como apiosa, o ácido acérico. Es un polímero muy conservado que tiene una estructura básica de al menos 8 residuos de galactosa unidos mediante enlaces $\alpha(1-4)$.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) Método para amplificar *in vitro* un segmento específico de DNA que utiliza dos cebadores que hibridan en los dos extremos del segmento con polaridad opuesta, y que sirven como punto de inicio para replicación exponencial de la secuencia que se encuentra entre ellos en ciclos sucesivos.

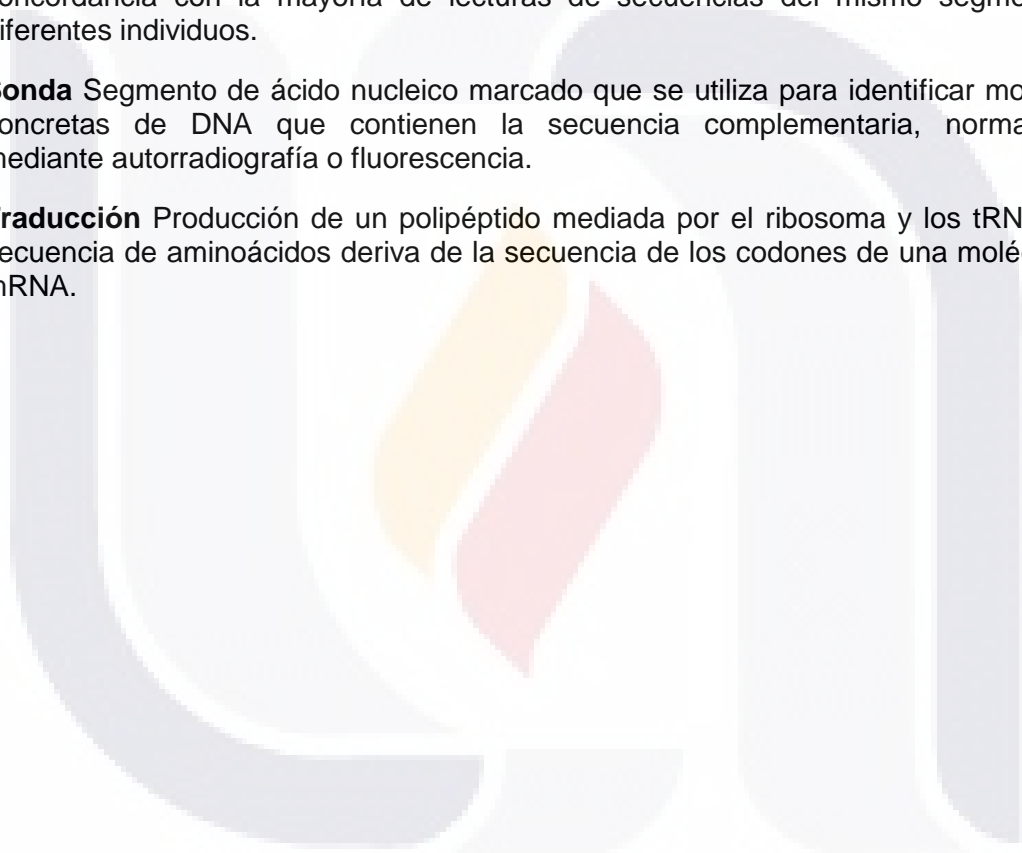
RNA (ácido ribonucleico) Ácido nucleico de cadena simple similar al DNA pero que tiene azúcar ribosa en lugar de desoxirribosa y uracilo en vez de timina como una de sus bases.

RNA antisentido Cadena de RNA que tiene una secuencia complementaria a un transcrito de RNA.

Secuencia consenso Secuencia nucleotídica de un segmento de DNA que está en concordancia con la mayoría de lecturas de secuencias del mismo segmento de diferentes individuos.

Sonda Segmento de ácido nucleico marcado que se utiliza para identificar moléculas concretas de DNA que contienen la secuencia complementaria, normalmente mediante autorradiografía o fluorescencia.

Traducción Producción de un polipéptido mediada por el ribosoma y los tRNA cuya secuencia de aminoácidos deriva de la secuencia de los codones de una molécula de mRNA.



Bibliografía:

- Abreu P. R. C., Almeida M. C., Bernardo R. M., Bernardo L. C., Brito L. C., Garcia E. A. C., Fonseca A. S. y M. Bernardo-Filho. 2006. Guava extract (*Psidium guajava*) alters the labelling of blood constituents with technetium-99m. *Journal of Zhejiang University Science*. Vol. 6: 429-435
- Abu-Bark, A., Abu-Goukh A. y A. Bashir-Hind. 2003. Changes in Pectic Enzymes and Cellulose Activity During Guava Fruit Ripening. *Food Chem*. Vol. 83: 213-218.
- Agüero G., Rodríguez E., Díaz L., Bacallao N. y E. Jiménez. 2003. Aislamiento de un fragmento del ADNc ACC Oxidasa expresado durante la maduración del fruto de Guayaba Enana. *Biotechnología vegetal*. Vol. 3(2): 187-1889.
- Agüero-Chapin G., González-Díaz H., Molina R., Varona-Santos J., Uriarte E. and Y. González-Díaz. 2006. Novel 2D maps and coupling numbers for protein sequences. The first QSAR study of polygalacturonases; isolation and prediction of a novel sequence from *Psidium guajava* L. *FEBS Letters*. Vol. 580: 723-730.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and P. Walter. Molecular Biology of the Cell. 5th edition. Garland Science. Nueva York. 2008.
- Alexander L. and D. Grierson. 2002. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 53(377): 2039-2055.
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W. and D. J. Lipman. 1990. Basic Local Alignment search tool. *Journal Molecular Biology*. Vol. 215: 403-410.
- Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. Vol. 25: 3389-3402.
- Altschul S. F., Wootton J. C., Gertz E. M., Agarwala R., Morgulis A., Schäfer A. A. and Y. Yu. 2005. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS Journal*. Vol. 272: 5101-5109.
- Amin M. N. and V. S. Jaiswal. 1987. Rapid clonal propoagation of guava through *in vitro* shoot proliferation on nodal explants of mature trees. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. Vol. 9(3): 235-243.
- Asif M. H., Dhawan P. and P. Nath. 2000. A Simple Procedure for the Isolation of High Quality RNA from Ripening Banana Fruit. *Plant Molecular Biology Reporter*. Vol. 18: 109-115.
- Atkinson R. G. and R. C. Gardner. 1993. A polygalacturonase gene from kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Plant Physiology*. Vol. 103: 669-670.
- Atkinson R. G. 1994. A cDNA Clone for Endopolygalacturonase from Apple. *Plant Physiology*. Vol. 105: 1437-1438.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Belemtougri R. G., Constantin B., Cognard C., Raymond G. y L. Sawadogo. 2006. Effects of two medicinal plants *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) and *Diospyros mespiliformis* L. (Ebenaceae) leaf extracts on rat skeletal muscle cells in primary culture. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. Vol. 7(1): 56-63.
 - Britsch L., Ruhnau-Brich B. and G. Forkmann. 1992. Molecular Cloning, Sequence Analysis, and in Vitro Expression of Flavanone 3 β -Hydroxylase from *Petunia* hybrid. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 267(8): 5380-5387.
 - Brummell D. A., Lashbrook C. C. y A. B. Bennett. 1994. Plant Endo-1,4- β -D-glucanases. Structure, properties, and physiological function. *Am. Chem. Soc. Symp Ser*. Vol. 566: 100-129.
 - Brummell D. A., Catala C., Lashbrook C. C. and A. B. Bennett. 1997a. A membrane-anchored E-type Endo-1,4- β -glucanase is localized on Golgi and plasma membranes of higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci*. Vol. 94: 4794-4799.
 - Brummell D. A., Bird C. R., Schuch W. and A. B. Bennett. 1997b. An endo-1,4- β -glucanase expressed at high levels in rapidly expanding tissues. *Plant Molecular Biology*. Vol. 33: 87-95.
 - Brummell D. A., Harpster M. H. y P. Dunsmuir. 1999. Differential expression of expansin gene family members during growth and ripening of tomato fruit. *Plant Molecular Biology*. Vol. 39: 161-169.
 - Brummell D. A. and M. H. Harpster. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular biology*. Vol. 47: 311-340.
 - Ceusters J., Londers E., Brijs K., Delcour J. A. and M. P. De Proft. 2008. Glucuronoarabinoxylan Structure in the walls of *Aechmea* leaf chlorenchyma cells is related to wall strength. *Phytochemistry*. Vol. 69(12): 2307-2311.
 - Chen J. Y., Xiao R., Lin H. T., Ou M., Kuang J. F. and W. J. Lu. 2009. Characterization and regulation of multiple forms of endo-1,4- β -glucanase genes during longan fruit growth and development. *Sci. Hortic*. Vol. 122(4): 550-555.
 - Choi D., Cho H-T. and Y. Lee. 2006. Expansins: expanding importance in plant growth and development. *Physiologia Plantarum*. Vol. 126: 511-518.
 - Civello P. M., Powell A. L. T., Sabehat A. and A. D. Bennett. 1999. An Expansin Gene Expressed in Ripening Strawberry fruit. *Plant Physiology*. Vol. 121: 1273-1279.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Collazo-Siqués P., Valverde M. E., Paredes-López O. and F. Guevara-Lara. 2003. Expression of Ripening-Related Genes in Prickly Pear (*Opuntia* sp.) Fruits. *Plant Foods for Human Nutrition*. Vol. 58: 317-326.
 - Cornelius S. B. and J. J. Giovannoni. 2007. Ethylene and Fruit Ripening. *Journal Plant Growth Regulation*. Vol. 26: 143–159.
 - Cosgrove D. J. 2000. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*. Vol. 407: 321-326.
 - Cosgrove D. J. 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. Vol. 6: 850-861.
 - Dris R. and S. M. Jain. Production Practices and Quality Assessment of Food Crops. "Postharvest Treatment and Technology". Kluwer Academic Publisher. Printed in the Netherlands. 2004. Vol. 4: 135-172.
 - Dong J. G., Olson D., Silverstone A. and S. F. Yang. 1992. Sequence of a cDNA Coding for a 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Oxidase Homolog from Apple Fruit. *Plant. Physiol.* Vol. 98: 1530-1531.
 - Fischer Robert L. and A. B. Bennett. 1991. Role of Cell Wall Hidrolases in Fruit Ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* Vol.42: 675-703.
 - Gasic K., Hernández A. y S. S. Korban. 2004. RNA Extraction From Different Apple Tissues Rich in Polyphenols and Polysaccharides for cDNA Library Construction. *Plant Molecular Biology Reporter*. Vol. 22: 437a-437g.
 - Giovannoni J. J., Della-Penna D., Bennett A. B. y R. L. Fischer. 1989. Expression of a Chimeric Polygalacturonase Gene in Transgenic *rin* (Ripening Inhibitor) Tomato Fruit Results in Polyuronide Degradation but not Fruit Softening. *American Society of Plant Physiologists*. Vol. 1: 53-63.
 - Giovannoni J. J. 2004. Genetic Regulation of Fruit Development and Ripening. *The Plant Cell*. Vol. 16: S170-S180.
 - Gorguet B., Schipper D., Lammeren A., Visser R. G. F. and A. W. Heusden. 2009. Ps-2, the gene responsible for functional sterility in tomato, due to non-dehiscent anthers, is the result of a mutation in a novel polygalacturonase gene. *Theor Appl Genet*. Vol. 118: 1199-1209.
 - Griffiths A. J. F., Wessier S. R., Lewontin R. C. y S. B. Carroll. Genética. Novena Edición. McGraw-Hill. 2008. España. Pp. 465.
 - Hadfield K. A. and A. B. Bennett. 1998. Polygalacturonases: Many genes in Search of a Function. *Plant Physiology*. Vol. 117: 337-343.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Hadfield K. A., Rose J. K. C., Yaver D. S., Berka R. M. and A. B. Bennett. 1998. Polygalacturonase Gene Expression in Ripe Melon Fruit Supports a Role for Polygalacturonase in Ripening-Associated Pectin Disassembly. *Plant Physiology*. Vol. 117: 363-373
 - Harrison E. P., McQueen-Mason S. J. and K. Manning. 2001. Expression of six expansin genes in relation to extension activity in developing strawberry fruit. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 52(360): 1437-1446.
 - Hiwasa K., Kinugasa Y., Amano S., Hashimoto A., Nakano R., Inaba A. y Y. Kubo. 2003. Ethylene is required for both the initiation and progression of softening in pear (*Pyrus communis* L.) fruit. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 54(383): 771-779.
 - Hobson G. E. 1968. Cellulase activity during the maturation and ripening of tomato fruit. *Journal Food Sci.* Vol. 33: 588–592.
 - Holdsworth M. J., Schuch W. and D. Grierson. 1987. Nucleotide sequence of an ethylene-related gene from tomato. *Nucleic Acids Research*. Vol. 15(24): 10600.
 - Jakubowicz M. and J. Sadowski. 2002. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate synthase- genes and expression. *Acta Physiologiae Plantarum*. Vol. 24(4): 459-478.
 - Jain N., Dhawan K., Malhotra S. P., Siddiqui S. and R. Singh. 2001. Compositional and enzymatic changes in guava (*Psidium guajava* L.) fruits during ripening. *Acta Physiologiae Plantarum*. Vol. 23 (3): 357-362.
 - Jain N., Dhawan K., Malhotra S. y R. Singh. 2003. Biochemistry of Fruit Ripening of Guava (*Psidium guajava* L.): Compositional and Enzymatic Changes. *Plant Foods for Human Nutrition* Vol. 58: 309–315.
 - Jones C. S., Iannetta P. P. M., Woodhead M., Davies H. V., McNicol R. J. and M. A. Taylor. 1997. The Isolation of RNA from Raspberry (*Rubus idaeus*) Fruit. *Molecular Biotechnology*. Vol. 8: 219-221.
 - John M. E. and M. W. Petersen. 1994. Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) pollen-specific polygalacturonase mRNA: tissue and temporal specificity of its promoter in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology*. Vol. 26(6): 1989-1993.
 - Kalaitzis P., Koehler S.M. and M. L. Tucker. 1995. Cloning of a tomato polygalacturonase expressed in abscission. *Plant Molecular Biology*. Vol. 28: 647–656.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Kalaitzis P., Solomos T. and M. L. Tucker. 1997. Three different polygalacturonases are expressed in tomato leaf and flower abscission, each with a different temporal expression pattern. *Plant Physiology*. Vol. 113: 1303–1308.
 - Kende H., Bradford K. J., Brummell D. A., Cho H., Cosgrove D. J., Fleming A. J., Gehring C., Lee Y., McQueen-Mason S., Rose J. K. and L. Voeselek. 2004. Nomenclature for members of the expansin superfamily of genes and proteins. *Plant Molecular Biology*. Vol. 55: 311-314.
 - Klee H. J. 2002. Control of ethylene-mediated processes in tomato at the level of receptor. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 53(377): 2057-2063.
 - Köck M., Hamilton A. and D. Grierson. 1991. Eth1, a gene involved in ethylene synthesis in tomato. *Plant Molecular Biology*. Vol. 17(1): 141-142.
 - Kutsunai S. Y., Li A., Percival F. W., Laties G. G. and R. E. Christoffersen. 1993. Ripening-Related Polygalacturonase cDNA from Avocado. 1993. *Plant Physiology*. Vol. 103: 289-290.
 - Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J. and D. G. Higgins. 2007. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics*. Vol. 23(21): 2947-2948.
 - Langley K. R., Martin A., Stenning R., Murray A. J., Hobson G. E., Schuch W. W. y C. R. Bird. 1994. Mechanical and optical assessment of the ripening of tomato fruit with reduced polygalacturonase activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Vol. 66: 547–554.
 - Lashbrook C.C., Gonzalez-Bosch C. y A. B. Bennett. 1994. Two divergent endo- β -1,4-glucanase genes exhibit overlapping expression in ripening fruit and abscising flowers. *Plant Cell*. Vol. 6: 1485–1493.
 - Lasserre E., Bouquin T., Hernandez J.A., Bull J., Pech J.C. and C. Balague. 1996. Structure and expression of three genes encoding ACC oxidase homologs from melon (*Cucumis melo* L.). *Mol. Gen. Genet*. Vol. 251(1): 81-90.
 - Lester D. R., Speirs J., Orr G. and C. J. Brady. 1994. Peach (*Prunus persica*) Endopolygalacturonase cDNA Isolation and mRNA Analysis in Melting and Nonmelting Peach Cultivars. *Plant Physiology*. Vol. 105: 225-231.
 - Libertini E., Li Y. y S. J. McQueen-Mason. 2004. Phylogenetic Analysis of the Plant Endo- β -1, 4-Glucanase Gene Family. *Journal Molecular Evolution*. Vol. 58: 506-515.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Liu X., Shiomi S., Kakatsuka A., Kubo Y., Nakamura R. and A. Inaba. 1999. Characterization of Ethylene Biosynthesis Associated with Ripening in Banana Fruit. *Plant Physiology*. Vol. 121: 1257-1265.
 - López-Gómez R. and M. A. Gómez-Lim. 1992. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. *HortScience*. Vol. 27(5): 440-442.
 - López-Gómez R., Campbell A., Jiang-Guo D., Shang-Fa Y. and M. A. Gómez-Lim. 1997. Ethylene biosynthesis in banana fruit: isolation of a genomic clone to ACC oxidase and expression studies. *Plant Science*. Vol. 123: 123-131.
 - López-Gómez R., Morales-Domínguez F., Mendoza A. O. y M. A. Gómez-Lim. 2004. Identification of a Genomic Clone to ACC Oxidase from Papaya (*Carica papaya* L.) and Expression Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 52: 794-800.
 - MacDiarmid C. W. B. and R. C. Gardner. 1993. A cDNA Sequence from kiwifruit Homologous to 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Oxidase. *Plant Physiology*. Vol. 101: 691-692.
 - Marquina V., Araujo L., Ruíz J., Rodríguez-Malaver A. y P. Vit. 2008. Composición química y capacidad antioxidante en fruta, pulpa y mermelada de guayaba (*Psidium guajava* L.). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición*. Vol. 58(1): 98-102.
 - Mason M.G., and J. R. Botella. 1997. Identification and characterization of two 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase cDNAs expressed during papaya (*Carica papaya*) fruit ripening. *Australian Journal Plant Physiology*. Vol. 24: 239–244.
 - Mehar H. A., Punnet D. and P. Nath. 2000. A Simple Procedure for the Isolation of high Quality RNA from Ripening Banana Fruit. *Plant Molecular Biology Reporter*. Vol. 18: 109-115.
 - Miki T., Yamamoto M., Nakagawa H., Ogura N., Mori H., Imaseki H. and T. Sato. 1995. Nucleotide sequence of a cDNA for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from melon fruits. *Plant Physiol*. Vol. 107(1): 297-298.
 - Momonoi K., Shoji K. and K. Yoshida. 2007. Cloning and characterization of ACC oxidase genes from tulip. *Plant Biotechnology*. Vol. 24: 241-246.
 - Montiel-Montoya R. D. y J. J. Avelar-Mejía. Etiología de la Enfermedad “clavo del Guayabo” 5ª Jornadas de Investigación Universidad Autónoma de Zacatecas. 2001.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Moreira L. S. R. and E. X. F. Filho. 2008. An Overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Appl Microbiol Biotechnol.* Vol. 79: 165-178.
 - Murray M. G. and W. F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* Vol. 8: 4321–4325.
 - Mülhardt Cornel. *Molecular Biology and Genomics.* Cuarta edición. ELSEVIER. 2007. U.S.A. Pp. 257.
 - Nakatsuka A., Murachi S., Okunishi H., Shiomi S., Nakano R., Kubo Y. y A. Inaba. 1998. Differential Expression and Internal Feedback Regulation of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Synthase, 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Oxidase, and Ethylene Receptor Genes in Tomato Fruit during Development and Ripening. *Plant Physiology.* Vol. 118: 1295-1305.
 - Nishiyama K., Guis M., Rose J. K. C., Kubo Y., Bennett K. A., Wangjin L., Kato K., Ushijima K., Nakano R., Inaba A., Bouzayen M., Latche A., Pech J. C., y A. B. Bennett. 2007. Ethylene regulation of fruit softening and cell wall disassembly in Charentais melón. *Journal of Experimental Botany.* Vol. 58(6): 1281–1290.
 - Nelson D. L. and M. M. Cox. *Lehninger Principles of Biochemistry.* 4th Edition. W. H. Freeman and Company. New York U.S.A. 2005. Pp. 775.
 - Nuez Fernando. *El cultivo del Tomate.* Primera edición. Editorial Mundi-prensa. 1995. Pp. 642-645.
 - Nuñez-Palenius H. G., Gomez-Lim M., Ochoa-Alejo N., Grumet R., Lester G. y D. J. Cantliffe. 2008. Melon Fruits: Genetic Diversity, Physiology and Biotechnology Features. *Critical Reviews in Biotechnology.* Vol. 19: 13-55.
 - O'Neill M. A., Warrenfeltz D., Kates K., Pellerin P., Doco T., Darvill A. G. and P. Albersheim. 1996. Rhamnogalacturonan-II, a Pectin Polysaccharide in the Wall of Growing Plant Cell, Forms a Dimer That is Covalently Cross-Linked by a Borate Ester. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 271(37): 22923-22930.
 - Padilla-Ramírez, S. J., González-Gaona, E., Esquivel-Villagrana, F., Mercado-Silva E., Hernández-Delgado, S. y N. Mayek-Pérez. 2002. Caracterización de Germoplasma Sobresaliente de Guayabo de la Región Calvillo-Cañones, México. *Revista Fitotecnia Mexicana.* Vol. 25(4): 393-399.
 - Padilla Ramírez J. S., González Gaona E., Perales de la Cruz M. A., Reyes Phillips H. R. y E. S. Osuna Ceja. 2007. Variabilidad del Fruto de la Guayaba (*Psidium guajava* L.) Mexicana. *Avances de Investigación. Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura.* Núm. 31.

- Pereira L. F. P., Galvão R. M., Kobayashi A. K., Cação S. M. B., L. G. E. Vieira. 2005. Ethylene production and acc oxidase gene expression during fruit ripening of *Coffea arabica* L. *Brazilian Journal Plant Physiology*. Vol. 17(3): 283-289.
- Pérez A. S. y D. Cabezas M. 2005. La tecnología del microarreglo en la biología molecular. *Rev. Protección Veg.* Vol. 20(3): 141-149.
- Pérez-Molphe-Balch E., Vázquez-Martínez O., Ojeda-Gómez J. y N. Ochoa-Alejo. 1999. Avances en el cultivo *in vitro* de un genotipo mexicano de guayabo (*Psidium guajava* L. cv. "Media China"). *SCIENTIAE NATURAE*. Vol. 1(2): 53-68.
- Popper Z. A. and S. C. Fry. 2008. Xiloglucan-pectin linkages are formed intraprotoplasmically, contribute to wall-assembly, and remain stable in the cell wall. *Planta*. Vol. 227: 781-794.
- Quijano C. E. and J. A. Pino. 2007. Characterization of volatile compounds in guava (*Psidium guajava* L.) varieties from Colombia. *CENIC Ciencias Químicas*. Vol. 38(3): 367-370.
- Ramírez C. A., Hernández O. V. e I. Martínez M. 1996. Maduración Ovárica en la "Mosca de la Guayaba" *Anastrepha striata* Schiner (Diptera: Tephritidae). *Acta Zoologica Mexicana (Nueva serie)*. No. 069: 105-116.
- Redondo-Nevado J., Moyano E., Medina-Escobar N., Caballero J. L. and J. Muñoz-Blanco. 2001. A fruit-specific and developmentally regulated endopolygalacturonase gene from strawberry (*Fragaria ananassa* cv. Chandler. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 52(362): 1941-1945.
- Robert L. S., Allard S., Gerster J. L., Cass L. and J. Simmonds. 1993. Isolation and characterization of a polygalacturonase gene highly expressed in *Brassica napus* pollen. *Plant Molecular Biology*. Vol. 23(6): 1273-1278.
- Rodríguez-Castro J. P., Narváez-Cuenca C. E. y L. P. Restrepo-Sánchez. 2006. Estudio de la actividad enzimática de la poligalacturonasa en la corteza de la pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*). Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Ciudad Universitaria, Bogotá, Colombia.
- Rose J. N. C., Lee H. H. and A. B. Bennett. 1997. Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 94: 5955-5960.
- Sambrook J. and D. W. Russell. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Tercera edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001. Pp. 1.116- 1.118; 7.46-7.50.
- Sampedro J. and D. Cosgrove. 2005. The expansin superfamily. *Genome Biology*. Vol. 6(12): 242.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Sanabria O. H., García M. A., Díaz H. A. y J. M. Muñoz. 2005. Caracterización morfológica en árboles nativos de guayaba en el Valle del Cauca. *Acta Agronómica*. Vol. 54(4): 1-6.
 - Sanabria O. H., García M. A., Muñoz J. E. y H. A. Díaz. 2006. Caracterización molecular con marcadores RAM de árboles nativos de *Psidium guajava* (guayaba) en el Valle del Cauca. *Acta Agronómica*. Vol. 55(1): 16-23.
 - Schauer N., Zamir D. and A. R. Fernie. 2005. Metabolic profiling of leaves and fruit of wild species tomato: a survey of the *Solanum lycopersicum* complex. Making Sense of the Metabolome Special Issue. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 56 (410): 297–307.
 - Schröder R., Wegrzyn T. F., Bolitho K. M. and R. J. Redgwell. 2004. Mannan Transglycosylase: a novel enzyme activity in cell walls of higher plants. *Planta*. Vol. 219: 590-600.
 - Sharova E. I. 2007. Expansins: Proteins Involved in Cell Wall Softening during Plant Growth and Morphogenesis. *Russian Journal of Plant Physiology*. Vol. 54(6): 713-727.
 - Shcherban T. Y., Shi J., Durachko D. M., Gultinan M. J., McQueen-Mason S. J., Shieh M. and D. J. Cosgrove. 1995. Molecular cloning and sequence analysis of expansins a highly conserved, multigene family of proteins that mediate cell wall extension in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci*. Vol. 92: 9245-9249.
 - Sitrit Y. and A. B. Bennett. 1998. Regulation of tomato fruit Poligalacturonase mRNA Accumulation by Ethylene: A Re-Examination. *Plant Physiology*. Vol. 116: 1145-1150.
 - Somarriba Eduardo. 1988. Guava (*Psidium guajava* L.) tres in a pasture: population model, sensitivity analyses, and applications. *Agroforestry Systems*. Vol. 6: 3-17.
 - Spolaore S., Trainotti L., Pavanello A. and G. Casadoro. 2003. Isolation and promoter analysis of two genes encoding different endo- β -1,4-glucanases in the non-climacteric strawberry. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 54(381): 271-277.
 - Srivastava L. M. Plant Growth and Development. Hormones and Environment. Academic Press, 2002. Pp. 772.
 - Taiz, L. and E. Zeiger. Plant Physiology. 4 ed. Sinauer Associates Publishers, Sunderland. 2006. Pp. 353-361.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Tang X., Wang H., Brandt A. and W. R. Woodson. 1993. Organization and structure of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family from *Petunia Hybrida*. *Plant Molecular Biology*. Vol. 23: 1151-1164.
 - Tebbutt S. J., Rogers H. J. and D. M. Lonsdale. 1994. Characterization of a tobacco gene encoding a pollen-specific polygalacturonase. *Plant Molecular Biology*. Vol. 25(2): 283-297.
 - Trainotti L., Spolaore S., Ferrarese L. and G. Casadoro. 1997. Characterization of *ppEG1*, a member of a multigene family which encodes endo- β -1,4-glucanase in peach. *Plant Molecular Biology*. Vol. 34: 791-801.
 - Trainotti L. Spolaore S., Pavanello A., Baldan B. and G. Casadoro. 1999. A novel E-type endo- β -1,4-glucanase with a putative cellulose-binding domain is highly expressed in ripening strawberry fruit. *Plant Molecular Biology*. Vol. 40: 323-332.
 - Trainotti L., Pavanello A. and D. Zanin. 2006. *PpEG4* is a peach endo- β -1,4-glucanase gene whose expression in climacteric peaches does not follow a climacteric pattern. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 57(3): 589-598.
 - Tucker M.L., Durbin M.L., Clegg M.T. and L. N. Lewis. 1987. Avocado cellulose: nucleotide sequence of a putative full-length cDNA clone and evidence for small gene family. *Plant Molecular Biology*. Vol. 9: 197-203.
 - Van Der Straeten D., Van Wiemeersch L., Goodman H. M. and M. Van Montagu. 1990. Cloning and sequence of two different cDNAs encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate Synthase in tomato. *Proc. Natl Acad Sci USA*. Vol. 87: 4859-4863.
 - Ventosa M., Rodríguez J. L. y O. L. Zerqueira. 2008. Determinación de los principales carotenoides de la guayaba (*Psidium guajava* L.). *Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Vol. 18(1): 1-4.
 - Vicken J. P., Schols H. A., Oomen R., McCann M. C., Ulvskov P., Voragen A. G. and R. G. Visser. 2003. If Homogalacturonan Were a Side Chain of Rhamnogalacturonan I. Implications for Cell Wall Architecture. *Plant Physiology*. Vol. 132: 1781-1789.
 - Wang K., Li H. y J. Ecker. 2002. Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks. *The Plant Cell*. S131-S151.
 - Wang X., Replogle A., Davis E. L. and M. G. Mitchum. 2007. The tobacco *Cel7* gene promoter is auxin-responsive and locally induced in nematode feeding sites of heterologous plants. *Molecular Plant Pathology*. Vol. 8(4): 423-436.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Withe P. J. 2002. Recent advances in fruit development and ripening: an overview. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 53(337): 1995-2000.
 - Whitehead M. P., Shieh M. T., Cleveland T. E., Cary J. W. and R. A. Dean. 1995. Isolation and Characterization of Polygalacturonase Genes (*pecA* and *pecB*) from *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 61(9): 3316-3322.
 - Willats W. G., McCartney L., Mackie W. and J. P. Knox. 2001. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*. Vol. 47: 9-27.
 - Wilson Popenoe. Manual Of Tropical And Subtropical Fruits. The Macmillan Company. 1920.
 - Wolf S., Mouille G. and J. Pelloux. 2009. Homogalacturonan Methyl-Esterification and Plant Development. *Molecular Plant*. Vol. 2(5): 851-860.
 - Wu Y., Meeley R. B. and D. J. Cosgrove. 2001. Analysis and expression of the α -Expansin and β -Expansin Gene Families in Maize. *Plant Physiology*. Vol. 126: 222-232.
 - Xuejun L., Shinjiro S., Akira N., Yasutaka K., Reinosuke N. and I. Akitsugu. 1999. Characterization of Ethylene Biosynthesis Associated with Ripening in Banana Fruit. *Plant Physiology*. Vol. 121: 1257-1265.
 - Yang S. F. and N. E. Hoffman. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol*. Vol. 35: 155-89.
 - Yasseen M. Y., Barringer S. A., Schnell R. J. and W. E. Splittstoesser. 1995. *In vitro* shoot proliferation and propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from germinated seedlings. *Plant Cell Reports*. Vol. 14: 525-528.
 - Zainon M. A., Lieng-Hong C. y L. Hamid. 2004. A comparative study on wall degrading enzymes, pectin modifications and softening during ripening of selected tropical fruits. *Plant Science*. Vol. 167: 317-327.
 - Zhang Z., Schwartz S., Wagner L. and W. Miller. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal Comput Biol*. Vol. 7(1-2): 203-214.
 - Zhong-Yan W., MacRae E. A., Wright M. A., Bolitho K. M., Ross G. S. and R. G. Atkinson. 2000. Polygalacturonase gene expression in kiwifruit: relationship to fruit softening and ethylene production. *Plant Molecular Biology*. Vol. 42: 317-328.
 - Zhou Q., Rutland M. W., Teeri T. T. and H. Brumer. 2007. Xyloglucan in cellulose modification. *Cellulose*. Vol. 14: 625-641.

Sitios en Internet:

- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. 2009
<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7651> (17 Noviembre 2010)
- CODEX STAN 215-1999. Codex Alimentarius. NORMA DEL CODEX PARA LA GUAYABA (CODEX STAN 215-1999, EMD. 1-2005).
www.codexalimentarius.net/search/advancedsearch.do (15 Septiembre 2009)
- CONAFOR. Comisión Nacional Forestal. Sistema Nacional de Información Forestal. <http://www.conafor.gob.mx/portal/>
http://148.223.105.188:2222/gif/snif_portal/secciones/usos/UsosPDF.php?especieURL=Psidiumguajava (17 Noviembre 2010)
- EMBL-EBI. European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute. www.ebi.ac.uk/ (17 Enero 2011)
- ExPASy. *Expert Protein Analysis system*. <http://www.expasy.ch/sprot/> (17 Noviembre 2010)
- FAO-FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations [Online Database]. 2010.
<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (5 Diciembre 2010)
- FAO. Food Administration Organization. INPHO. Fichas Técnicas. Productos frescos y procesados. (2006)
www.fao.org/inpho/content/documents/vlibrary/AE620s/Pfrescos/GUAYABA.HTM#VN (20 Noviembre 2010)
- IPNI. International Plant Names Index. 2005
www.ipni.org/ipni/idPlantNameSearch.do?id=211876-2&back_page=%2Fipni%2FeditSimplePlantNameSearch.do%3Ffind_wholeName%3DPsidium%2Bguajava%26output_format%3Dnormal (23 Mayo 2009)
- Malo S. E. and C. W. Campbell. LA GUAYABA. University of Florida IFAS EXTENSION. MIAMI-DADE County.
<http://miami-dade.ifas.ufl.edu/old/programs/tropicalfruit/Publications/LA%20GUAYABA1> (5 Diciembre 2010)
- NCBI. National Center for Biotechnology Information. www.ncbi.nlm.nih.gov (17-Enero-2011)
- NMX-FF-040-SCFI-2002. NORMA MEXICANA PRODUCTOS ALIMENTICIOS NO INDUSTRIALIZADOS PARA CONSUMO HUMANO - FRUTA FRESCA - GUAYABA (*Psidium guajava* L.) – ESPECIFICACIONES (CANCELA A LA NMX-FF- 040-1993-SCFI). NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS.
www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-FF-040-2002. (1 Junio 2009)

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2010.
<http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Paginas/ProductodTemporada.aspx> (19 Noviembre 2010)
 - SDSC. San Diego Supercomputer Center Biology Workbench. 1999. Board of Trustees of the University of Illinois. workbench.sdsc.edu/ (17 Agosto 2010)
 - SIB. Swiss Institute of Bioinformatics. www.isb-sib.ch/index.php (10 Enero 2011)
 - SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2009a.
www.siap.gob.mx/ventanaIM.php?idCat=184&url=w4.siap.gob.mx/AppEstado/Monografias/Monografias2/Guayaba.html (1 Junio 2009)
 - SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2009b.
www.guayaba.gob.mx/index.php?portal=guayaba (9 Junio 2009)
 - SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2009c.
www.siap.gob.mx/ventana.php?idLiga=1042&tipo=1 (1 Junio 2009)
 - Soberón J. R., Quiroga E. N., Sampietro A. R y M. A. Vattuone. 2005. ETILENO.
www.biologia.edu.ar/plantas/reguladores_vegetales_2005/Etileno.htm (9 Junio 2009)
 - USDA. National Nutrient Database for Standard Reference, Release 23 (2010).
www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl (20 Nov 2010)
 - USDA. NRSC. United States Department of Agriculture. Natural Resources Conservation Service. Plant Database [Online Database]. 2009
plants.usda.gov/java/nameSearch (1 Junio 2009)