TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

AISLAMIENTO, CLONACIÓN Y ESTUDIO IN SILICO DE LOS GENES ACCOXIDASA, ACCSINTASA, α EXPANSINA Y ENDOGLUCANASA EN GUAYABA (*Psidiumguajava*L.)

Tesis que presenta
Bióloga Virginia Herrera Martínez

Para obtener el grado de
Maestría en Ciencias área Biotecnología Vegetal

Tutor de tesis
Dr. José Francisco Morales Domínguez

Comité tutorial
Dr. Gustavo Hernández Guzmán
M. en C. Cristina Garcidueñas Piña

Aguascalientes, Ags., Junio 2011

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE AGUASCALIENTES

Centro de Ciencias Básicas

BIOL. VIRGINIA HERRERA MARTÍNEZ
ALUMNO (A) DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN EL ÁREA DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL
P R E S E N T E .

Estimado (a) alumno (a) Herrera:

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, CLONACIÓN Y ESTUDIO IN SILICO DE LOS GENES ACCOXIDASA, ACCSINTASA, a EXPANSINA Y ENDOGLUCANASA EN 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., 3 de junio de 2011
"SE LUMEN PROFERRE"
LA DECANO

M. en C. MARTHA CRISTINA GONZÁLEZ DÍAZ

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE AGUASCALIENTES
CENTRO DE CIENCIAS BASICAS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE AGUASCALIENTES

M en C. Martha Cristina González Díaz
Decano del Centro de Ciencias Básicas
P r e s e n t e:

Por medio de este conducto, le comunico que los miembros del comité tutoral de la alumna **Virginia Herrera Martínez**, estudiante de la Maestría en Ciencias en el área de Biotecnología Vegetal, hemos revisado la versión final del escrito de la tesis "**AISLAMIENTO, CLONACIÓN Y ESTUDIO IN SILICO DE LOS GENES ACCOXIDASA, ACCSINTASA, α EXPANSINA Y ENDOGLUCANASA EN 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 30 de mayo de 2011

M en C Cristina Garcidueñas Piña
Miembro del comité Tutoral

Dr. Gustavo Hernández Guzmán
Miembro del comité Tutoral

Dr. Francisco Morales Domínguez
Tutor responsable

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE AGUASCALIENTES
02 JUN. 2011
CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Francisco Morales Domínguez, tutor de esta tesis, no sólo por la oportunidadde realizar este trabajo, sino por el esfuerzo, dedicación personal y estiradas de orejas a lo largo de estos 3 años, lo que me ha permitido crecer como profesionista y como persona.

Al Dr. Gustavo Hernández Guzmán, asesor de esta tesis, por todas las facilidades otorgadas para llevar a cabo las estancias en el LANGEBIO para la elaboración de los bancos genómicos de guayaba. Por alentarme y dirigirme con optimismo y excelente sentido del humor en el trabajo de laboratorio y por compartir generosamente sus conocimientos conmigo. Un agradecimiento especial a Dalia, su esposa, por las atenciones y ayuda.

A la M. en C. Cristina Garcidueñas Piña, asesora de esta tesis, por compartir conmigo sus conocimientos y su experiencia en laboratorio, y más que todo por su amistad, ánimo incansable, y por los buenos momentos que hemos compartido.

A mis compañeros de laboratorio Isaac y Oscar por los consejos y apoyo en el trabajo de laboratorio.

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes y al CONACyT por la beca otorgada para llevar a cabo estos estudios de postgrado.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

VITI, SABES QUE SIN TI SIMPLEMENTE NADA DE ESTO SERÍA POSIBLE

A MIS PADRES POR DARME LA VIDA Y POR BRINDARME EL APOYO PARA PERSEGUIR SIEMPRE MIS SUEÑOS

A MIS HERMANOS PEDRO, EDGAR, CHELY Y ABEL POR SER UN MOTIVO DE SUPERACIÓN Y UN INCENTIVO PARA NO PERDER EL RUMBO CORRECTO

A MIS GRANDES AMIGAS JESSI, AURORA Y CLAUDIA QUE NUNCA ME HAN DEJADO SOLA Y HAN VIVIDO CONMIGO PENAS Y ALEGRÍAS

Y A MI FAMILIA EN GENERAL, POR SU APOYO Y CARIÑO

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ABREVIATURAS

ACC	=	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
ADN	=	Ácido desoxiribonucleico
ARN	=	Ácido ribonucleico
ARNm	=	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	=	Trifosfato de adenosina
CBD	=	Dominio de unión a celulosa
cDNA	=	Ácido desoxiribonucleico complementario
Da	=	Dalton
kDa	=	Kilodalton
EGs	=	Endoglucanasas
Fe(II)	=	Óxido de hierro II
g	=	Gramos
kb	=	Kilo base
L	=	Litro
LN	=	Latitud Norte
LO	=	Longitud Oeste
µg	=	Microgramos
µl	=	Microlitros
M	=	Molar
mg	=	Miligramos
ml	=	Mililitros
msnm	=	Metros sobre el nivel del mar
NaCl	=	Cloruro de sodio
°C	=	Grado centígrado
pb	=	pares de bases
PCR	=	Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés)
PLP	=	5´fosfato de piridoxal
pH	=	Potencial de hidrógeno
rpm	=	Revoluciones por minuto
SDS	=	Dodecilsulfato sódico
SAM	=	S-adenosil-metionina
ufc	=	Unidades formadoras de colonias
UV	=	Luz ultravioleta
X-gal	=	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

RESUMEN

La guayaba es un fruto climatérico perteneciente a la familia *Myrtaceae.* Su presencia en el mercado ha ido en aumento pues es un fruto apreciado por su agradable sabor y bondades nutricionales. Entre los principales problemas relacionados con su comercialización, se tiene el de las pérdidas por sobremaduración. La maduración de los frutos climatéricos es un proceso que involucra cambios en los que etileno es un factor importante, como el aumento en la respiración del fruto, la concentración de azúcares, el ablandamiento, entre otros. El etileno es una fitohormonasintetizada por dos enzimas clave, la ACCsintasayACCoxidasa, que regulala expresión de otros genes relacionados con la maduración como las α-expansinas y las endoglucanasas que modifican la pared celularproduciendo el ablandamiento del fruto. El estudio de estos genes son el objeto de estudio de este trabajo. La construcción de bancos genómicos de guayaba permitió la identificación y aislamiento de clonas genómicas. La identificación de estos genes se realizó mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), aplicada tanto a los bancos generados como al ADN nuclear. El aislamiento de clonas positivas de estos genes se realizó por medio de minipreparaciones (miniprep) y PCR. El tamaño de los insertos se determinó por digestión doble con endonucleasas de restricción del plásmido purificado. El análisis tipo SouthernBlot para cada gen en los cuatro bancos generados reveló que estos genes están presentes en al menos una copia en cada uno de los bancos genómicos de guayaba.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ÍNDICE

Página

AGRADECIMIENTOS…….. i
DEDICATORIA……... ii
ABREVIATURAS ……. iii
RESUMEN……. iv
ÍNDICE…….. v

1. INTRODUCCIÓN…… 1

2. ANTECEDENTES…… 4

2.1. LA GUAYABA…… 4
2.1.1. Clasificación Taxonómica……... 4
2.1.2. Descripción Morfológica……. 4
2.1.3. Fisiología……... 5
2.1.4. Importancia…….. 5
2.1.5. Pérdidas postcosecha…… 6

2.2. EL PROCESO DE LA MADURACIÓN…….. 6

2.3. EL ETILENO…….. 7

2.4 FRUTOS CLIMATÉRICOS Y NO CLIMATÉRICOS…… 8

2.5. GENES DE ACC SINTASA, ACC OXIDASA, ALFA EXPANSINA Y ENDOGLUCANASA RELACIONADOS CON LA MADURACIÓN…… 9
2.5.1. ACC sintasa……... 9
2.5.2. ACC oxidasa…….. 10
2.5.3. Alfa-expansinas……. 11
2.5.4. Endoglucanasas……. 12

2.6. HERRAMIENTAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR PARA LA MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE ADN…… 12
2.6.1. Digestión Enzimática …… 12
2.6.2. Electroforesis de Ácidos Nucleicos en gel de Agarosa…….. 13
2.6.3. Clonación Molecular…… 13

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

2.6.4. Transformación Genética Bacteriana…… 15
2.6.5. Banco Genómico…….. 16
2.6.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)…… 17
2.6.7. Mapa de Restricción…… 18
2.6.8. Análisis tipo Southernblot……. 18
2.6.9. Secuenciación de Ácidos Nucleicos…… 18

3. JUSTIFICACIÓN……. 19

3.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO…….. 19

3.2. OBJETIVOS…… 19
3.2.1. OBJETIVO GENERAL…… 19
3.2.2. OBJETIVOS PARTICULARES……. 19

4. METODOLOGÍA ……. 21

4.1 MATERIALES Y MÉTODOS…….. 21
4.1.1. Material Vegetal……. 21
4.1.2. Material biológico…….. 21
4.1.3. Extracción de ADN…… 21

4.2. CONSTRUCCIÓN DEL BANCO GENÓMICO DE GUAYABA…... 23
4.2.1. Fraccionamiento del Banco para ligación …… 23
4.2.2. Purificación de Fragmentos……... 24
4.2.3. Reparación de Extremos y Ligación en el Vector de Clonación . 24
4.2.4. Ligación ……. 24
4.2.5. Transformación Genética Bacteriana…… 25
4.2.6. Titulación del Banco Genómico…….. 26
4.2.7. Análisis por Restricción delos BancosGenómicos……... 26

4.3.AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES DE INTERÉS MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)……. 27
4.3.1. Síntesis de Oligonucleótidos…… 27
4.3.2. Condiciones de Amplificación…… 28
4.3.3. Electroforesis…… 28
4.3.4. Secuenciación y Análisis Bioinformático……... 28

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

4.4. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CLONAS GENÓMICAS EN EL BANCO GENÓMICO DE GUAYABA……. 28

4.5. ANÁLISIS TIPO SOUTHERN BLOT DE LOS BANCOS GENÓMICOS…….. 29

4.5.1. Tratamiento del gel……. 29

4.5.2. Transferencia a membrana…… 29

4.5.3. Hibridación…….. 30

5. RESULTADOS…….. 31

5.1. EXTRACCION DE ADN NUCLEAR…….. 31

5.2. BANCOS GENÓMICOS DE GUAYABA……. 31

5.2.1. Titulación de los Bancos……. 31

5.2.2. Análisis por Restricción de los Bancos Genómicos…….. 32

5.3. OBTENCIÓN DE PRODUCTOS DE PCR DE LOS GENES ACC SINTASA, ACC OXIDASA, ALFA EXPANSINA Y ENDOGLUCANASA……... 33

5.3.1. Análisis del Banco Genómico por PCR……. 33

5.3.2. Secuenciación y Análisis Bioinformático…….. 35

5.4. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CLONAS GENÓMICAS. 36

5.5. ANALISIS TIPO SOUTHERN BLOT EN BANCO GENÓMICO….. 38

6. DISCUSIÓN ……. 40

7. CONCLUSIONES……. 44

8. APENDICE …….……. 45

9. GLOSARIO ……. 48

10. BIBLIOGRAFÍA……. 52

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

1. INTRODUCCIÓN

El guayabo pertenece a la familia Myrtaceae (Mirtáceas), al género Psidium L., y a la especie *Psidium guajava* L. (ITIS, 2009). Es un árbol perennifolio de 3 a 10 metros de altura de tallo corto y retorcido con un ciclo vegetativo de 6 a 8 meses. El sistema radical es superficial, extenso y numeroso. Las hojas son de color verde claro a oscuro, ovales, oblongas y oblongas-elípticas de bordes lisos, base obtusa y ápice acuminado. Las flores son hermafroditas y pedicelares, pueden presentarse en grupos de dos a tres flores con cuatro o cinco pétalos ovalados de color blanco. El fruto es una baya esférica globulosa elipsoidal o periforme, de color amarillo-verdoso o amarillo-claro en su madurez cuyo tamaño difiere según la variedad. Su pulpa, de color blanco-amarillento, rosado, amarillo, o naranja. Las semillas pueden ser, triangulares, reniformes, pétreas, comprimidas, de color blanco, amarillo claro o café amarillento (Mata, 1990).

La guayaba nace en América y se distribuye prácticamente en todas las áreas tropicales y subtropicales del mundo. Su origen se ubica en un área comprendida entre México y Perú y fue domesticada hace más de 2000 años. El primer registro de la presencia del guayabo ocurre en Haití en 1526 y se debe al historiador español Gonzalo Fernández de Oviedo y Valdez quien llama al árbol “guayabo” y a su fruto "guayaba manzana". Los nombres comunes varían desde *xalxocot*l en México y *araca-iba* para el árbol y *araca-guaca* en Brasil y *guajava* o *guajavo* en Perú, para el fruto (Gurrola *et al*., 1992).

El cultivo de la guayaba se distribuye en varios estados de la república mexicana, siendo la región de Calvillo, en Aguascalientes, uno de los sitios de producción más importantes, ya que su cultivo representa el 30% de la superficie plantada a nivel nacional (SIAP, 2010). La presencia de la guayaba en el mercado ha ido creciendo en los últimos años lo que ha generado la necesidad de un estudio más detenido sobre su cultivo, producción, procesado, manipulación y logística de transporte y mercadeo, y, sobre todo, el problema de la sobremaduración, que incide en las pérdidas post-cosecha. Estas pérdidas, que se estiman entre el 15 y hasta el 50 por ciento de la producción, propician que el precio del producto permanezca alto por el déficit de suministros al mercado. Estas pérdidas impactan en el medio ambiente favoreciendo el cambio climático, ya que en la alimentos que no se consumen, se utiliza tierra, agua, mano de obra y recursos no renovables, como fertilizantes y energía (FAO, 2011).

La maduración es un proceso que involucra muchos cambios en el fruto estrechamente relacionados. Estos ocurren en varias de sus características, como en el color, que implican una transición de los cloroplastos en cromoplastos; en el sabor, que ocurren como un incremento en la concentración de azúcares, principalmente fructosa y glucosa y en la textura del fruto, debidos a modificaciones en la pared celular (Srivastava, 2002). En muchos de los cambios mencionados la participación del etileno (C_2H_4) es fundamental. Este gas hidrocarbonado de baja densidad, es más ligero que el aire, es inflamable y fácilmente oxidable, y es conocido como la hormona de la maduración de frutos. Su papel de elemento activo dentro del proceso de maduración fue descubierto en

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

1901, por el ruso Dimitry Neljubow en Petrogrado, Rusia, que observó el fenómeno que luego se conocería como "triple respuesta" (Srivastava, 2002).

La síntesis del etileno es inducida por el desarrollo del fruto. Las enzimas fundamentales en este proceso son ACC sintasa y ACC oxidasa. La primera convierte la S-Adenosil metionina en ácido carboxílico 1-aminociclopropano (ACC). Es miembro del grupo de las enzimas PLP-dependientes (requieren de fosfato de piridoxal como cofactor). En su estructura terciaria, el monómero de la enzima contiene 2 dominios: αβα central compuesto por siete hojas beta y nueve alfa hélices, y αβ que consiste en 5 hojas beta y 5 alfa hélices. Está codificada por miembros de una familia multigénica divergente que está regulada diferencialmente en respuesta a diversos factores químicos del desarrollo y ambientales (Taiz & Zeiger, 2002). Ha sido estudiada en las familias: solanaceae, cucurbitaceae, brassicaceae, rosaceae, leguminaseae, musaceae, rutaceae, graminae y en varias especies de plantas ornamentales (Jakubowicz y Sadowski, 2002). *Arabidopsis thaliana* y *Lycopersicon esculentum* son las especies mejor caracterizadas. La segunda cataliza el paso final de la oxidación de ACC a etileno requiriendo Fe++ y ascorbato como cofactores en presencia de luz y oxígeno y por ello pertenece a la familia de las oxigenasas. Se ha estudiado en tomate, melón, kiwi y manzana.

Por otra parte, el etileno promueve la expresión de otros genes como los de las α-expansinas y las endoglucanasas que son enzimas que modifican la pared celular. Las α-expansinas rompen los puentes de hidrógeno de las cadenas de polisacáridos presentes en la pared durante la maduración del fruto (Taiz & Zeiger, 2002). Es una proteína conformada por dos dominios, un amino-terminal con secuencia similar a la familia 45 de las endoglucanasas (EG45-like region) y un carboxi-terminal que hipotéticamente es un dominio de enlace de polisacáridos (Sampedro *et al*., 2006). Se han identificado y aislado expansinas de diferentes plantas y su expresión depende de las características del tejido (Taiz & Zeiger, 2002). Las endo-β-1-4-glucanasas juegan un papel importante en el ablandamiento de los frutos ya que hidrolizan al azar los enlaces l,4-β-D glucosídicos de la celulosa. Pertenecen a una familia multigénica que está dividida en tres grupos, α, β y δ. Los genes del grupo α, han sido identificados en tomate, pera, durazno y fresa (Amita *et al.*, 2008).

Las herramientas utilizadas para el desarrollo del trabajo pertenecen al campo de la biología molecular y fueron las siguientes: a) Digestión Enzimática, parte medular de la tecnología del ADN recombinante, en donde se utilizan enzimas de restricción para reconocer y cortar secuencias específicas de ADN, utilizadas posteriormente en la construcción de genotecas, b) Electroforesis de Ácidos Nucleicos en gel de Agarosa, para la separación de biomoléculas de diferente tamaño, en virtud de su migración diferencial en un campo eléctrico a través de un gel de agarosa (una forma sumamente pura de un polisacárido de galactosa). Para observar los diferentes fragmentos de ADN se tiñeron con bromuro de etidio, que es un colorante fluorescente cuando se ilumina con radiación ultravioleta (Smith, y Wood, 1998), c) Clonación Molecular, para clonar pequeños fragmentos de ADN, llamados vectores que serán insertados en una célula hospedera cuya maquinaria de replicación se encarga de propagar la molécula recombinante. Con esta técnica se generan múltiples copias de una secuencia de ADN. Los vectores de clonación

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

pueden ser plásmidos, fagos, cósmidos, fásmidos, y cromosomas artificiales. Los plásmidos son moléculas circulares de ADN extracromosómico que se encuentran en especies bacterianas y que se pueden replicar de manera independiente del ADN cromosómico. La mayoría de los plásmidos usados en biología molecular contienen el sitio de clonación múltiple dentro el gen de la β-galactosidasa (Galván *et al*., 2009). Los fagos son virus que infectan específicamente bacterias y están constituidos por una cubierta proteica que contiene su material genético. Entre los más estudiados, se tiene el fago lambda (λ) y el fago M13 que contiene ADN de una sola cadena y se replica sin matar a su hospedero (Yilun Wang *et al*, 2003). Los cósmidos son vectores híbridos que combinan las características de los plásmidos y del fago (Sambrook and Russel, 2001). Tienen la habilidad del plásmido para replicarse de manera autónoma y la capacidad de empaquetamiento *in vitro* del cromosoma de λ y son capaces de insertar fragmentos de ADN de 35 a 45 kb (Gómez, 2004). Los fásmidos son vectores que combinan las características de un fago M13 y un plásmido, por tanto están constituidos por el origen de replicación de ambos. Con estos vectores el ADN es empaquetado en viriones por lo que puede aislarse con facilidad para su uso en la secuenciación. Los cromosomas artificiales se desarrollaron para clonar segmentos grandes. En particular, los YAC (Yeast artificial chromosomes), son moléculas de ADN que son capaces de contener insertos de 200 a 500 kb, los BAC (Bacterial artificial chromosones) que tienen capacidad para insertos de 300 kb (Sambrook and Russel, 2001). Los BACs se han convertido en los vectores más frecuentemente utilizados para la preparación of librerías genómicas (Dhillon *et al*., 2007).

Un banco genómico es un conjunto de fragmentos de ADN clonado. Para su construcción se usaron vectores plásmídicos procurando que el tamaño de los fragmentos clonados fuera adecuados para contener secuencias reguladoras y facilitar su discriminación al realizar un mapa de restricción. Seidman (1991) menciona que para cubrir este aspecto es necesario minimizar el número de clonas, y maximizar la eficiencia de clonación utilizando vectores como los basados en el bacteriófago λ. Las librerías genómicas pueden ser amplificadas, replicando cada clona existente en el mismo. Los tiempos de duplicación de las bacterias que conforman el banco pueden variar dependiendo del tipo de vector y del inserto. Se debe tomar en cuenta que, con la amplificación, algunos genes pueden estar pobremente representados (Seidman, 1991). En las librerías genómicas casi siempre los escrutinios se realizan por hibridación, usando una sonda radioactiva de ácido nucleico (Klug *et al*., 2006). La identificación y aislamiento de clonas dentro de un banco genómico, se lleva a cabo mediante sondas, que son secuencias marcadas de ADN o ARN, y que son complementarias a una parte de una secuencia clonada. Las sondas pueden provenir de diversas fuentes, el único requisito es que se generen de regiones conservadas (Klug *et al*., 2006).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

2. ANTECEDENTES

2.1. LA GUAYABA

2.1.1. Clasificación Taxonómica

La guayaba (*Psidium guajava* L.) pertenece al Reino Plantae (plantas), Subreino Tracheobionta (plantas vasculares), División Magnoliophyta (plantas con flores), Clase Magnoliopsida (dicotiledóneas), Subclase Rosidae, Orden Myrtales, Familia Myrtaceae (Mirtáceas), Género Psidium L., Especie *Psidium guajava* L. (ITIS, 2009).

2.1.2. Descripción Morfológica

El guayabo es un árbol bajo o arbusto arborescente de 3 a 10 metros de altura, su tallo es corto y retorcido y ramifica libremente cerca del suelo. Su color varía entre verde cremoso, café verdoso, café ligero y café oscuro rojizo, con capas de corteza (corcho) que se desprenden anualmente. El sistema radical del guayabo es muy superficial (0-40 cm), extenso y numeroso, aunque el tamaño de las raíces no es constante ya que varía según el tipo de suelo y la disponibilidad de humedad. Las hojas son de color verde claro a oscuro, ovales, oblongas y oblongas-elípticas de bordes lisos, de 3 a 6.5 cm de ancho y de 5 a 15 cm de longitud, de base obtusa y ápice acuminado. Las flores son hermafroditas y pedicelares, nacen en las axilas de las ramas en crecimiento, pueden presentarse en grupos de dos a tres flores, por lo general solitarias, y poseen de cuatro a cinco pétalos ovalados de color blanco. El fruto es una baya esférica globulosa elipsoidal o periforme, cuyo tamaño difiere según la variedad. Color amarillo-verdoso o amarillo-claro en su madurez; puede ser averrugada o lisa brillante, densamente punteada y con un peso de 30 a 225 gr con dimensiones de 5 a 12 cm de largo, y de 5 a 7 cm de ancho, de cáscara delgada con muchas semillas o gruesa con pocas semillas, pulpa de color blanco-amarillento, rosado, amarillo, o naranja; de sabor al madurar de dulce a ligeramente ácido y algo almizclado y en cuanto a aroma, de moderado a fuerte muy agradable. Las semillas son pequeñas, triangulares, reniformes, pétreas, comprimidas, de color blanco, amarillo claro o café amarillento.

Algunas de las variedades criollas de este fruto son la Media China, La Labor, Acaponeta, Criolla de Mascota, Calvillo, Coyame, Criolla de la Costa, entre otras, (Gurrola *et al*., 1992). La variedad Media China se distingue por su forma ovoide, pulpa color crema, un diámetro de 5 a 6 centímetros y un peso de 100 a 140 gramos en calidad "extra" (González *et al*., 2000). En el campo, los árboles son medianos, de copa redondeada y no sobrepasan los 3m de altura a la edad de plena producción (Castelán y Becerril, 2004).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

2.1.3. Fisiología

El guayabo es un árbol perennifolio, con un ciclo vegetativo de 6 a 8 meses, que inicia con la brotación de las ramas fructíferas y/o vegetativas; el tiempo que pasa de flor a fruto es de 5 a 6 meses, el periodo de floración es de 45 días. Normalmente el guayabo presenta dos ciclos de crecimiento, en septiembre y en febrero. En el primero, de octubre a diciembre se poda y fertiliza, a partir de diciembre se comienza a regar para que la brotación vegetativa ocurra de diciembre a febrero, la floración de febrero a abril, el crecimiento del fruto se lleve a cabo de abril a julio y su maduración de julio a octubre. En el segundo ciclo la brotación vegetativa se presenta de junio a julio, la floración de agosto a septiembre, el crecimiento del fruto de agosto a marzo y su maduración de enero a abril (Nava *et al*., 2004).

2.1.4. Importancia

El cultivo de la guayaba en México se distribuye en 18 entidades federativas, cubriendo 22,373.59 hectáreas de cultivo. La mayoría se encuentra en los estados de Michoacán, Aguascalientes y Zacatecas, mismos que aportan el 90% de la producción nacional con 20,104 hectáreas cultivadas (SIAP, 2010). En el municipio de Calvillo, del estado de Aguascalientes, este frutal ocupa 6,643 ha, lo que representa el 30% de la superficie plantada a nivel nacional. La información para el 2009 indica un volumen de producción de 289,299.31 toneladas, con un valor de $ 950,066.65 (SIAP, 2010).

La cosecha de la guayaba se realiza en forma manual y se lleva cabo en la etapa de madurez fisiológica cuando el fruto está completamente amarillo, aunque algunos cosechan las guayabas cuando tienen un color verde limón, para facilitar el manejo de la fruta hacia los centros de comercialización. En promedio, una planta puede producir 100 frutos en el primer año y se va incrementando en forma gradual hasta el quinto año, cuando alcanza los 500 frutos y así se mantiene constante durante el resto de su vida, excepto cuando hay poda de renovación, ya que se reinicia el mismo ciclo. La fruta se debe cortar cuando está sazonada para que tenga mejor sabor y consistencia (SIAP, 2010). En la región productora de Calvillo los sistemas de producción son huertas con una extensión promedio de 3 hectáreas y densidades intermedias, es decir, 204 árboles/ha. La cosecha se realiza entre los meses de septiembre a diciembre. El riego es por gravedad, de tipo encadenado y espina de pescado. Dentro del proceso de mantenimiento del árbol, se llevan a cabo despuntes anuales, con baja fertilización química y alta aplicación de abono orgánico (González *et al*., 1997).

Algunos de los principales factores que limitan la productividad de las huertas son la escasez y el uso ineficiente del agua de riego, el poco uso de fertilizante químico, la implementación de podas inadecuadas, la presencia de plagas como el picudo de la guayaba (complejo *Conotrachelus* spp.) moscas de la fruta (*Anastrepha striata* y *A.* ssp.), temolillo (*Cyclocephala lunulata*), y problemas radiculares (problemas bióticos y daños al sistema radicular por manejo), peca (no identificado), Clavo (*Coletotrichum spp.* y *Pestalotia)* y maleza, además de nemátodos noduladores cuya interacción redunda en bajo rendimiento tanto en producción, como en la calidad de la fruta (González *et al*., 1997).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

2.1.5. Pérdidas postcosecha

Las causas de las pérdidas post-cosecha son muy diversas. Entre ellas se puede mencionar la recolección del fruto en un momento inadecuado del proceso de maduración, una exposición excesiva a las condiciones climatológicas, ya sea a la lluvia, a la sequía o a las temperaturas extremas, a la contaminación por microorganismos y los daños físicos provocados por el uso de herramientas o prácticas inadecuadas en la manipulación del fruto durante la recolección, las operaciones de carga, el empaquetado y el transporte así como su almacenamiento en instalaciones inadecuadas e inseguras. Las pérdidas post-cosecha representan un problema en muchos países. En particular, en los supermercados de países desarrollados, las frutas y hortalizas se clasifican de acuerdo a determinadas normas comerciales y si el producto está dañado, marchito, verde, deforme o simplemente antiestético, no se exhiben para su venta al público; como no hay un mercado alternativo para estos productos, generalmente van a dar a la basura.

Según opinión de la FAO (FAO, 2011) muchas de las pérdidas podrían reducirse considerablemente mediante una adecuada capacitación para manejar los alimentos cosechados de forma correcta ya que el transporte y la distribución de frutas implica una cadena logística donde la preservación del producto es el principal objetivo. En estos procedimientos se debe tomar en cuenta la madurez del fruto y las condiciones de temperatura del contenedor y del tiempo de transporte, entre otras. Una vez que el fruto se encuentra en exhibición, se deben tener las mejores condiciones para que el consumidor lleve a casa frutos de excelente calidad sin importar su origen. Es en esta etapa donde el problema de la sobremaduración, propicia que el fruto pierda varias de sus propiedades importantes como textura, sabor e incluso olor. En consecuencia es necesario valorar el proceso de la maduración, considerando sus fases y factores determinantes.

2.2. EL PROCESO DE LA MADURACIÓN

La maduración de los frutos es un proceso que involucra muchos cambios estrechamente relacionados. Estos cambios ocurren principalmente en el color, en el sabor y en el ablandamiento de los frutos. En el color, las modificaciones implican una transición de cloroplastos en cromoplastos ya que las membranas tilacoides y los pigmentos de la clorofila se rompen y ocurre una acumulación progresiva de nuevos pigmentos carotenoides en los plastidios. Así, por ejemplo, en el tomate, se incluyen β-carotenos y licopenos cuya síntesis es inducida por el etileno. Con respecto al sabor, los cambios ocurren por un incremento en la concentración de azúcares, ya sea por hidrólisis de almidón dentro de la misma fruta, o porque la extrae de azúcares de otras partes de la planta como la sacarosa que produce hexosas, principalmente fructosa y glucosa. El sabor característico del fruto lo proporcionan algunos ácidos orgánicos cuando se combinan. Los taninos, y varios compuestos fenólicos, proporcionan astringencia a los frutos inmaduros y tienen influencia importante en el sabor y color del fruto maduro (Srivastava, 2002). El ablandamiento del fruto durante la maduración, incrementa la permeabilidad de la célula y produce un incremento en la tasa de respiración y en la síntesis de proteínas involucradas en la pérdida de pared celular como las poligalacturonasas, celulasas, polifenoloxidasas,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

fosfolipasas y peroxidasas (Sinha, 2005). La pared celular es un entramado de fibras de celulosa unidas a hemicelulosas, sustancias pécticas y algunas proteínas estructurales. Además de actuar como barrera mecánica contra patógenos, la pared celular también participa en el crecimiento vegetativo, en la maduración de los frutos y en la abscisión de órganos de la planta por medio de su desensamblamiento (Real *et al.,* 2004). Durante la elongación, la pared celular primaria pierde parte de su rigidez y se extiende por la presión de turgencia. La entrada constante de agua permite que se incremente el volumen celular. En este proceso intervienen hormonas vegetales, pero posiblemente, el factor determinante del proceso es la activación de las expansinas (Azcón-Bieto *et al*., 2008). Las expansinas rompen los puentes de hidrógeno entre las microfibrillas de celulosa y la matriz adyacente de polisacáridos. Es importante hacer notar que las células de la pared de frutos contienen relativamente más pectinas y menos hemicelulosas que otro tipo de paredes celulares, con más proporción de lamela media de la pared primaria que otros órganos, así que la presencia de enzimas que degradan la pared celular no significa que las enzimas están implicadas en el proceso de la maduración pero pueden representar una característica general que implica una pared celular metabólicamente activa.

2.3. EL ETILENO

El etileno (C_2H_4) es un gas hidrocarbonado de baja densidad, más ligero que el aire, inflamable y fácilmente oxidable, su peso molecular es de 28 Da y es conocido como la hormona de la maduración de frutos por lo que tiene profunda influencia en el desarrollo de las plantas superiores. Su papel de elemento activo dentro del proceso de maduración se conoce desde 1901, cuando se observa la actividad del etileno en el fenómeno que luego se conocería como “triple respuesta”, es decir: en plántulas etioladas de guisante, el etileno reducía la elongación, engrosaba el hipocótilo y cambiaba la orientación del desarrollo del epicótilo, que crecía horizontalmente (Srivastava, 2002).

La síntesis del etileno es inducida por el desarrollo del fruto en un ciclo que se desarrolla en plantas superiores donde el componente principal es el aminoácido metionina; este ciclo comprende tres fases (Sinha, 2005).

1. El grupo adenosina (ej. adenina + ribosa) es donado a la metionina por medio de la molécula de ATP, así forma S-Adenosil metionina (SAM). Esta reacción es catalizada por la enzima metionina adenosiltransferasa.

2. La S-Adenosil metionina da lugar a 5´-metiltioadenosina (MTA) y al ácido carboxílico 1-aminociclopropano (ACC) mediada por la enzima ACC sintasa que requiere de fosfato de piridoxal (vitamina B6) como cofactor.

3. La ACC oxidasa cataliza el paso final de la oxidación de ACC a etileno, requiere de Fe++ y ascorbato como cofactores y la presencia de luz y oxígeno para que se lleve a cabo la reacción. Esto produce simultáneamente dióxido de carbono (CO_2) y cianuro de hidrógeno (HCN) que posteriormente se convertirán en ácido fórmico y amoniaco.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS

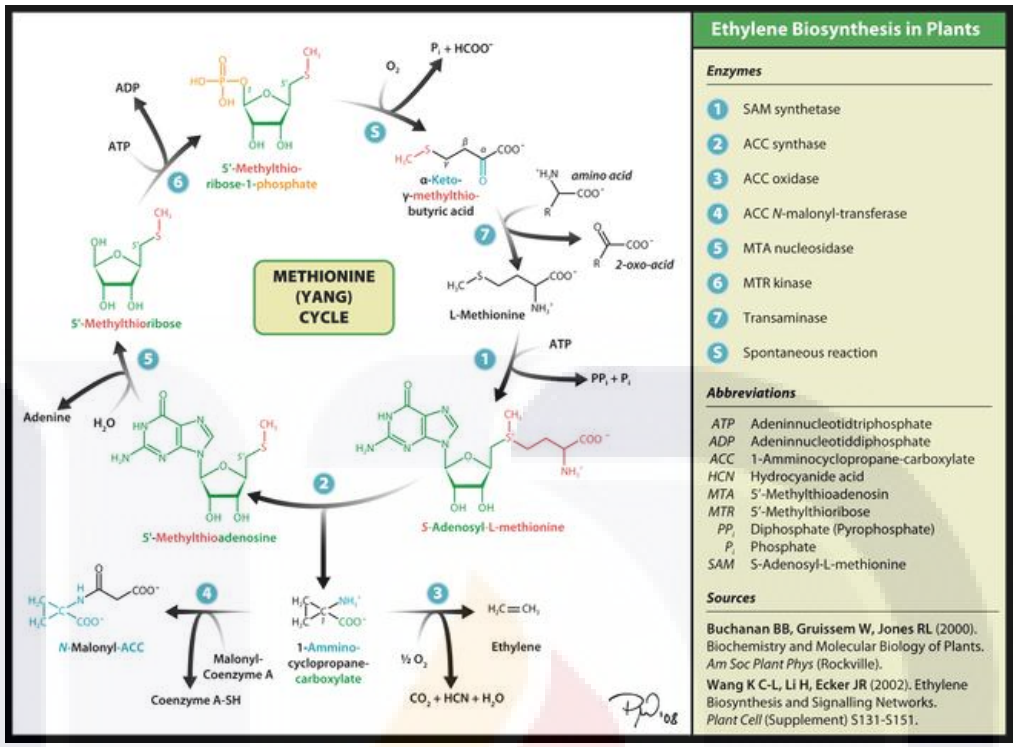


Figura 1. Biosíntesis del etileno. Ciclo de Yang. (Tomado de Wikipedia)

La producción de etileno es inducida en varias etapas del desarrollo del fruto, incluyendo maduración, germinación de la semilla, senescencia de hojas y flores y la abscisión. También es inducida por factores externos, como la sequía, lesiones, elicitores, tratamiento con auxinas e infecciones virales (Fong-Chin *et al*., 2006). A muy bajas concentraciones, el etileno es activo, del orden de 1 ppm. Las plantas oxidan al etileno hasta CO_2, aunque la regulación de su concentración se lleva a cabo en la síntesis, mediante el control de la ACC sintasa y la ACC oxidasa. Tiene la capacidad de controlar su propia síntesis (autocatálisis), ya sea estimulándola o inhibiéndola. Ya que las enzimas involucradas en su síntesis son termolábiles, ha sido necesario estudiar su función *in vivo* (Zacarías y Lafuente, 2008).

2.4 FRUTOS CLIMATÉRICOS Y NO CLIMATÉRICOS

Según su mecanismo de maduración, los frutos se dividen en climatéricos y no climatéricos. La maduración en los frutos llamados “climatéricos” como la guayaba (además de muchos otros como el plátano, manzana, aguacate, etc.) ha sido muy estudiada, básicamente porque incluye frutos muy comerciales. En estos productos, el etileno actúa como un inductor de muchos genes asociados a los cambios ocurridos en el fruto. Durante este proceso ocurre una continua y masiva producción de etileno lo que provoca un dramático aumento en la tasa de respiración, acompañado y aun precedido, por producción de C_2H_4 seguido por la maduración del fruto (Yi Yin Do *et al*., 2005). Se ha propuesto que

TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

la producción de etileno en frutos climatéricos está regulada por dos sistemas de acuerdo a las diferentes isoformas de ACC sintasa involucradas en los niveles de producción de etileno:

El sistema I, que es responsable de la producción basal de etileno, presentando una baja tasa de producción en la fase preclimatérica con el fin de proveer cantidades suficientes de etileno para la inducción del proceso de maduración antes del aumento en la respiración, por lo tanto este sistema opera en los frutos preclimatéricos y es producido en los tejidos vegetativos (Nakatsuka, *et al.*, 1998). El sistema II, en el que opera la biosíntesis autocatalítica con rápida producción de etileno durante el proceso de maduración. Se piensa que los frutos climatéricos presentan diferentes genes de ACC oxidasa que participan en los sistemas I y II (Yi Yin Do *et al*., 2005). Luego de este proceso el fruto pierde turgencia, aumenta su sensibilidad a los factores externos, pierde el control metabólico e inicia su fase de senescencia (Zacarías y Lafuente, 2008).

La maduración en otro tipo de frutos, llamados no climatéricos (limón, fresa, naranja), no ha sido tan ampliamente estudiada como en los climatéricos, sin embargo ya se cuenta con información importante para algunos de ellos como la fresa, los cítricos y la uva. En el proceso de maduración también se observan muchos de los cambios mencionados: pérdida de clorofila y adquisición de antocianinas, acumulación de sacarosa, hexosa y compuestos volátiles como alcoholes, aldehídos, y sus ésteres. En estos frutos no se manifiesta una producción significativa de etileno, y la maduración no se ve afectada por etileno exógeno ni por inhibidores de biosíntesis o de acción del etileno (Srivastava, 2002).

2.5. GENES DE ACC SINTASA, ACC OXIDASA, ALFA EXPANSINA Y ENDOGLUCANASA RELACIONADOS CON LA MADURACIÓN

Los genes relacionados con la maduración son muchos, sin embargo los que codifican para la ACC sintasa y la ACC oxidasa se destacan ya que participan activamente en la biosíntesis del etileno, compuesto que a su vez promueve la expresión de otros genes como los de las α-expansinas y las endoglucanasas que son enzimas que intervienen en las modificaciones de la pared celular.

2.5.1. ACC sintasa

La ACC sintasa (1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa) es una enzima que cataliza y limita la velocidad de biosíntesis del etileno, regulando la conversión de SAM a ACC. Lo que hace difícil su estudio químico, es que se trata de una enzima citosólica inestable, y, además, está presente en muy pocas cantidades en el tejido vegetal (representa el 0.0001% del total de proteínas de la maduración en tomate) (Taiz & Zeiger, 2002).

La ACC sintasa está compuesta por una cadena polipeptídica de 430 aminoácidos, es homodimérica con sitios activos compartidos, similares a las aminotransferasas. Tanto su secuencia como su estructura 3D ha sido determinada en especies como manzana y tomate. Es miembro del grupo de las enzimas PLP-dependientes, o sea que requiere de fosfato de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

piridoxal como cofactor. En su estructura terciaria, el monómero de la enzima contiene 2 dominios. Un dominio αβα central compuesto por siete hojas beta, flanqueadas por nueve alfa hélices, y un dominio αβ que consiste de 5 hojas beta y 5 alfa hélices. En la forma dimérica el extremo N-terminal de una de las cadenas interactúa a través de 8 residuos con el extremo carboxilo de la otra cadena (Srivastava, 2002). La ACC sintasa está codificada por miembros de una familia multigénica divergente que está regulada diferencialmente en respuesta a diversos factores químicos, del desarrollo y ambientales entre los que se pueden mencionar sequías e inundaciones (Taiz & Zeiger, 2002), por lo tanto la homología entre las ACC sintasas que son inducidas por un mismo factor en distintas plantas es mayor que la existente entre las distintas ACC sintasas de una misma especie, esto es, las isoformas presentan diferente papel según el tejido y el tipo de célula donde se encuentren (Zacarías y Lafuente, 2008).

Un gen típico de ACC sintasa consta de cuatro exones y tres intrones. Sin embargo, algunos carecen del primero o segundo intrón o, como en las cucurbitáceas, puede aparecer un cuarto intrón. De manera inusual, el largo intrón 3 del gen *Csi-ACS1* de *citrus sinensis* contiene fragmentos homólogos al ADN mitocondrial que puede sugerir el origen reciente de introns en los genes de ACC sintasa. El hecho de que algunas secuencias de aminoácidos de isoenzimas de ACS son más similares a los de las otras especies que a los miembros de la familia de la ACS en la misma especie, sugiere que el polimorfismo de la ACS se presentó antes de la separación de las especies. Por otra parte, la presencia de isoenzimas de ACS de monocotiledóneas y dicotiledóneas en una rama sugiere que diferentes isoformas ya estaban presentes antes de la divergencia monocotiledóneas-dicotiledóneas (Jakubowicz y Sadowski, 2002).

Los genes ACS de *A. thaliana* y tomate (*Lycopersicon esculentum*) son los mejor caracterizados. La más profundamente investigados son las de la familia solanaceae (tomate, papa y tabaco), cucurbitáceas (melón, calabaza, calabacín y pepino), brassicaceae (*Arabidopsis thaliana*, brócoli y mostaza), rosaceae (manzana, pera y durazno), leguminosas (frijol, chícharo y soya), musaceae (plátano), rutaceae (cítricos) y gramineae (trigo y arroz) y de varias plantas ornamentales (*Phalenopsis*, *Doritaneopsis*, *Dendrobium*, *Cymbidium*, *Dianthus caryophyllus*, *Pelargonium hortorum* y *Petunia hybrida* (Jakubowicz y Sadowski, 2002).

2.5.2. ACC oxidasa

La ACC oxidasa (1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa) es una enzima presente en los tejidos vegetales. La ACC oxidasa cataliza la última etapa en la biosíntesis de etileno: la conversión de ACC a etileno. Las ACC oxidasas pertenecen a la superfamilia Fe^{2+}/ascorbato oxidasa, lo que implica que requieren Fe^{2+} y ascorbato y necesita la presencia de oxígeno para su actividad estimulada por CO_2 (Taiz & Zeiger, 2002).

La reacción se puede resumir como:

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

$$ACC + O_2 + Ascorbato \xrightarrow{Fe^{2+}} Etileno + CO_2 + HCN + Dihidroascorbato + 2\ H_2O$$

Los cDNAS de ACC oxidasa fueron aislados primeramente en tomate, para después encontrarlos en melón, kiwi y manzana. Las ACC oxidasas están codificadas por una familia multigénica, por lo tanto están diferencialmente reguladas. A pesar de que en la mayoría de los tejidos vegetales la actividad de ACC oxidasa es constitutiva, la síntesis de la enzima y su actividad también son inducidas de forma específica en determinados procesos del desarrollo. Por ejemplo en algunos frutos climatéricos, la actividad ACC oxidasa se incrementa antes que la de la ACC sintasa y es estimulada por etileno, lo que indica que la regulación de la ACC oxidasa constituye un mecanismo adicional de control de la síntesis de etileno (Azcón-Bieto *et al*., 2008).

2.5.3. Alfa-expansinas

Las expansinas son proteínas relacionadas con la pérdida de la pared celular, catalizan su extensión y relajación bajo reacciones dependientes de pH. Estas proteínas rompen los puentes de hidrógeno de las cadenas de polisacáridos presentes en la pared durante la maduración del fruto (Taiz & Zeiger, 2002). Tienen un péptido señal que dirige a la enzima al retículo endoplásmico y al aparato de Golgi. Esta parte de la proteína es removida cuando entra al retículo endoplásmico. La proteína completa es de aproximadamente 25-27 kDa y está conformada por dos dominios, un amino-terminal de 120 aminoácidos con una similaridad estructural y de secuencia con la familia 45 de las endoglucanasas (EG45-like region) y un dominio carboxi-terminal de 98 aminoácidos que hipotéticamente es un dominio de enlace de polisacáridos (Sampedro *et al*., 2006).

Basados en las homologías de las secuencias, las expansinas están clasificadas en cuatro subgrupos, dos de los cuales son la α y β expansinas que comparten algunas características, incluyendo el péptido señal en el grupo amino terminal así como residuos conservados de cisteína y triptófano. Sin embargo difieren en sus motivos N-de unión a polisacáridos (glucosilación). Los otros dos grupos son γ y δ expansinas las cuales son proteínas más cortas y muestran alta similaridad en la porción amino terminal y en la carboxilo terminal (Karaaslan & Hrazdina, 2009). Se han identificado y aislado expansinas de diferentes plantas y su expresión depende de las características del tejido, por lo tanto se ha sugerido que trabajan de manera similar, pero en diferentes sitios de la pared celular (Taiz & Zeiger, 2002). Las expansinas son activas desde 1 parte de proteína por 5000 partes de pared celular en peso seco. Pueden requerir del estímulo de la giberilina para permitir la elongación de las células. Estudios sugieren que las expansinas pueden actuar en la interfase entre celulosa y una o más hemicelulosas (Taiz & Zeiger, 2002).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

2.5.4. Endoglucanasas

Las endo-β-1-4-glucanasas (EGasas) pertenecen a una familia multigénica. Están divididas en tres grupos, α, β y δ en plantas. Los miembros de α y β son de tipo secretor y están asociados con procesos tales como la maduración del fruto, abscisión y extensión celular. Los miembros de la subfamilia δ poseen un dominio transmembranal que está involucrado en la biosíntesis de celulosa. Las α-endoglucanasas juegan un importante papel en el ablandamiento de los frutos (climatéricos y no climatéricos) durante la maduración. Estos genes han sido identificados en tomate, pera, durazno y fresa. El ablandamiento está asociado con el incremento de transcriptos de EGasas y el aumento de su actividad, aunque esta actividad varía de fruto en fruto (Amita *et al.*, 2008).

Las glucanasas son enzimas del complejo celulosa que han sido agrupadas en tres componentes:

- Endo-β-glucanasas o 1,4-β-D-glucan glucanohidrolasas
- Exo-β-glucanasas o 1,4- β-D-glucan celobiohidrolasas
- β-glucosidasas o celobiasas.

De esta familia, las endo-β-glucanasas, hidrolizan al azar los enlaces l,4-β-D glucosídicos del interior de la región amorfa de la celulosa, produciendo nuevos sitios de ataque complementados por las exoglucanasas. Como resultado se presenta una rápida disminución en el largo de las cadenas de celulosa y un lento incremento en los grupos reductores (Vilches, 1993). Las endoglucanasas están codificadas por una familia de genes y su regulación es específica del tipo de tejido y la etapa del desarrollo de la planta (Real *et al.*, 2004).

2.6. HERRAMIENTAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR PARA LA MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE ADN

El campo de la biología molecular comprende, de manera primordial, la estructura, la función y la composición de moléculas biológicas. Las herramientas propias de esta disciplina permiten el desarrollo de un trabajo fascinante enfocado a la identificación y el aislamiento de genes concretos, de entre los miles de genes presentes en un genoma determinado, para lograr un conocimiento de las relaciones e interacciones en los sistemas celulares. Para el aislamiento y la identificación de genes se realizan muchas y muy diversas herramientas y técnicas, y, aunque frecuentemente aparecen nuevos enfoques, se pueden mencionar las siguientes herramientas:

2.6.1 Digestión Enzimática

Este proceso se realiza mediante enzimas de restricción (endonucleasas) y constituye la parte medular de la tecnología del ADN recombinante. Estas enzimas reconocen y cortan al ADN en secuencias específicas (4-8 pb) llamadas sitios de restricción. Esta técnica

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

permite cortar el ADN de una manera predecible y reproducible (Dhillon *et al*., 2007). Tomando en cuenta que los sitios de restricción se distribuyen al azar en el ADN, las enzimas de restricción para 6 pb pueden generar fragmentos de 4.1 kb en promedio y para 4 pb fragmentos de 0.26 kb. Las enzimas de restricción pueden utilizarse para hidrólisis parcial y no total, lo que permite cortar el ADN genómico en fragmentos útiles para construir genotecas. Las enzimas de restricción tienen sus propias condiciones de uso, definidas por la temperatura y la fuerza iónica del medio de reacción. Una unidad de enzima de restricción corta 1μg de ADN del fago lambda a 37 ^{o}C (Etienne, 2001). La nomenclatura de las endonucleasas se refiere a la bacteria de la que se extrae según su género y especie. El trabajo con enzimas de restricción debe realizarse cuidando la pureza del ADN, evitando el contacto con contaminantes como etanol, cloroformo, sal, etc., que pueden inhibir la endonucleasa y cuidando las condiciones de temperatura y pH, ya que estas enzimas son muy sensibles a estos factores. Además, es muy conveniente utilizar el buffer adecuado para que la enzima trabaje en un ambiente óptimo.

2.6.2. Electroforesis de Ácidos Nucleicos en gel de Agarosa

La electroforesis es el movimiento de partículas cargadas eléctricamente en un fluido bajo la influencia de un campo eléctrico. Ya que muchos compuestos contienen una determinada carga eléctrica, ya sea positiva o negativa, este procedimiento permite la separación de biomoléculas de diferente tamaño, en virtud de su migración diferencial a través de un gel a un campo eléctrico. Esta técnica fue introducida por el bioquímico sueco Arne Tiselius como una técnica analítica. Por esta aportación, Tiselius recibe el Premio Nobel de química en 1948. (Encyclopedia Britannica, Science & Technology).

La electroforesis en gel se produce con agarosa, que es una forma sumamente pura de un polisacárido de galactosa que se utiliza para elaborar las placas de agar, que permanecen líquidas a temperaturas mayores de 50 ^{o}C. El gel se sumerge en un amortiguador (buffer) y los fragmentos de ADN se cargan en un pozo de uno de los extremos del gel. El tamaño de los fragmentos se puede determinar utilizando un marcador con fragmentos de pesos moleculares conocidos. El ADN, cargado negativamente, se moverá hacia el ánodo (positivo). La matriz del polisacárido del gel retarda al ADN por un proceso de tamizado, por lo que los fragmentos se separan según su tamaño, y los fragmentos pequeños se mueven más rápidamente. Etos fragmentos se pueden observar al teñirlos con bromuro de etidio. Este colorante se fija al ADN y es fluorescente al iluminarlo con radiación ultravioleta (Smith, y Wood, 1998).

2.6.3. Clonación Molecular

La clonación molecular es una técnica utilizada para clonar secuencias de ADN utilizando vectores, que también son pequeños fragmentos de ADN. Los vectores de clonación están diseñados para permitir la recombinación de ADN en un sitio de restricción, y llevan marcadores para seleccionar las células que se pretende incorporar. Tienen la información necesaria para su replicación, pero no son auto replicables, por lo

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

que es necesario que se introduzcan en células huéspedes (Gómez, 2004). Esta técnica favorece la generación de múltiples copias de una secuencia de ADN colocada en un vector que se introduce en una célula hospedera, cuya maquinaria de replicación se encarga de propagar la molécula recombinante. Los vectores de clonación pueden ser clasificados de la siguiente manera:

Plásmidos: los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico, circulares y generalmente de tamaño pequeño que se encuentran en muchas especies bacterianas y que se pueden replicar de manera independiente del ADN cromosómico. Para ser utilizado como vector de clonación, un plásmido ideal debe poseer al menos tres características:

1) Debe tener su propio origen de replicación y por tanto la capacidad de replicación autónoma independiente del genoma del hospedador.

2) Debe tener sitios de clonación múltiple que permitan la apertura del ADN con enzimas de restricción que hagan posible la clonación de insertos de ADN en la forma y orientación determinada.

3) Debe poseer marcadores genéticos seleccionables que permitan aislar las células hospedadores que contengan el vector. La presencia en el plásmido del gen de resistencia a ampicilina permite seleccionar las bacterias que portan estos plásmidos gracias a su capacidad para crecer en presencia de dicho antibiótico (el gen de resistencia codifica una beta lactamasa, enzima que degrada la ampicilina).

La mayoría de los plásmidos usados en biología molecular contienen el sitio de clonación múltiple dentro el gen de la β-galactosidasa, lo que permite la interrupción e inactivación de este gen cuando un ADN inserto se clona en esta región. En medios de cultivo que tengan el análogo de la lactosa X-gal, se pueden distinguir las colonias de bacterias que contienen el vector recombinante (con inserto) de aquellas que han recibido un vector no recombinante (sin inserto). Las bacterias que reciben el vector recombinante no pueden utilizar lactosa ni su análogo y formarán colonias blancas. Las bacterias que reciben un vector no recombinante pueden utilizar la lactosa o su análogo y formarán colonias azules (Galván *et al*., 2009).

Fagos: Estos vectores de clonación están constituidos por una cubierta proteica que contiene su material genético. Entre los fagos más estudiados, se tiene el fago lambda (λ) del que se conoce la secuencia completa de nucleótidos y la función de sus genes. Estos bacteriófagos son virus que infectan específicamente bacterias y su genoma es una molécula de ADN de doble cadena de aproximadamente 50 kb de longitud (Yilun Wang *et al*, 2003). También se tiene el fago M13 que contiene ADN de una sola cadena y se replica sin matar a su hospedero, aunque para usarlo como vector de clonación debe obtenerse de células infectadas, donde existe en forma replicativa de dos cadenas (Gómez, 2004).

Cósmidos: Los cósmidos son los más antiguos de los vectores usados para el análisis de genomas complejos. Son vectores híbridos que combinan las características de los plásmidos y del fago λ, ya que son plásmidos convencionales que contienen una o dos copias de pequeñas regiones de fago λ (Sambrook and Russel, 2001). Tienen la habilidad del plásmido para replicarse de manera autónoma y la capacidad de empaquetamiento *in*

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

vitro del cromosoma de λ y son capaces de insertar fragmentos de ADN de 35 a 45 kb (Gómez, 2004).

Fásmidos: Estos vectores combinan las características de un fago M13 y un plásmido, por tanto están constituidos por el origen de replicación de ambos. El origen del fago es responsable de la replicación y se generan copias monocatenarias. Este ADN es empaquetado en viriones por lo que puede aislarse con facilidad y usarse en la secuenciación correspondiente.

Cromosomas artificiales: Los cromosomas artificiales se desarrollaron para clonar segmentos grandes. Dentro de estos se pueden mencionar a los YAC (Yeast artificial chromosomes), que son moléculas de ADN cuya arquitectura imita a la de los cromosomas de levadura y son capaces de contener insertos de 200 a 500 kb, los BAC (Bacterial artificial chromosones) que son moléculas circulares de ADN que transportan un marcador resistente a los antibióticos y son derivados del factor F (factor de fertilidad) de 7 kb de E. Coli y tienen capacidad para insertos de 300 kb (Sambrook and Russel, 2001). Los PAC son equivalentes a los BAC y aunque tienen menor capacidad que los YAC, son menos complejos y más fáciles de construir. Tienen un número bajo de copias, pero son estables y relativamente fáciles de trabajar. Los BACs se han convertido en los vectores más frecuentemente utilizados para la preparación of librerías genómicas (Dhillon *et al*., 2007).

2.6.4. Transformación Genética Bacteriana

Estas técnicas permiten la introducción de moléculas de ADN recombinante en el genoma de un organismo. Hay varios sistemas de trasformación, entre los más importantes se pueden mencionar: electroporación y choque térmico. En particular, la electroporación que fue la técnica utilizada para la construcción del banco genómico, consiste en el aumento significativo de la conductividad eléctrica, así como de la permeabilidad de la membrana plasmática celular, causada por un campo eléctrico aplicado externamente. Constituye una forma de introducción de diferentes sustancias en células, como sondas moleculares, fármacos que pueden cambiar las funciones celulares, o un fragmento de ADN codificante, que puede ser un plásmido. El proceso es el siguiente: cuando el voltaje que atraviesa una membrana plasmática excede su rigidez dieléctrica se forman poros. Si la fuerza del campo eléctrico o el tiempo de exposición al mismo se eligen apropiadamente, los poros formados por el pulso eléctrico se sellan tras un corto período, durante el cual los compuestos extracelulares tienen la oportunidad de entrar a la célula. Sin embargo, una exposición excesiva de células vivas a campos eléctricos puede causar apoptosis o necrosis. (Castro y Portelles, 1997).

Por su parte la transformación con cloruro de calcio y choque térmico, consiste en agregar plásmidos a las bacterias tratadas con $CaCl_2$ y someterlas a un ligero choque térmico, típicamente a 42 ^{o}C. Este tratamiento incrementa la permeabilidad de la membrana celular y las moléculas de ADN se replican intactas en las células hospederas. Para ayudar a las células bacterianas a recobrarse después del choque térmico, las células se incuban brevemente en medios de cultivo no selectivo. A medida que las células se recuperan, se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

expresan los genes del plásmido y se segregan con la división de las células bacterianas. Sin embargo, en virtud del bajo número de estas células, no se propagan en todas las réplicas y es necesario seleccionar las que contienen el plásmido mediante una adecuada selección de antibióticos. Las cepas de E. Coli son sensibles a los antibióticos comunes por lo que son útiles para seleccionar plásmidos cuyos genes sean resistentes a los antibióticos. Si, por ejemplo, la transformación se realiza en un medio que contiene ampicilina, únicamente las bacterias que tienen el ADN del plásmido podrán metabolizar la ampicilina y formarán colonias que podrán ser seleccionadas.

2.6.5. Banco Genómico

La gran mayoría de este trabajo de investigación recayó en la construcción y uso de bancos genómicos, mismos que se pueden definir como conjuntos de fragmentos de ADN clonado, en los cuales se espera que se encuentre la mayor parte de secuencias constitutivas de un genoma, incluyendo la que corresponde a un gen de interés (Álvarez *et al*., 2008). Los fragmentos clonados deben ser de tamaño suficiente para contener secuencias reguladoras, pero no deben ser muy grandes, ya que se dificultaría su discriminación cuando haya que realizar un mapa de restricción. Seidman (1991) menciona dos estrategias para cubrir este aspecto: a) minimizar el número de clonas incorporando grandes fragmentos de ADN genómico y b) maximizar la eficiencia de clonación utilizando vectores como los basados en el bacteriófago λ.

Para la construcción de la genoteca se usan vectores génicos, que son moléculas transportadoras de ADN que transfieren y replican fragmentos de ADN insertados en huéspedes que generalmente suelen ser bacterias. Debido a su tamaño puede ser diferenciado del material genético del huésped bacteriano por centrifugación (Álvarez *et al*., 2008). Es importante mencionar que para asegurar que el fragmento de interés se encuentra en el banco genómico, es necesario que el ADN diana se haya fragmentado completamente al azar, antes de ser ligado al vector de clonación (Seidman, 1991). Para determinar la proporción más adecuada de inserto-vector se recomienda realizar ligaciones a pequeña escala, comparando la cantidad de clonas obtenidas en cada evento de ligación. La óptima proporción será aquella en la que se haya generado un mayor número de recombinantes (Seidman, 1991).

Después de la transformación, las bibliotecas genómicas pueden ser amplificadas para su almacenamiento. La amplificación de un banco genómico implica replicar cada clona existente en el mismo, por lo que puede usarse muchas veces para lograr aislar las clonas de interés. Los tiempos de duplicación de las bacterias que conforman el banco pueden variar dependiendo del tipo de vector y del inserto. Esto se puede observar al cabo de 16 horas de incubación a 37 °C ya que el tamaño de las colonias puede verse afectado. Debe tenerse en cuenta que, con la amplificación, algunos genes pueden estar pobremente representados debido al sobrecrecimiento de algunas colonias (Seidman, 1991). En las librerías genómicas casi siempre los escrutinios se realizan por hibridación, usando una sonda radioactiva de ácido nucleico (Klug *et al*., 2006). Para identificar y aislar clonas dentro de un banco genómico, se usan las **sondas**. Una sonda es una secuencia de ADN o

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

ARN que se ha marcado de alguna forma, y que es complementaria a una parte de una secuencia clonada (gen de interés) presente en la genoteca. Las sondas pueden provenir de diversas fuentes, el único requisito es que se generen de regiones conservadas (Klug *et al*., 2006).

Una vez que se ha construido un banco genómico, debe hacerse una valoración de su eficiencia. Esta validación se realiza mediante un proceso de dos pasos: 1) se realiza un experimento piloto con una pequeña alícuota del banco para detectar en gel de agarosa, la presencia de insertos de varios tamaños. En un segundo paso, se hace un análisis más detallado con fragmentos purificados de ADN. Se visualizan los tamaños de los insertos y se calcula su promedio. Un buen banco debería incluir todas las secuencias de interés. Para anticipar la posibilidad de aislar una determinada secuencia, se usa la siguiente expresión:

$$N = \ln(1-l/G)/\ln(1-P)$$

donde N es el número de clonas independientes que deben ser escrutadas para aislar una determinada secuencia con probabilidad *P*, *l* es el tamaño promedio del inserto (pb) y G es una constante que depende del tamaño del genoma objetivo (pb).

2.6.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Esta técnica permite la amplificación selectiva de secuencias de ADN. La PCR es un método *in vitro* de síntesis de ADN con el que un segmento particular de éste es específicamente amplificado al ser delimitado por un par de oligonucleótidos que lo flanquean. Su copiado se logra en forma exponencial a través de repetidos ciclos de diferentes periodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable. La PCR es una técnica de biología molecular altamente específica, rápida y sensible para detectar cantidades ínfimas de un cierto ADN específico, posibilitando su fácil identificación y prescindiendo del uso de radioisótopos, indispensables antes de su invención. (McPherson & Moller, 2000). Para realizar una PCR se necesita mezclar la secuencia a amplificar, los oligonucleótidos que se alinearán a las cadenas simples del ADN, la mezcla de los cuatro desoxiribonucleósidos trifosfatados (dNTPs) en cantidades suficientes, el buffer de reacción para la polimerasa, agua ultrapura para completar el volumen final de reacción (que normalmente oscila entre 20 y 100 µl), y como ingrediente final, que es crucial para la reacción, la enzima ADN polimerasa termoestable (McPherson & Moller, 2000). La solución amortiguadora para la reacción comúnmente se emplea concentrada diez veces, y por lo general incluye Tris-HCl (pH=8.4 a temperatura ambiente), KCl, gelatina y MgCl2. Un ciclo de la PCR consiste de tres pasos: desnaturalización, alineamiento y extensión, más una etapa previa de desnaturalización a 94°C, para relajar las posibles estructuras secundarias y de otros tipos (Rodríguez, 2004). Se recomienda que este ciclo ser repita al menos 30 veces.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

2.6.7. Mapa de Restricción

Esta técnica permite determinar el número, orden y distancia entre los sitios de corte de una enzima de restricción a lo largo de un segmento de ADN clonado. Generalmente los mapas de restricción de diferentes ADNs clonados son lo suficientemente diferentes para servir de etiqueta de identificación de una clona. Esto permite subclonar fragmentos de un gen para comparar su organización interna con respecto de otras secuencias clonadas (Klug *et al*., 2006).

2.6.8. Análisis tipo Southern blot

El Southern Blot es una técnica que se utiliza para estudiar la organización de los genes dentro del genoma por medio del mapeo de los sitios de restricción dentro o alrededor de segmentos de ADN genómico para el cual ciertas pruebas están disponibles. Primeramente, el ADN genómico es digerido con una o más enzimas de restricción y los fragmentos resultantes son separados de acuerdo a su tamaño por medio de electroforesis. El ADN es entonces desnaturalizado *in situ* y transferido del gel a un soporte sólido (membrana de nylon o nitrocelulosa). El ADN agregado a la membrana es hibridado con un ADN o ARN u oligonucleótido marcado y las bandas complementarias con la sonda son localizadas con un apropiado sistema de detección para estimar el tamaño y el número de bandas generadas después de la digestión del ADN genómico. De los métodos que se utilizan para transferir fragmentos de ADN del gel de agarosa a un soporte sólido, se aplicó para el presente trabajo el de transferencia por capilaridad ascendente, que consiste en llevar los fragmentos de ADN desde el gel en un flujo ascendente para depositarlos en la superficie del soporte sólido. Los fragmentos pequeños de ADN (< 1 kb) son transferidos en un gel al 0.7% en una hora, y los mayores a 15 kb se transfieren en un lapso de 18 horas o más. Se utilizan aproximadamente 10 µg de ADN dispuestos en cada pozo cuando la sonda es de tamaño estándar (> 500 pb) y de una alta actividad específica (> 10^9 cpm/µg) para detectar secuencias de una sola copia (Sambrook y Russell, 2001).

2.6.9. Secuenciación de Ácidos Nucleicos

Esta técnica representa una forma definitiva para caracterizar una clona. La secuenciación de ADN es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas para determinar el orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en una secuencia de ácidos nucleicos. La secuencia de ADN constituye la información genética heredable del núcleo celular. Klug *et al*., 2006).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

3. JUSTIFICACIÓN

El auge de las ciencias genómicas ha impactado en la implementación de metodologías de análisis cada vez más precisas y específicas. Sin embargo, el grado de sofisticación y complejidad que han alcanzado, ha hecho necesario un énfasis general en el proceso de la investigación. En particular, la caracterización de genes es una tarea que se ha vuelto indispensable dentro de la implementación de estudios biotecnológicos, sobre todo en aplicaciones importantes en las áreas de la agricultura y salud.

Esta tarea está presente en numerosos estudios, en los que se han identificado genes codificantes para enzimas clave, implicadas en muchos procesos vitales. Específicamente, la caracterización de genes en el análisis del proceso de maduración de los frutos, ha permitido su manipulación con el fin de lograr que los frutos tengan mejores características de calidad, y sobre todo, una mayor vida de anaquel.

A través de la presente investigación, y, de acuerdo con los objetivos planteados, se pretende lograr un mejor conocimiento del proceso de maduración de la guayaba. Este objetivo justifica por sí solo la generación de nuevo conocimiento, pues es un trabajo de ciencia básica. Los productos que se derivarán de este trabajo, como la identificación de genes y el banco genómico, entre otros, permitirán disponer de material adicional para apoyar análisis y aplicaciones posteriores en el campo de la experimentación de la maduración de frutos.

3.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Se considera que los genes que codifican para las enzimas ACC oxidasa, ACC sintasa, α-expansinas y endoglucanasas están presentes en el banco genómico de guayaba.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar clonas genómicas de ACC oxidasa, ACC sintasa, α-expansinas y endoglucanasas a partir de un banco genómico de Guayaba (*Psidium guajava* L.).

3.2.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Diseñar oligonucléotidos específicos o degenerados dirigidos para ACC oxidasa, ACC sintasa, α-expansinas y endoglucanasas.

- Amplificar fragmentos de los genes ACC oxidasa, ACC sintasa, α expansinas y endoglucanasas mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

- Clonar y secuenciar los productos amplificados por PCR..
- Analizar las secuencias amplificadas en las bases de datos disponibles en la red mediante técnicas bioinformáticas.
- Construir un Banco Genómico de Guayaba.
- Aislar y caracterizar las clonas genómicas.
- Secuenciar y analizar los genes mediante un estudio bioinformático.
- Analizar el número de copias de los genes por Southern Blot.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

4. METODOLOGÍA

4.1. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.1. Material Vegetal

Se utilizaron hojas tiernas y frutos inmaduros de guayaba (*Psidium guajava*) de uno a dos centímetros de diámetro, colectados en la localidad de San Tadeo del municipio de Calvillo, Aguascalientes, localizada a 102° 70´ longitud oeste y 21° 91’ latitud norte a una altura media de 1700 msnm y transportados en hielo hasta las instalaciones del campus. Los frutos se sometieron a un lavado con agua corriente y otro con agua destilada, se dejaron escurrir sobre toallas absorbenes y se guardaron a 4 °C hasta su uso. Después del lavado con agua corriente, las hojas se pusieron 5 minutos en alcohol al 70% y se enjuagaron con agua destilada, se les retiró la nervadura principal y se cortaron en fragmentos para guardarlas a -70°C.

4.1.2. Material Biológico

Se usó la cepa DH10B de *E. coli* en la transformación por electroporación para la construcción del banco genómico de guayaba. El vector de clonación utilizado fue pBluescript + de Stratagene.

4.1.3. Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico involucra dos fases que son la extracción de núcleos, para la cual se usa un buffer con 2-metil-2,4-pentanediol (MPD) y tritón para mantener intactos los núcleos celulares. La segunda fase consiste en lisar los núcleos con un detergente como el CTAB para extraer los ácidos nucleicos. Para la extracción de núcleos se utilizaron frutos inmaduros de guayaba siguiendo el protocolo de Peterson *et al.*, (1997) y Vishal *et al*., (2007). Primero se lavaron con agua destilada, luego se trituraron en licuadora (3 ciclos de 10 segundos con una pausa de 4 segundos para evitar que se calentara el buffer) con el buffer para extracción de núcleos que contenía 36.5 g de lisina, 1.9 gr de metabisulfito, 5 gr de dietiltiocarbamina, 2 gr de dicloruro de magnesio, 20 gr de polivinilpirrolidona, 128.2 ml de MPD, 12 ml de EGTA y 5 ml de tritón. El tejido vegetal molido se filtró utilizando tela absorbente y una malla micropore de 60 micras; el extracto se colectó en tubos de la marca sorvall de 250 ml que se mantuvieron en hielo hasta pasar a la etapa de centrifugación. Después de centrifugar y resuspender la pastilla 5 ó 6 veces, se realizó el lisado de los núcleos utilizando 25 ml de buffer de lisis, el cual estaba compuesto de 2.5 ml de Tris, 7.5 ml de NaCl, 1 ml de EDTA, 10 ml de CTAB, 4.5 ml de agua destilada estéril y 75 µl de B-mercaptoetanol. Posteriormente los tubos con las muestras se incubaron a 65 °C por 10 minutos, luego se colocaron en hielo por 5 minutos; finalmente se les añadió 2 ml de NaCl y se centrifugaron por 10 minutos a 12,000 rpm. El sobrenadante se pasó a otro tubo de 250 ml de la marca Sorvall y para precipitar el ADN se agregó un volumen de isopropanol, esta preparación se dejó toda la noche a una temperatura de -20

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

°C. Al día siguiente la muestra se centrifugó por 5 minutos a 12,000 rpm, se descartó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla de ADN durante 10 minutos para que se volatilizara cualquier resto de isopropanol, resuspendiéndola en 4 ml de agua. A continuación el ADN resuspendido se distribuyó en 8 microtubos a los que se les agregó 1 µl de RNAasa incubándolos por 30 minutos a 37 °C. Pasado el tiempo de incubación a cada muestra se le realizó una extracción con fenol-cloroformo-isoamílico (24:24:1) y otra con cloroformo, recuperando en cada una de las extracciones la fase acuosa. A esta última fase se le agregó un volumen de isopropanol y se dejó precipitando por 30 minutos a -20 °C. Pasado este tiempo se centrifugaron las muestras por 5 minutos a 12,000 rpm, se desechó el sobrenadante y se realizó un lavado con 500 µl de etanol al 70%. Finalmente se quitó el exceso de etanol, se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 80 µl de TE (Fig. 2).

La integridad de la molécula se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 0.8 %. Por otra parte, la concentración de ADN se determinó utilizando densidad óptica a 260 nm y la pureza se valoró con la relación 260/280 nm. El fotodocumentador utilizado para dicho fin fue el ADN Light Dual UV Transiluminator (Labnet). La expresión para la concentración de ADN es la siguiente:

$$[ADN] = \frac{(\mathrm{D.O260})(50)(\text{factor de dilución})}{1000}$$

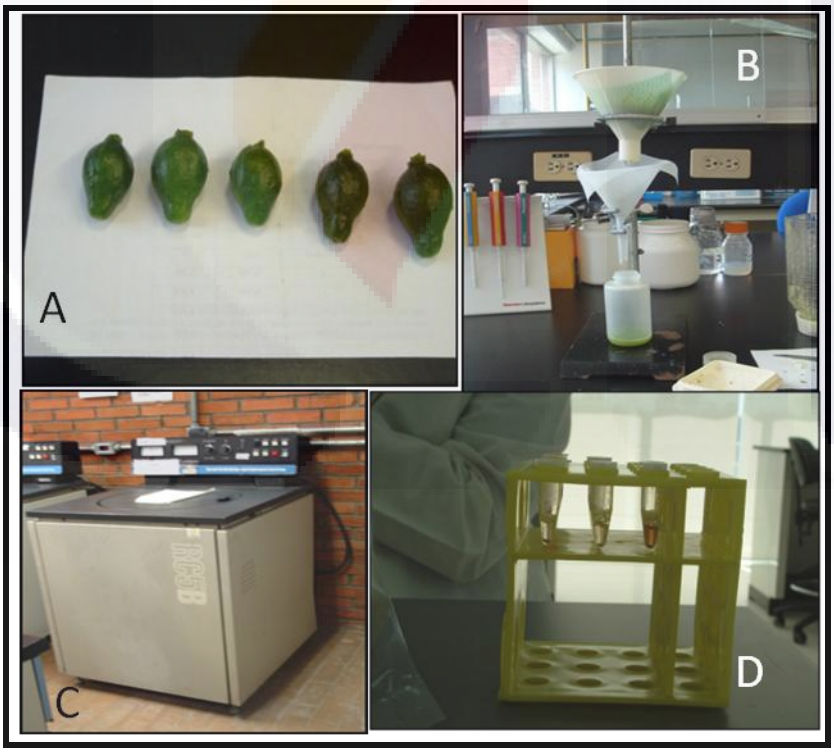


Figura 2. Extracción de ADN nuclear. A) Frutos inmaduros de guayaba de la variedad “Media China” con los cuales se hizo el aislamiento de ADN nuclear. B) Sistema de filtración a través de magitel y maya micropore, el extracto se colectó en tubos sorvall de 250 ml. C) Ultracentrífuga SORVALL RC-58 por medio de la cual se descartaba la fase que contenía a los organelos. D) Tubos eppendorf conteniendo el ADN nuclear.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

4.2. CONSTRUCCIÓN DE BANCOS GENÓMICOS DE GUAYABA

La construcción de un Banco Genómico como el de guayaba precisa de varias etapas, que grosso modo permiten la clonación de fragmentos genómicos generados a partir de un evento de fraccionamiento, para su posterior secuenciación o para la búsqueda de genes de interés. Las diferentes fases y su procedimiento se basaron en la metodología descrita por el Doe Joint Genome Institute en su Standard Operating Procedure para la construcción de librerías genómicas.

4.2.1. Fraccionamiento del Banco para Ligación

Una vez que se obtuvo el ADN nuclear de guayaba se fraccionó mediante el equipo Hydroshear (GeneMachines), que fracciona el ADN mecánicamente y al azar (Fig. 3). Se utilizaron 15 µl de ADN equivalentes a 15 µg, diluidos en 100 µl de buffer TE. Para la obtención de fragmentos entre 5 y 7 kb se utilizó el cartucho "standard" del Hydroshear, seleccionando los parámetros: Speed code= 13, No. Cycle= 20, Volume= 100. Antes y después de cada fraccionamiento se hizo un lavado al cartucho con 0.2M HCl (dos veces), 0.2M NaOH (una vez) y TE buffer (una vez). El fraccionamiento se realizó por triplicado, para tener tres eventos independientes. Posteriormente se precipitó y concentró el ADN con 1/10 del volumen de 3M de acetato de sodio pH 6, invirtiendo los tubos para mezclar y se agregó un volumen de etanol frío (reactivo analítico, 96% de pureza), se mezcló nuevamente por inversión y se puso en incubación a -20°C por 30 minutos. Pasado este tiempo se centrifugaron las muestras a 4°C por 20 minutos a 14,000 rpm. Se retiró el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol al 70%, se mezcló por inversión y se hizo una centrifugación por 5 min a 14,000 rpm, realizando un segundo lavado. Finalmente se retiró lo más posible de etanol y se dejó secar la pastilla de ADN por 1 minuto a temperatura ambiente, resuspendiéndola en 30 µl de TE.

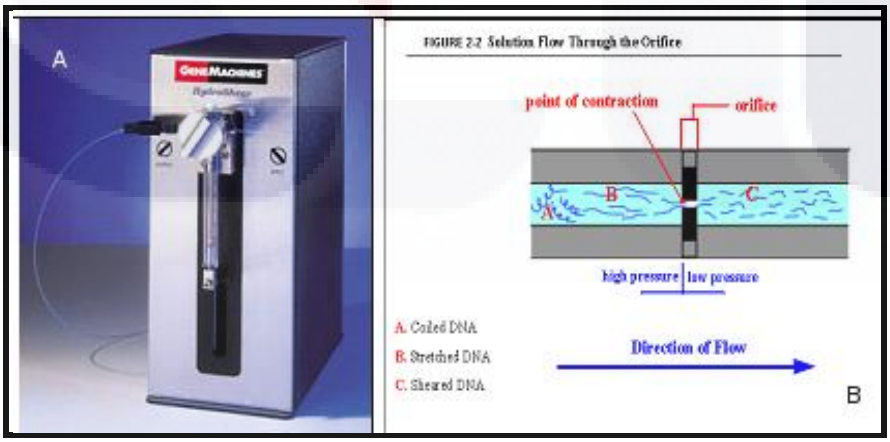


Figura 3. Fraccionamiento de ADN. A) Hydroshear de GeneMachines. B) Modo de acción del Hydroshear, las cadenas de ADN son fragmentadas debido a que atraviesan una zona sometida a gran presión por la contracción de un dispositivo mecánico.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

4.2.2. Purificación de Fragmentos

La separación de los fragmentos de ADN se realizó en un gel de agarosa al 0.8% en TBE, utilizando para su tinción el reactivo SYBR DNA Gel Stain 10000x de INVITROGEN. Tras visualizarse bajo luz fluorescente se cortó el segmento del gel que tenía los fragmentos de 3-7 kb. El gel recién cortado se puso dentro de puntas para micropipeta con filtros resistentes a aerosol a las que se les removió la mayor parte de la punta, adjuntándolas a microtubos simulando un sistema de "columnas". Las columnas se incubaron a -20 °C por 30 min, luego se centrifugaron durante 20 minutos a 14,000 rpm. Las muestras recuperadas en microtubos se precipitaron con 1/10 de acetato de sodio 3 M y un volumen de isopropanol y se dejaron 30 minutos a -20°C, luego se centrifugaron 20 minutos a 14,000 rpm, se tiró el sobrenadante, se hizo un lavado con etanol al 70% y la pastilla se resuspendió en 30 µl de TE. Después se realizó la cuantificación a 260 nm para determinar la cantidad de ADN a reparar.

4.2.3. Reparación de extremos

Al verificar que se tenía una concentración de 1µg/µl de ADN, la reacción de reparación para cada evento de fraccionamiento se ilustra en la Tabla 1.

Tabla 1. Reacción de reparación de los fragmentos de ADN de guayaba purificados

REPARACIÓN	µl
Fragmentos de ADN	10
Reactivo 2 de Invitrogen	25
10mM dNTP	10
Klenow (Invitrogen)	5
T4 DNA polimerasa (Invitrogen)	1
Total	100

Una vez hechas las reacciones se incubaron a 28 °C por 40 minutos. Al terminar la incubación, se realizó una nueva precipitación con 1/10 de acetato de sodio 3 M y un volumen de isopropanol. La muestra se resuspendió en 30 µl de TE. Se realizó una última cuantificación y se procedió a la ligación.

4.2.4. Ligación

La ligación es la unión del vector con el inserto. Se recomienda que la relación molar sea 1:1 (vector-inserto). Después de la purificación y reparación de los fragmentos de ADN, se realizó la lectura a 260 nm para determinar la concentración de la molécula y ajustar la relación molar de acuerdo con la siguiente expresión (Invitrogen, 2004):

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

$$xng\ de\ inserto = \frac{(pb\ del\ fragmento\ mayor)(50\ ng\ del\ vector)}{2958\ pb\ del\ vector\ pBSK +}$$

Sustituyendo los valores correspondientes:

$$xng\ de\ inserto = \frac{(7000pb)(50\ ng\ del\ vector)}{2958\ pb\ del\ vector\ pBSK +} = \mathbf{119\ ng\ de\ inserto}$$

Para una ligación con una concentración molar de 1:1 se requieren 119 ng de inserto por 50 ng de vector. Una vez determinada la cantidad de inserto-vector para la ligación, se realizó la reacción correspondiente, dejándola a 16 °C toda la noche (tabla 2).

Tabla 2. Reacción de ligación para transformación

LIGACIÓN	µl
Vector	1 (50 ng)
Ligasa	1
Agua	6.5
Inserto	0.5 (119 ng)
Buffer	1

4.2.5. Transformación Genética Bacteriana

Antes de efectuar la transformación se dializaron las ligaciones del inserto con el vector a través de una membrana de filtración (Millipore VS de 0.025 nm) por 15 minutos en agua desionizada o destilada. Se depositó por flotación la membrana con la cara brillante hacia arriba y se pipeteó la ligación en el centro de la membrana; se recuperó la gota en un tubo nuevo para proceder a la transformación por electroporación. La transformación se llevó a cabo agregando1 µl de la ligación dializada a 20 µl de células electrocompetentes en una celdilla de 1 cm de la marca BIORAD, esta celdilla se dispuso en el BIORAD Gene Pulser (Fig. 4). El voltaje aplicado en la transformación fue de 2,000, 25 microfaradios y 200 OHM. La duración de las descargas fueron de 4.3 milisegundos en promedio. Las células electrocompetentes fueron de *E. coli* DH10B de Invitrogen.

Se plaquearon 25 µl de la transformación en un medio Luria-Bertani (LB) sólido con 100 mg/L de ampicilina para la selección de transformantes, incubando los cultivos a 37 °C por toda la noche.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Figura 4. Electroporador BIORAD Gene Pulser.

4.2.6. Titulación del Banco Genómico

Para el análisis del banco, se estimó el número de clonas necesarias para cubrir una vez el genoma de la guayaba. Esta estimación se llevó a cabo con la siguiente ecuación (Álvarez, *et al.*, 2009):

$$N = \ln(1-P) / \ln(1-F)$$

Donde:

N= Número de recombinantes necesarios para encontrar la secuencia de interés.

P= Probabilidad de encontrar la secuencia de interés, que en este caso fue de 99%.

F= Proporción del tamaño del vector ligado ($7x10^3$), con respecto al tamaño del haploide del genoma de guayaba que es de $3.003x10^8$ (Kew, Royal Botanical Garden).

Sustituyendo:

$$N = \ln(1-0.99) / \ln(1-(7x10^3 / 3.003x10^8))$$

$$N = 1.98\ x10^5\ ufc/ml$$

Se necesitan $1.98x10^5$ ufc/ml para tener representado una vez el genoma de la guayaba.

4.2.7. Análisis por Restricción de los Bancos Genómicos.

Para comprobar que las librerías genómicas contenían el vector y los insertos de ADN de guayaba se procedió a extraer y purificar el plásmido de la célula huésped (*E. coli* cepa DH10B) por medio de una minipreparación (miniprep) según protocolo reportado por Sambrook y Russell (2001), realizando posteriormente una digestión con EcoRI y con Hind III por 1 hora a 37 °C (Tabla 3). El patrón de restricción fue visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % con TAE 1x como amortiguador. La mezcla de reacción fue la siguiente:

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Tabla 3. Reacción de digestión de ADN plasmídico.

Digestión	µl
ADN plasmídico	5 (5 µg)
Enzima (EcoRI)	0.5µl
Enzima (HindIII)	0.5µl
Buffer 2	1 µl
RNAasa	1 µl
Agua	2 µl
	Total: 10µl

4.3. AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES DE INTERÉS MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

4.3.1. Síntesis de oligonucleótidos

Se efectuó la búsqueda bibliográfica de oligonucleótidos que han sido utilizados por otros investigadores para la amplificación de fragmentos de los genes ACC sintasa, ACC oxidasa, α-expansinas y endoglucanasas. Siguiendo las indicaciones de la literatura reportada (Nakatsuka, *et al.*, 1998., Hiwasa, *et al., 2003.*, Morales, *et al.*, 2009) para la amplificación se usó el kit comercial PCR master mix de fermentas (Tabla 4).

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la identificación y aislamiento de los genes ACC sintasa, ACC oxidasa, α-expansinas y endoglucanasas, así como la fuente bibliográfica de donde fueron tomados y los amplicones que reportó cada autor.

OLIGO NUCLEÓTIDO	SÍMBOLO	SECUENCIA	REFERENCIA
Endoglucanasa Degenerado Forward y Reverse	EGFdeg EGRdeg	TGYTGGARMGICCI GARGAICCIARDA TRTARTCIAYTG	Hiwasa *et al*., 2003.
ACCSintasa Degenerado Forward y Reverse	ACSFdeg ACSRdeg	ATGGGYYTNGCDGA RAAYCAGACNARNC YRAARCTHGACAI	Nakatsuka *et al*., 1998. Fragmento de PCR de 300 pb.
ACCOxidasa Degenerado Forward y Reverse	ACOFdeg ACSRdeg	GCNTHYSARAANTGG GGNTTNGGYTCYTTNG CYTGRAAYTT	Nakatsuka *et al*., 1998.
ACCOxidasa Específico Forward y Reverse	ACOFespCP ACORespCP	GCGTGCAAAACTGG GGCTTTTCTTTCGCCT GAATTT	Nakatsuka *et al*., 1998.
Expansina Degenerado Forward y Reverse	ExP DG1 ExP DG2	GSNCAYGCNACNTTY TAYBGNGYTGCCART TYTGNCCCCARTT	Morales *et al*., 2009.
Expansina Específico Forward y Reverse	LEFT-EXP1 RIGHT-ESP2	GSNCAYGCNACNTTY TAYBGNGYTGCCA RTTYTGNCCCCARTT	Morales *et al*., 2009.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

4.3.2. Condiciones de amplificación

Las condiciones de la amplificación de los genes de α-expansina fueron de 94 °C por 5 minutos (min); 94 °C por 2 min, 50 °C por 1 min, 72 °C por 3 min; 72 °C por 7 min según lo marcado por Morales (2009). Las condiciones de amplificación para los genes de ACC sintasa y ACC oxidasa según Nakatsuka (1998) fueron de 94 °C por 4 min, 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 3 min. Las condiciones para los genes de endoglucanasa (Hiwasa, 2003) fueron de 94 °C por 4 min, 94 °C por 1 min, 55 °C por 2 min, 72 °C por 3 min; 72 °C por 7 min.

4.3.3. Electroforesis

Para resolver el tamaño de los fragmentos amplificados, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% con buffer TAE 1x a 90 volts; el marcador de peso molecular usado fue el Traclt™ 1 kb DNA Ladder de Invitrogen. El gel fue teñido por un minuto en bromuro de etidio y se dejó 15minutos en agua para quitar exceso de bromuro. Posteriormente el gel fue fotografiado bajo luz ultravioleta en el transiluminador DNA Light Dual UV Transiluminator (Labnet).

4.3.4. Secuenciación y Análisis Bioinformático

Se mandaron secuenciar al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO), del CINVESTAV, unidad Guanajuato, fragmentos amplificados por PCR de 0.5 kb y 1.0 kb para endoglucanasa, de 1.0 kb para ACC sintasa y de 1.2 kb para ACC oxidasa, purificados con el Zymoclean™ DNA Recovery Kit de la marca FERMENTAS. La secuencia nucleótidos obtenida se tradujo a aminoácidos mediante Translate Tool del *Expert Protein Analysis System* (ExPASy) del Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) (http://expasy.org/tools/dna.html), con la finalidad de realizar un alineamiento local (blastp) con otras secuencias de aminoácidos en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov) para determinar el porcentaje de identidad con otras proteínas.

4.4. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CLONAS GENÓMICAS EN EL BANCO GENÓMICO DE GUAYABA

La selección se realizó mediante escrutinios con PCR, técnica descrita y utilizada por King (2000). Del banco genómico original crecido en medio LB y ampicilina (100mg/L), se tomó una alícuota para realizar un sondeo inicial por PCR y asegurar que los genes de interés estaban representados en el banco genómico. Una vez que los genes hubieron amplificado, se tomaron subcultivos del banco original (alícuotas de 30 µl en 3 ml de LB con ampicilina) y de cada uno de ellos se obtuvo el plásmido purificado por medio de MINIPREP (Sambrook y Russell, 2001), luego se corrió un PCR con este ADN, utilizando los oligonucleótidos del gen que se quería encontrar. Una vez que se comprobó que algunos de los cultivos fueron positivos, se realizó el mismo procedimiento que se aplicó para el

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

cultivo del banco genómico original, de esta manera se llevaron a cabo 4 escrutinios, hasta que en el quinto se procedió a plaquear en medio sólido de LB con ampicilina realizando diluciones del último subcultivo positivo, de tal manera que las colonias crecieran aisladas para ser analizadas de manera independiente, identificando así una clona positiva del gen buscado.

4.5. ANÁLISIS TIPO SOUTHERN BLOT DE LOS BANCOS GENÓMICOS

Se aisló el ADN plasmídico de cada uno de los bancos genómicos por medio de miniprep del cual se tomaron 50 µg, que fueron digeridos con la enzima de restricción BamHI por dos horas a 37 °C (Tabla 5). El PCR purificado de los genes de interés en ADN nuclear se utilizó como sonda. Posteriormente las digestiones y sus sondas se cargaron en un gel para realizar una electroforesis. El amortiguador utilizado fue TAE 1X, el voltaje utilizado fue de 70 volts, el gel fue teñido en bromuro de etidio y la fotografía se tomó con una regla al margen del gel para tener la referencia del tamaño de las bandas (Fig. 15, A). La realización de este análisis involucró varias fases, las cuales se describen a continuación:

Tabla 5. Digestión de ADN plasmídico extraído de Banco Genómico para Southern Blot

Digestión	µl
ADN Banco	18 (50 µg)
Enzima BamHI	4 µl
Buffer 3	10 µl
RNAasa	2 µl
Agua	68 µl
	Total: 100µl

4.5.1. Tratamiento del gel

Antes de llevar a cabo la transferencia, el gel fue sometido a un tratamiento con HCl a 0.2M por 10 minutos, luego a dos lavados con agua destilada; en seguida se le agregó la solución desnaturalizante (NaOH 0.5N y NaCl 1.5M) haciéndole dos lavados de 20 minutos en agitación lenta, se enjuagó el gel con agua destilada y luego se procedió a hacer dos lavados de 20 minutos con la solución neutralizante (Tris-HCl 1M pH 8 y NaCl 1.5M) para finalmente realizar un lavado con agua destilada por 10 minutos, todo esto a temperatura ambiente.

4.5.2. Transferencia a membrana

Luego de su tratamiento, el gel se colocó hacia abajo en un papel filtro en contacto con la solución SSPE 10X que sirvió como eluyente y encima del gel se puso directamente una membrana nylon (Hybond N+, de Amersham). Esta membrana fue cubierta con tres papeles filtro 2 mm más cortos que la membrana, toallas absorbentes y un peso extra para que por capilaridad el ADN desnaturalizado se transfiriera a la membrana. Este proceso duró toda la noche.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

4.5.3. Hibridación

Al día siguiente el ADN transferido se fijó a la membrana por medio de UV. La preparación de la sonda y el buffer de hibridación se realizó siguiendo el protocolo adjunto al kit de hibridación Alkaphos de LG, dejando hibridar toda la noche. La última etapa de la hibridación fueron los lavados, el primero de ellos se realizó con el buffer primario por 20 minutos que contenía urea 2M, SDS al 0.1%, buffer de fosfatos pH 7, NaCl 150 mM, $MgCl_2$ 1 mM y reactivo bloqueador al 0.2%, el lavado con buffer secundario con Tris base 1M y NaCl 2M se llevó a cabo por 10 minutos. Luego de los lavados se agregó a la membrana un reactivo de detección por 5 minutos y se colocó dentro de un cassette para su exposición por una hora a una película de rayos X de marca Kodak, pasado el tiempo de exposición la película fue sometida a un proceso de revelado y fijado para la visualización de las marcas de hibridación.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

5. RESULTADOS

5.1. EXTRACCION DE ADN NUCLEAR

La cantidad de ADN nuclear obtenida a partir de 100 g de fruto de guayaba fue de 1µg/µl y la calidad de la molécula aplicando la relación 260/280 fue de 2.1 (Fig. 5).

Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de ADN nuclear de fruto inmaduro de guayaba, procedimiento tomado de Peterson *et al.*, (1997) y Vishal *et al.*, (2007).

5.2. BANCOS GENÓMICOS DE GUAYABA

5.2.1. Titulación de los Bancos

Se construyeron cuatro bancos genómicos de guayaba (Fig. 6) la titulación de cada uno de ellos fue de $2x10^2$ (Banco 2), $4x10^3$ (Banco 1), $1x10^4$ (Banco 3) y $3x10^4$ (Banco 4) ufc por ml.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

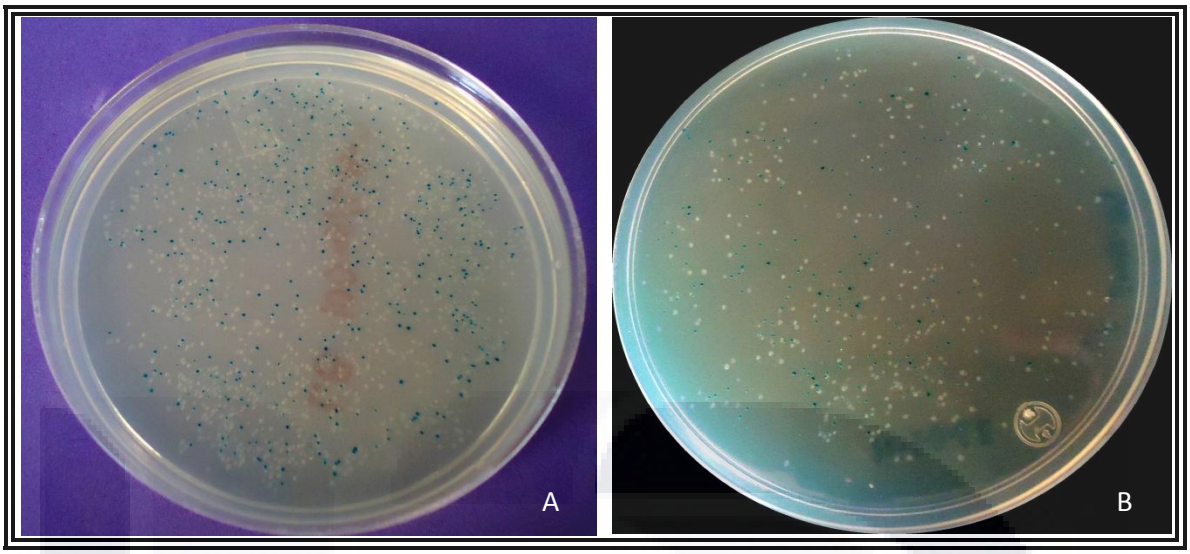


Figura 6. Dos de las cuatro librerías que se generaron a partir de ADN nuclear de guayaba. A) Banco 4 con $3x10^4$ ufc/ml; B) Banco 1 con $4x10^3$ ufc/ml.

5.2.2. Análisis por Restricción de los Bancos Genómicos

En cada una de las digestiones de los bancos genómicos, se verificó la presencia del vector y del inserto. La banda de 3 kb presente en cada una de las digestiones (D de la figura 7) corresponde aproximadamente al peso del vector pBluescript + (2984 pb) con el que fueron construidos los bancos genómicos. Por otra parte, las bandas correspondientes al inserto muestran un tamaño de 2 kb y de 3 a más de 12 kb, concentrándose en un rango de 3 a 6 kb principalmente (Fig. 7).

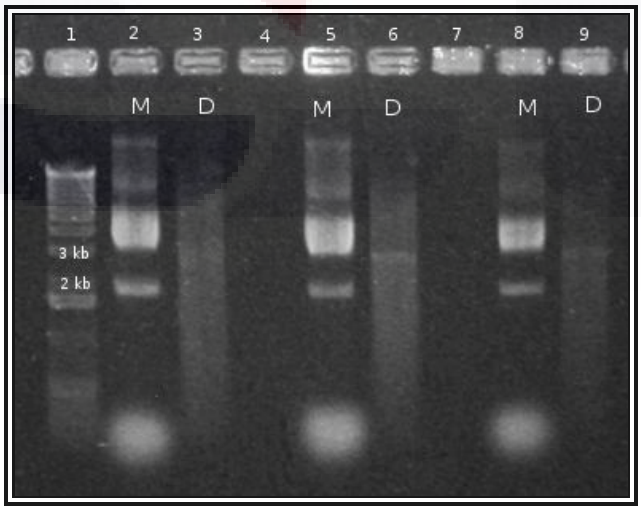


Figura 7. Bandas de plásmido purificado (carriles 2, 5 y 8) y digestiones de los bancos genómicos (carriles 3, 6, 9).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

5.3. OBTENCIÓN DE PRODUCTOS DE PCR DE LOS GENES ACC SINTASA, ACC OXIDASA, ALFA EXPANSINA Y ENDOGLUCANASA

5.3.1. Análisis del Banco Genómico por PCR

La comprobación de la presencia de los genes de ACC sintasa, ACC oxidasa, endoglucanasa y α-expansina en ADN nuclear y en ADN del banco genómico de guayaba se realizó con la técnica de PCR. Los fragmentos amplificados utilizando oligonucleótidos degenerados para endoglucanasa en ADN nuclear fueron fragmentos de 0.3, 0.4, 0.5, 1.0, 1.2 y 1.3 kb y mientras que en el banco genómico se observa un producto de 0.5kb (Fig. 8).

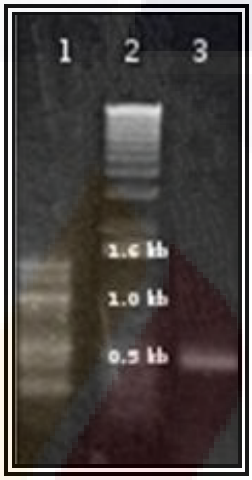


Figura 8. PCR para endoglucanasa Carril 1) ADN nuclear. Carril 2) marcador de peso molecular. Carril 3**)** ADN del banco genómico.

Para α-expansina el producto de amplificación resultó de 1.0 kb en ADN nuclear y de 0.5 kb en el banco genómico (Fig. 9).

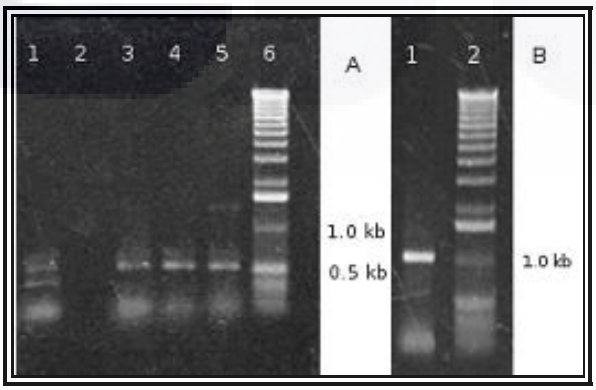


Figura 9. Productos de PCR de α-Expansina. A) ADN del banco genómico. B) ADN nuclear.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Para ACC sintasa, se obtuvieron los siguientes productos de amplificación: 0.5, 0.8, 1.3, 1.4, 2.2 kb en ADN nuclear. En ADN del banco se obtuvieron productos de 1.0 y 1.6 kb (Fig. 10).

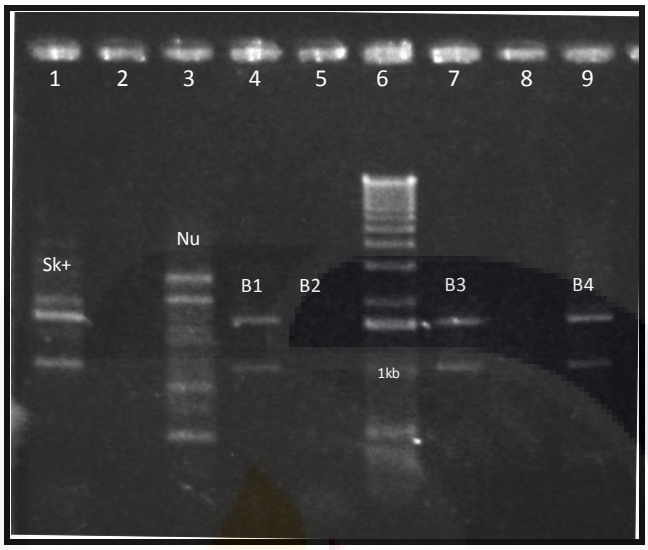


Figura 10. Productos de PCR para ACC sintasa. Carriles 2, 5, 7 en ADN del banco. Carril 1) ADN nuclear. Carril 4) marcador de peso molecular.

Finalmente para ACC oxidasa no se obtuvo amplificación en ADN del banco y los productos de PCR resultantes en ADN nuclear fueron de 1.2 kb y 1.6 kb (Fig. 11).

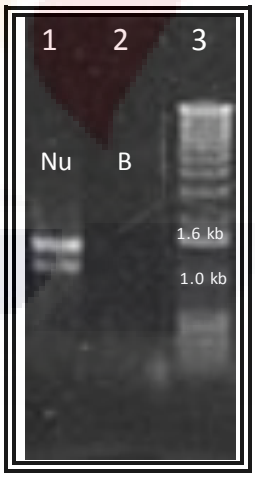


Figura 11. Productos de PCR para ACC oxidasa. Carril 1) ADN nuclear. Carril 2) ADN del banco. Carril 3) marcador de peso molecular.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

5.3.2. Secuenciación y Análisis Bioinformático

De los fragmentos amplificados de los diferentes genes que se enviaron a LANGEBIO para su secuenciación, sólo se obtuvo la secuencia de la endoglucanasa de 1.0 kb., que fue traducida a aminoácidos por medio del servidor ExPASy (Fig. 12).

PLSAAAERLICRAEVIGVGRQQERRARHVLHVVPLADVQAGRGAAHVGRVVLVEASAQVVLGLGAVPFQDSPVRL
VFRSIVHQQLHPKSDXKRRSIKS_CSNKEQRERESGIPWRREFGRRRSPASKFSPPWYATLSLSLLFIAALTLD_STFXIG
FWVQLLMDDGAKHEPHRRILERYRSKAEHYLCACLNKNNATNVRRTPAGLLYVRKWNNMQYVSGAAFLLSAYSD
HLRAANQTLGCSRER

Figura 12. Secuencia en aminoácidos de un fragmentos de EG de 1.0 kb

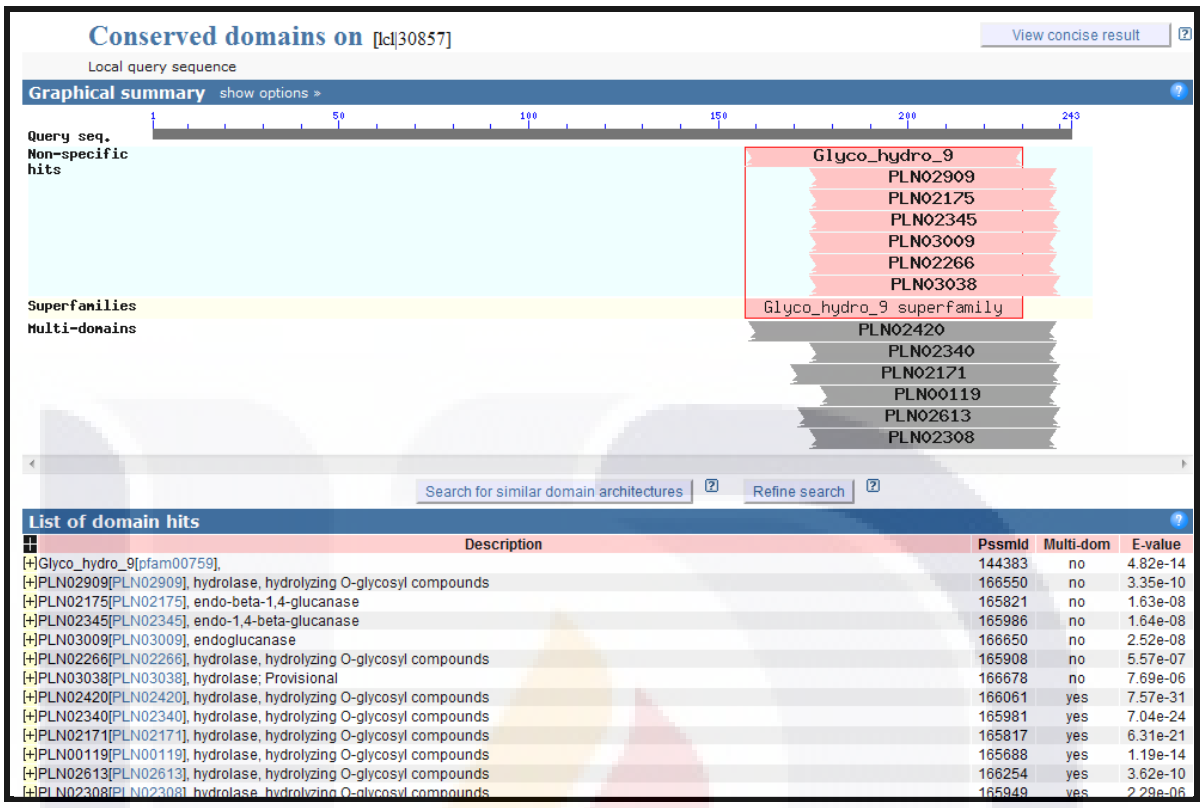
Esta secuencia se consultó en la base de datos del NCBI, mediante un alineamiento local (blastp). Las homologías encontradas presentan un dominio conservado de superfamilia 9 de las hidrolasas (Fig. 13), y son las siguientes: *Solanum lycopersicum* (34%, valor *e* de 3×10^{-14}), *Diospyros kaki* (34%, valor *e* de 4×10^{-13}), *Vitis vinifera* (33%, valor *e* de 4×10^{-26}), *Pyrus communis* (31%, valor *e* de 6×10^{-14}), *Mangifera indica* (31%, valor *e* de 5×10^{-13}), *Arabidopsis thaliana* (30%, valor *e* de 2×10^{-12}) y *Prunus persica* (27%, valor *e* de 1×10^{-13}) (Tabla 5).

Tabla 5. Valores de similaridad de endoglucanasas contra producto de 1 kb de PCR

	% de identidad	**Valor *e***
Solanum lycopersicum	34	3×10^{-14}
Diospyros kaki	34	4×10^{-13}
Vitis vinifera	33	5×10^{-26}
Pyrus communis	31	6×10^{-14}
Mangifera indica	31	5×10^{-13}
Arabidopsis thaliana	30	2×10^{-12}
Prunus persica	27	2×10^{-13}

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS



Description	PssmId	Multi-dom	E-value
[+]Glyco_hydro_9[pfam00759],	144383	no	4.82e-14
[+]PLN02909[PLN02909], hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	166550	no	3.35e-10
[+]PLN02175[PLN02175], endo-beta-1,4-glucanase	165821	no	1.63e-08
[+]PLN02345[PLN02345], endo-1,4-beta-glucanase	165986	no	1.64e-08
[+]PLN03009[PLN03009], endoglucanase	166650	no	2.52e-08
[+]PLN02266[PLN02266], hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	165908	no	5.57e-07
[+]PLN03038[PLN03038], hydrolase; Provisional	166678	no	7.69e-06
[+]PLN02420[PLN02420], hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	166061	yes	7.57e-31
[+]PLN02340[PLN02340], hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	165981	yes	7.04e-24
[+]PLN02171[PLN02171], hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	165817	yes	6.31e-21
[+]PLN00119[PLN00119], hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	165688	yes	1.19e-14
[+]PLN02613[PLN02613], hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	166254	yes	3.62e-10
[+]PLN02308[PLN02308], hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	165949	yes	2.29e-06

Figura 13. Dominio Conservado de la Familia 9 de las hidrolasas.

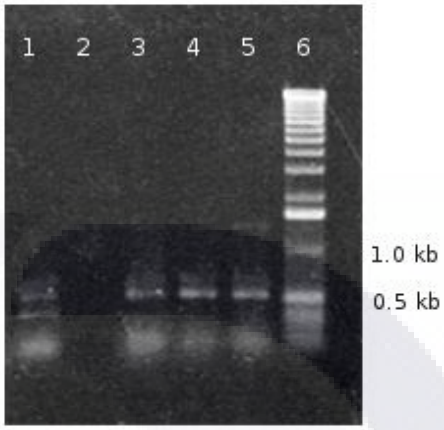
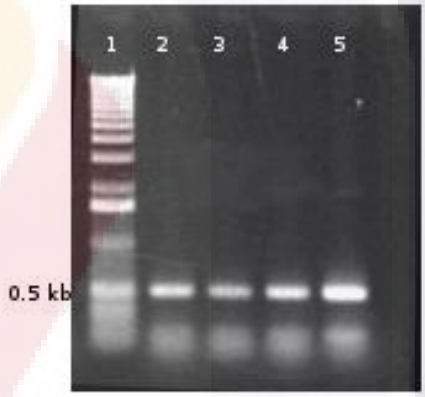
5.4. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CLONAS GENÓMICAS

El aislamiento de las clonas se realizó mediante escrutinios por PCR, según protocolo mencionado en el apartado de metodología. El quinto escrutinio corresponde a las clonas aisladas (Tabla 6). Los tamaños aproximados de las clonas aisladas de ACC sintasa en el laboratorio son de 4 kb y de 3.5 kb. El tamaño de la clona aislada en el laboratorio y que corresponde a una endoglucanasa, fue de 2.4 a 3.0 kb. Por su parte el tamaño del inserto para las α-expansinas fue de 1.0 kb (Fig. 14).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Tabla 6. Escrutinios por PCR correspondientes a α-expansina, endoglucanasa y ACC sintasa.

Gen	Foto
α-expansina Primer escrutinio	
Endoglucanasa Quinto escrutinio	

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

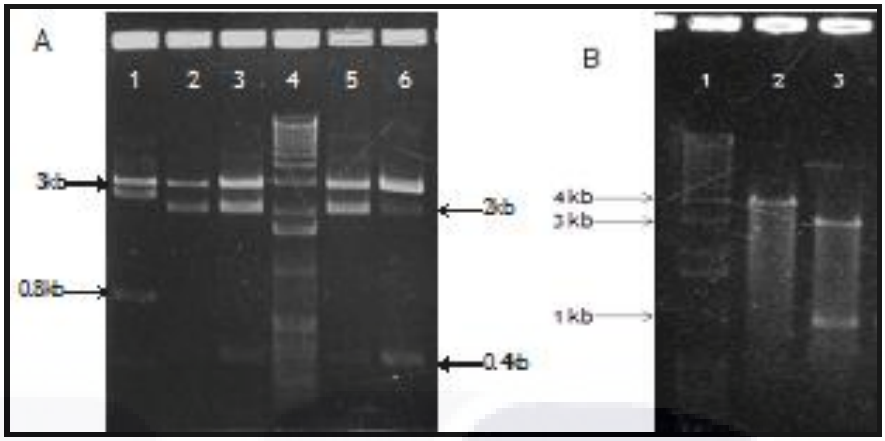


Figura 14. Análisis de restricción de clonas seleccionadas. (A) Clonas de endoglucanasa digeridas por EcoR1 y HindIII; la banda de aproximadamented 3 kb corresponde al vector y las bandas de 2, 0.4 y 0,8 kb al inserto; (B) Clonas de α-expansina digeridas con las mismas enzimas, obteniendo un inserto de 1 kb.

5.5. ANALISIS TIPO SOUTHERN BLOT EN BANCO GENÓMICO

Para verificar la funcionalidad de los bancos genómicos se realizó un análisis tipo Southern Blot, donde los cuatro bancos genómicos construidos se digirieron con la enzima Bam HI y se hibridaron con cada uno de los genes de estudio. Los resultados obtenidos mostraron que la endoglucanasa está presente por lo menos en dos copias en los bancos 1, 3 y 4, como se puede apreciar con las bandas de 6 y 12 kb en la Fig. 13.B. Para ACC sintasa, se puede observar que muy probablemente en el banco 1 están representadas 2 copias (bandas de 5 y 12 kb), mientras que en los bancos 3 y 4, sólo hay una copia presente: en el banco 3 de 5 kb y en el banco 4 de 11 kb (Fig. 15.D.). Para la α-expansina, en los bancos 1 y 4, se aprecian con claridad cuatro bandas: 3 kb, 4 kb, 10 kb y 12 kb. En el banco 2, bandas de 3 y 4 kb, y en el banco 3, bandas de 3, 10 y 12 kb (Fig. 15.C.). Estos resultados sugieren que puede haber de 2 a 4 copias de α-expansina en estos bancos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

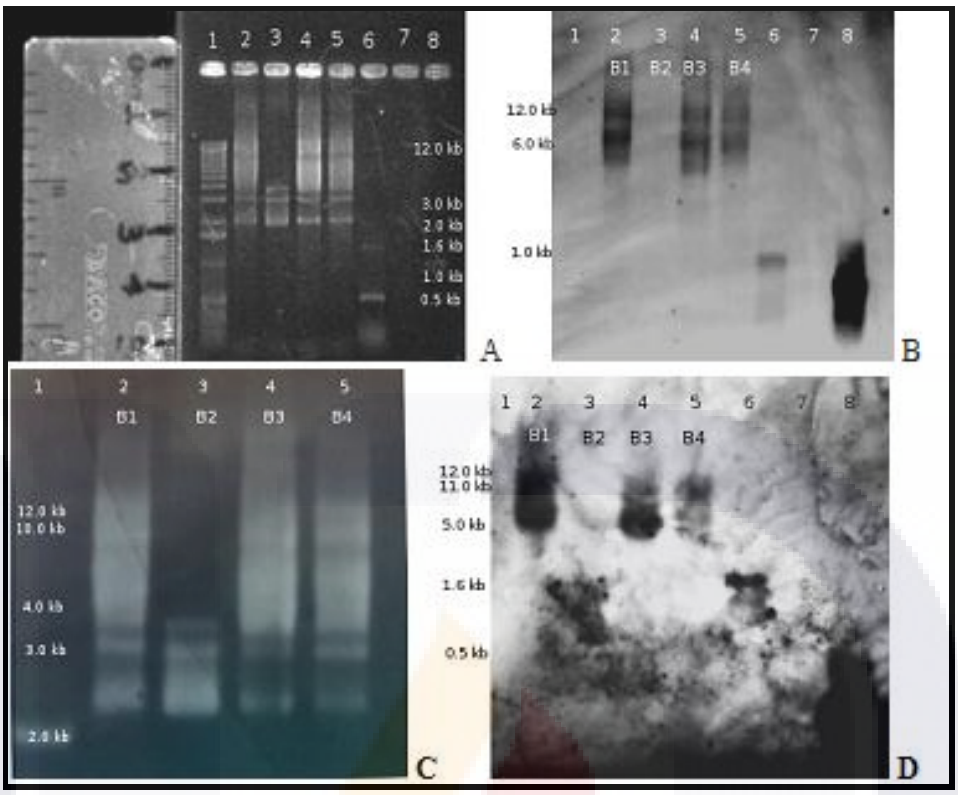


Figura 15. Southern blot de los bancos genómicos para cada uno de los genes de estudio. A) Electroforesis en gel de agarosa de las digestiones de cada uno de los bancos. B) Southern Blot para endoglucanasa. C) Southern Blot para α-expansina. D) Southern Blot para ACC sintasa.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

6. DISCUSIÓN

La pureza de 2.1 del ADN nuclear resultó aceptable según puntualiza Siedman (1991) con relación a la construcción del banco ya que se debe cuidar la calidad tanto del inserto como del vector, esto permite la correcta reparación de extremos y una ligación eficiente. El fraccionamiento del ADN nuclear se hizo por triplicado utilizando el equipo Hydroshear (GeneMachines). La validación del banco se realizó mediante la electroforesis de un alícuota del banco en gel de agarosa, detectando la presencia de insertos de varios tamaños desde 2 hasta más de 12 kb, concentrándose la mayoría en un rango de 3 a 6 kb requeridos para el experimento (Fig. 7). Este rango fue el adecuado para la construcción del banco, ya que por ejemplo el tamaño de las clonas genómicas que han sido reportadas para endoglucanasa es de 5445 pb, aislado en pera por Trainotti *et al*., (1997). Huang *et al*., (2006) para plátano, menciona dos clonas nombradas como GMACS-12 y GMACS-1 que tenían un tamaño de 2.5 kb y 4.5 kb respectivamente.

Para anticipar la posibilidad de aislar una determinada secuencia dentro de los bancos genómicos, se usó la expresión N= ln (1-P)/ ln (1-F) la cual toma en cuenta la probabilidad de encontrar la secuencia de interés, que en este caso fue de 99% (P). La proporción del tamaño del vector ligado (7×10^3), con respecto al tamaño del haploide del genoma de guayaba (F) que es de 3.003×10^8, determinado a partir del valor C por medio de la página del Kew Royal Botanical Garden. Por tanto, el número de recombinantes necesarios para encontrar la secuencia de interés en los bancos sería de 1.98×10^5 ufc/ml. En los cuatro bancos que se construyeron se obtuvieron titulaciones de 2×10^2, 4×10^3, 1×10^4 y 3×10^4 ufc por ml, que aun cuando están por debajo de la cifra recomendada de 1.98 $x10^5$ ufc/ml (Alvarez *et a.*, 2009), y esto supondría una baja probabilidad de encontrar las secuencias de interés, fue posible identificar en los bancos genómicos tres de los cuatro genes relacionados con los objetivos de este trabajo.

La identificación de los genes de interés (endoglucanasa, α-expansina, ACC sintasa, ACC oxidasa) se realizó mediante la técnica de PCR utilizando dos fuentes de ADN, el nuclear y el de banco genómico. Para endoglucanasa el bandeo correspondiente a los dos tipos de ADN, mostró significativas diferencias, ya que en nuclear se dispersa en el rango de 0.3, 0.4, 0.5, 1.0, 1.2 y 1.3 kb, mientras que en el banco genómico se generó un producto de 0.5 kb (Fig. 8). Para α-expansina el producto de amplificación fue de 1.0 kb en ADN nuclear y de 0.5 kb en el banco, con excepción del banco 1 que además de la de 0.5 kb, también se generó una de 0.4 kb (Fig. 9). Para ACC sintasa, se tuvo un rango de amplificación de 0.5, 0.8, 1.3, 1.4, 2.2 kb en ADN nuclear y de 1.0 y 1.6 kb en ADN de banco (Fig. 10). Es posible que las diferencias que se presentan en los tamaños de los productos amplificados para los dos tipos de ADN se deban al proceso que sufrió el ADN nuclear cuando fragmentos mayores y menores de 3-7 kb fueron removidos para la construcción del banco, así como al proceso de clonación al cual fue sometido, ya que no todos los fragmentos se ligaron al vector.

El análisis bioinformático del único fragmento de PCR del que se obtuvo la secuencia de nucleótidos (1 kb de endoglucanasa en ADN nuclear -Fig. 12-) y que

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

posterirmente se tradujo a aminoácidos mostró varias homologías, (Tabla 5). De entre ellas, la que corresponde a *Pyrus communis* resulta interesante ya que al rastrear el número de acceso BAC22691, se encontró también una similitud con la clona PC-EG2 aislada en ADN de pera por Hiwasa *et al*., (2002) que se expresa durante la maduración del fruto y de cuyo reporte se mandaron sintetizar los oligonucleótidos utilizados en este trabajo. Cabe hacer mención que las clonas aisladas para este gen en laboratorio tuvieron un rango de inserto de 3kb (Fig. 14). Hiwasa *et al*., (2002) en el trabajo antes mencionado, reportan la secuencia de aminoácidos de dos clonas, PC-EG1 (2242 pb) y PC-EG2 (2442 pb). PC-EG2 presentó en el N-terminal una secuencia señal hidrofóbica homóloga a la encontrada en fresa (FaEG3) y en tomate (Cel8) (Trainotti, 2006), que también se expresan durante la maduración del fruto. PC-EG1 en el N-terminal se encontró un dominio hidrofóbico transmembranal, homólogo al descrito en tomate (Cel3) y en *Arabidopsis* (OR16pep) que intervienen en la síntesis de celulosa y se localizan en la membrana plasmática. Debido a que la cantidad de mRNA, producto de estos genes, aumenta al inicio de la maduración y se ve fuertemente afectada en presencia de un inhibidor del etileno como el 1-MCP (1-metilciclopropano), se sugiere que estos genes son etileno-dependientes, por lo que se puede pensar que hay una alta probabilidad de que los genes que amplifican en guayaba sean de endoglucanasas dependientes de etileno y que tal vez uno o más de ellos estén involucrados en la maduración del fruto de guayaba. Otros reportes incluyen a Trainotti *et al.*, (1997) que menciona que las endoglucanasas identificadas en durazno, chile, aguacate y jitomate responden a diferentes estímulos hormonales, por lo que en presencia de etileno se pueden encontrar EGasas sensibles o insensibles. Este autor menciona la clona aislada ppEG1 a partir del cDNA pCel10 que codifica para una endoglucanasa de durazno de 5445 pb, que contiene 7 exones y 6 intrones. El marco de lectura abierta codifica para un polipéptido de 497 aminoácidos y presenta un péptido señal de 28 aminoácidos en el N-terminal, característico de las proteínas secretoras. El patrón de expresión de este gen indicó que está sobreregulado por el etileno y que codifica para una EGasa que se expresa durante la abscisión de las hojas y un poco menos en la abscisión de los frutos, al igual que en fruto sobremaduro cooperando con las poligalacturonasas en el ablandamiento del mesocarpio. En mango, Amita *et al.*, (2008) identificaron un cDNA (MiCel1) que amplificaba un fragmento por RT-PCR de 800pb y un genómico de 2,345 pb, el marco de lectura abierta comprendía 1,857 bases, el extremo 5´ de la región no codificante (UTR) tuvo un tamaño de 221 nucleótidos y una 3´-UTR de 264 nucleótidos. La proteína putativa de 619 aminoácidos tenía un péptido señal N-terminal de 25 aminoácidos y un sitio N-glucosilación que correspondía a los residuos 551-553 (NKS) en la proteína madura. Presentaba también un dominio de unión a celulosa en el carbono terminal, que es característico de EGasas microbianas pero que ha sido reportado también en plantas.

Una banda de 1 kb para α-expansina en ADN nuclear y 0.5 kb en el ADN de los banco genómicos, además de una banda de 0.4 kb solamente en el banco 1 fueron amplificados por PCR (Fig. 9). Utilizando los mismos oligonucleótidos degenerados, se obtuvieron cDNAs de 470 pb (PgEXP1), 466 pb (PgEXP2), 360 pb (PgEXP3) que codificaron para proteínas putativas de α-expansinas (Reyes, 2011). Estos tamaños concuerdan con los obtenidos en el banco. Por otra parte, el tamaño del producto amplificado en ADN nuclear concuerda con los resultados de Rose *et al.*, (1997) y con estudios previos en laboratorio (Morales, 2009), debido a que se utilizaron oligonucléotidos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

específicos para una expansina relacionada con la maduración. Ambos, Rose *et al*., 1997 y Morales *et al*., 2009, aislaron cDNAs de tamaño similar 1070 pb y 933 pb, en tomate y guayaba respectivamente. Un estudio por restricción de las clonas positivas que se aislaron en los bancos genómicos para este gen mostraron un tamaño de inserto promedio de 1 kb (Fig. 14). Es importante mencionar que aunque se visualicen estos fragmentos, no quiere decir que sea un gen completo de α-expansina, ya que en el mismo inserto pueden ir regiones de dos genes adyacentes. En la literatura ya hay varios reportes de clonas aisladas de α-expansina. Nishiyama *et al*., 2007, reportan la clona CmExp1 en melón que presenta un patrón de expresión parcialmente dependiente del etileno, lo que implica que aunque no juega un papel primordial en el ablandamiento del fruto sí se ve influida por este regulador durante la maduración. Cho *et al*., (2004) mencionan que la familia de α-expansinas contiene entre otros, 32 genes en arroz y 26 en *Arabidopsis* y que las clonas de α-expansina identificadas en tomate, LeExp1 y LeExp18 se expresan durante la maduración del fruto. LeEXP1 fue la primera que se reportó en la que su expresión estaba inducida de forma específica durante la maduración del fruto y estaba sobrerregulada por la presencia de etileno endógeno y exógeno. En el trabajo de Karaasla & Hrazdina, (2009) la clona PcExp2 identificada en cereza es regulada por el etileno durante la maduración. Esta clona posee un tamaño de 2596 pb, de la que se obtuvo un promotor putativo, con 929 pb de la región río arriba de un gen de expansina y un marco de lectura abierta de 1667 pb intercalada por 2 intrones. La secuencia del cDNA confirmó un fragmento que codifica para dos intrones, tres intrones y una región promotora de 929 pb. La región no codificante (UTR) 5' de 74 pb y la UTR 3' de 248 pb. La región promotora de *Prunus cerasus* (PcExp2) y *Pirus communis* (PcoExp2) fueron las únicas que mostraron similaridad. Este promotor contiene la caja TATA a -38 pb de sitio de inicio de la transcripción, considerada como una característica de los promotores eucariotas. La región río arriba presenta secuencias consenso para la caja CCAAT-, caja GATA, caja de pirimidina, elementos de respuesta a etileno, factores para giberilina, elementos de anaerobiosis, activadores de transcripción y elementos *cis* que le confieren la especificidad a cierto tipo de tejido. Una región de 350 pb de este promotor es requerida para la expresión génica.

Con respecto a la amplificación de la ACC sintasa, se obtuvieron en ADN nuclear una serie de bandas que van desde 0.5, 0.8, 1.3, 1.4 hasta 2.2 kb; en ADN de banco se obtuvieron productos de 1.0 y 1.6 kb (Fig. 10). En su trabajo acerca de genes de maduración en tomate, Nakatsuka *et al*., (1998) mencionan que entre los productos de PCR que obtuvieron, se encontró un cDNA parcial de 308 pb que después fue completado por PCR-RACE. En laboratorio se utilizaron los mismos oligonucleótidos que reporta en su trabajo este equipo de investigación así que se utilizó la banda más pequeña que amplificó de ACCS como sonda para los bancos, teniendo en cuenta que los productos de PCR pequeños podrían corresponder con alguno de los genes de ACC sintasa que Nakatsuka *et al*., (1998) logró aislar e identificar (LE-ACS1A, LE-ACS2, LE-ACS3, LE-ACS4 y LE-ACS6). Otros reportes de genes de ACC sintasa involucrados en la maduración provienen de Huang *et al*., (2006), ya que en plátano aislaron las clonas nombradas como GMACS-12 (2.5 kb) y GMACS-1 (4.5 kb). En el trabajo de Nakatsuka *et* al., (1998) del cual se aisló un cDNA de ACCSintasa en tomate (LE-ACS6), de tamaño 1431 pb. Wang *et al.*, (2006) mencionan que las proteínas de la ACC sintasa son idénticas entre 48% y 97%, con el menor aumento de conservación en el dominio de la terminal C, y con siete regiones

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

altamente conservadas incluyendo los sitios PLP en la secuencia de aminoácidos. Las regiones conservadas incluyen el sitio de unión al piridoxal fosfato que se necesita para la función de ACC sintasa y una secuencia en el Cproximal de 12 aminoácidos. Fong-Chi *et al.*, (2006) aislaron 29 clonas genómicas de plátano, de las cuales 16 contenían promotor. Estos fueron divididos en cuatro grupos MACS1 con 5 secuencias genómicas sobrelapadas, MACS2 con 6 secuencias genómicas sobrelapadas, MACS3 con 4 secuencias genómicas sobrelapadas y MACS4 con 1 secuencia genómica. Las 16 clonas fueron parcialmente secuenciadas, mostrando los datos que las secuencias de los genómicos eran ligeramente diferentes, esto quizá debido a la naturaleza triploide del plátano. Las secuencias parciales de las 16 clonas genómicas mostraron poca diferencia entre los genes del mismo grupo. Huang et al,. (2006) propone que esto es debido a la diferencia alélica en el genoma del plátano. Entre los grupos de genes el porcentaje de divergencia es de 50 a 80%. Por su parte Jakubowicz *et al.*, (2009) reportan que se detectaron en tomate cuatro diferentes isoenzimas: LE-ACS1A, LE-ACS2, LE-ACS4 y LE-ACSr. LE-ACS1A y LE-ACS6 pertenecen al sistema 1, en cambio LE-ACS2 y LE-ACS4 al sistema 2 y que todos ellos muestran distinta regulación. Lin *et al.*, (2007) se refieren al gen Le-ACS6 como una ACC sintasa involucrada en el sistema 1 de la síntesis del etileno durante la maduración del tomate, pero afirma que el mecanismo de regulación negativa de Le-ACS6 no es claro. El-Sharkawy *et al.*, (2008) reporta cuatro secuencias de ACC sintasa de ciruela, para evaluar el papel de estas proteínas en la maduración de frutos. Todas estas isoenzimas contienen las siete cajas conservadas que están presentes en *Arabidopsis*, tomate, y otras especies. Asimismo, menciona que existe una fuerte similaridad entre las secuencias de la ciruela y la pera (de 89 a 93%). Esta semejanza indica que muy probablemente estas secuencias pertenecen a genes ortólogos. En ACC sintasa de ciruela, los productos de PCR, observados en gel de agarosa al 1.2%, produjeron bandas de 1409 pb y 646 pb para dos estas secuencias.

El análisis tipo Southern blot fue muy importante para la comprobar la funcionalidad de los bancos ya que los genes bajo estudio hibridaron casi en la mayor parte de ellos (Fig. 15). Para el gen de endoglucanasa se utilizó como sonda el producto de PCR de 1 kb el cual hibridó en los bancos 1, 3 4, así como en un PCR control proveniente de uno los escrutinios. El que no se presente hibridación en el banco 2 puede reflejar el hecho de que su eficiencia haya sido la más baja (2×10^2) obtenida en los bancos. El gen de α-expansina estuvo presente en todos los bancos y la sonda que se utilizó para la hibridación fue la de 1 kb. Por último para realizar la hibridación de ACC sintasa con los bancos se utilizó una sonda de 0.5 kb, comprobando su presencia en los bancos 1, 3 y 4, que igual que para endoglucanasa la falta de señal de hibración pudo deberse a su baja eficiencia. De estos resultados se puede afirmar que el gen o genes de endoglucanasa, α-expansina y ACC sintasa están presentes al menos en una copia dentro de los bancos genómicos de guayaba.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

7. CONCLUSIONES

- Se construyeron cuatro bancos genómicos de guayaba con una eficiencia tal que permitió la búsqueda de los genes codificantes de ACC sintasa, α-expansina y endoglucanasa.

- La presencia de ACC sintasas, ACC oxidasas, α-expansinas y endoglucanasas en ADN nuclear de guayaba, fue confirmada por medio de la técnica de PCR.

- La presencia de ACC sintasas, α-expansinas y endoglucanasas en los bancos genómicos de guayaba fue confirmada por un análisis tipo Southern Blot. El resultado del Southern Blot muestra que por lo menos hay una copia de cada uno de estos tres genes en los bancos.

- Fue posible aislar clonas positivas para ACC sintasas, α-expansinas y endoglucanasas con diferentes tamaños de inserto.

- Los alcances de este trabajo se centran en la caracterización de clonas positivas de estos genes aisladas de los bancos genómicos de guayaba, buscando con esto una mejor comprensión de los procesos moleculares relacionados con estos genes durante la maduración del fruto.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

APÉNDICE

MEDIOS DE CULTIVO

LB líquido (1 Lt) con 100 mg/L de ampicilina

Extracto de levadura	5 g
Peptona	10 g
NaCl	10 g

LB sólido (1 Lt) con 100 mg/L de ampicilina

Extracto de levadura	5 g
Peptona	10 g
NaCl	10 g
Agar	12 g

BUFFERS

Buffer de corrida

Azul de bromofenol	0.25 %
Cianol de xileno	0.25 %
Glicerol en agua	30 %

Buffer de lisis para extracción de ADN nuclear (1 L)

1 M 2-Metil-2,4-pentanediol (MPD)	128.18 ml
2 % Polivinilpirrolidona (PVP)	20 g
10 mM $MgCl_2$	2 g
Dietilditiocarbamato	5 g
1 M Lisina	36.5 g
0.5 M EDTA ó EGTA	12 ml
Metabisulfito	1.9 g
Tritón	5 ml

Buffer de lisis para extracción de ADN genómico (50 ml)

1 M Tris HCl	5 ml
5 M NaCl	14 ml
0.5 M EDTA	2 ml
5 % CTAB	20 ml (2 %)

Aforar a 50 ml y agregar 0.15 ml de β-mercaptoetanol

Buffer de fosfatos (50 ml)

0.5 M Fosfato de Na	3 g

Ajustar a pH 7 con NaOH y guardar a 4 °C

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Buffer de hibridación (50 ml)

0.5 M de NaCl	1.4 g
4 % Solución Bloqueadora	2 g

Buffer TAE 10X pH 8 (1 L)

Tris base	48.4 g
Ac. acético glacial	11.42 ml
EDTA	7.44 g

Buffer TBE 10X pH 8 (1L)

Tris base	108 g
Ácido bórico	55 g
0.5 M EDTA pH 8	40 ml

SOLUCIONES

7.5 M Acetato de amonio (90 ml)

Acetato de amonio	52 g

Aforar con agua.

Etanol al 70 %. (1.5 L)

Alcohol 96 °C	1094 ml
Agua	406 ml

Soluciones para Minipreparaciones (Miniprep)

Solución I (50 ml)

1 M Tris-HCl pH 8	1.25 ml
250 mM EDTA	2 ml
1 M Glucosa	2.5 ml
Agua destilada	44.25 ml

Solución II (25 ml)

1 N NaOH	5 ml
10 % SDS	2.5 ml
Agua	17.5 ml

Preparar justo antes de usar.

TE (Tris-EDTA)

Tris base	1.2 g
EDTA	0.2 g

Solución fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24:24:1)

Fenol equilibrado pH 8	24 ml
Cloroformo	24 ml
Alcohol isoamílico	1 ml

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Solución depurinizante para transferencia (100 ml)

0.2 M HCl	1.66 ml
Agua destilada	98.34 ml

Solución desnaturalizante para transferencia (100 ml)

1.5 M NaCl	8.77 g
0.5 M NaOH	2 g

Solución neutralizante para transferencia (100 ml)

0.5 M Tris-HCl	6.06 g
1.5 M NaCl	8.77 g

Solución SSPE 20X

NaCl	17.53 g
NaH_2PO_4 H_2	2.76 g
EDTA	0.74 g

Solución primaria de lavado (100 ml)

Urea	12 g
SDS	0.1 g
NaCl	0.87 g
Solución de bloqueo	0.2 g
1M $MgCl_2$	100 g
0.5 Fosfato	10 ml

Solución secundaria de lavado (100 ml)

NaCl	5.6 g
Tris-HCl	6.05 g

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

GLOSARIO

ADN: (Ácido desoxirribonucleico): Es la molécula portadora la información genética, que posibilita su transmisión de una generación a la siguiente.

Agarosa: polisacárido formado por galactosas alfa y beta que se extrae de las algas de los géneros *Gellidium* y *Gracillaria*. Se usa para construir geles que permitan separar moléculas de ADN mediante electroforesis.

Aminoácido: Cada uno de los elementos constituyentes de una proteína.

Amplificación: Cualquier proceso que causa la replicación de una secuencia concreta de ADN en cantidad desproporcionadamente elevada.

ARN: Molécula sintetizada a partir del molde de ADN; contiene el azúcar ribosa en lugar de la desoxirribosa presente en el ADN.

Autocatálisis: Proceso mediante el cual un compuesto químico induce y controla una reacción química sobre sí mismo.

BAC (Bacterial Artificial Chromosome): segmento grande de ADN, generalmente constituido por 100.000-200.000 bases, de cualquier especie que es clonado e introducido en una bacteria. Una vez dentro de la bacteria, pueden obtenerse múltiples copias del mismo.

Bacteriófagos: virus que infectan exclusivamente a bacterias.

Banco Genómico: Proceso de almacenaje durante un periodo indefinido del ADN extraído de cualquiera de las posibles fuentes celulares, conservado bajo congelación o refrigeración para futuros análisis.

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

B-galactosidasa: También conocida como lactasa, cataliza la hidrólisis de lactosa en sus dos monosacáridos (glucosa y galactosa).

Climatérico: Dícese del fruto que es capaz de seguir madurando incluso después de haber sido recolectado.

Clonación: proceso por el que se consiguen copias idénticas de un organismo, célula, o molécula.

Cósmido: vector de clonación, usado en la elaboración de genotecas, que permiten la introducción de insertos de DNA de hasta 45 kb.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

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

Diploide: Dotación cromosómica consistente en la presencia del número total de cromosomas en una célula somática.

Dominio: Región específica o secuencia de aminoácidos de una proteína, que está asociada a una función determinada o al segmento de ADN correspondiente.

Electroforesis en gel: técnica para la separación de moléculas según la movilidad de estas debido a la aplicación de un campo eléctrico a través del gel en una dirección determinada.

Endonucleasa de restricción: aquella que puede reconocer una secuencia característica de nucleótidos dentro de una molécula de ADN y cortarlo en ese punto en concreto.

Enzima: proteína que cataliza las reacciones bioquímicas del metabolismo.

Etileno: Es un compuesto químico orgánico formado por dos átomos de carbono enlazados mediante un doble enlace, regula muchos aspectos de la planta, como el desarrollo y la senescencia. Está involucrado en procesos tales como respuesta al ataque de patógenos, heridas, estrés por inundamiento, etc.

Exón: Secuencia codificante de ADN.

Fitohormonas: Hormonas, naturales o sintéticas, que intervienen en el desarrollo de las plantas, promoviendo o inhibiendo determinados procesos.

Gel: sistema coloidal donde la fase continua es sólida y la dispersa es líquida

Gen: Unidad básica de la herencia que consiste en un segmento de ADN que codifica una proteína específica o un segmento de una proteína (o una molécula de ARN) con una característica o función determinada.

Genoma: Conjunto de los genes de un individuo o una especie contenida en un juego haploide de cromosomas.

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

Gen: Segmento de ADN 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.

Haploide: La mitad del número diploide o normal de cromosomas en una célula somática.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Hibridación: proceso por el cual se combinan dos cadenas de ácidos nucleicos antiparalelas y con secuencia de bases complementarias, en una única molécula de doble cadena, que toma la estructura de doble hélice, donde las bases nitrogenadas quedan ocultas en el interior.

Homología: Cuando dos o más proteínas o ácidos nucleicos son similares entre sí debido a que presentan un mismo origen evolutivo.

Intrón: Secuencia no codificante de ADN que se transcribe a ARN mensajero (ARNm) en su estado inmaduro, pero es escindida del mismo al transformarse en ARNm maduro antes de la traducción.

Isoformas: Productos proteicos distintos creados a partir del mismo.

Kilobase: 1.000 pares de bases de ADN o de ARN .

Locus: Lugar o localización física de un gen específico en un cromosoma.

Marcador: Segmento identificable de ADN que presenta una longitud polimórfica en la población.

Miniprep: extracción de ADN de naturaleza plasmídica de un cultivo bacteriano.

PCR (*Polymerase chain reaction*): Procedimiento que genera millones de copias de un segmento corto de ADN mediante ciclos repetidos de desnaturalización del ADN.

Plásmidos: moléculas de ADN extracromosómico circular o lineal que se replican y transcriben independientes del ADN cromosómico.

Secuencia consenso: Secuencia nucleotídica de un segmento de ADN que está en concordancia con la mayoría de las secuencias del mismo segmento de diferentes individuos.

Sitio de restricción: secuencia de ADN que es reconocida por una endonucleasa como el lugar en el que se cortará el ADN.

Sonda: secuencia específica de ADN o ARN prefabricada, que se marca con uno de los diversos métodos disponibles y se utiliza para detectar la presencia de una secuencia complementaria cuando se une (hibrida) a ella.

Southern blot: Técnica de análisis de genética molecular que se utiliza para detectar diferencias en la longitud de los fragmentos de ADN tras ser digeridos por enzimas de restricción.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Termolábil: Se aplica a las sustancias que se alteran al estar expuestas a ciertas temperaturas.

Valor C: Se refiere al tamaño del genoma de cualquier organismo. El genoma nuclear es el complemento génico total del núcleo de eucariontes. El tamaño genómico usualmente se expresa en pares de bases nucleotídicas (pb) o en picogramos (1 pg. = 10-12 g.). Para la comparación entre genomas usualmente se utiliza como referencia la cantidad haploide de DNA (C) presente en la especie en estudio. No hay relación entre el tamaño del genoma de un organismo y su complejidad.

Vector de clonación: agente que transfiere información genética, por algún medio, de un organismo a otro.

YAC (*Yeast artificial chromosome*): forma parte de los vectores de clonación de alta capacidad.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

8. BIBLIOGRAFÍA

Álvarez, E., Montaña, J., Acuña, R., Gaitán, A., Pacheco, M. 2008. Construcción de una Biblioteca Genómica de *Coffea arabica var. colombia* y Evaluación con una Secuencia Homóloga a Ubiquitina. Revista de la Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Vol. 9, 81-90.

Amita, Ch., Vidhu, S., Rajesh, S. y Pravendra, N. 2008. Isolation and characterization of the MiCel1 gene from mango: ripening related expression and enhanced endoglucanase activity during softening. Plant Growth Regul 56:117–127.

Azcón-Bieto, J., Talón, M. y colaboradores. 2008. Fisiología Vegetal. 2da. Edición. McGraw- Hill y Universitat de Barcelona. China. Pág. 15, 16, 415-590

Castelán, M. y Becerril, E. Fisiología de la producción forzada en guayaba, nutrientes y respuesta floral. INCI. [En línea]. dic. 2004, vol.29, no.12 [citado 12 Enero 2010], p.680-685. http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442004001200005&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0378-1844.

Castro, F. y Portelles, Y. 1997. Transfección de DNA a Células de Mamíferos. Biotecnología Aplicada. Volumen 14 No. 3, pp. 149-161

Cho, H. y Cosgrove, D. 2004. C4. Expansins as Agents in Hormone Action. PLANT HORMONES: Biosynthesis, Signal Transduction, Action, by Peter J Davies, KLUWER, Dordrecht, 2004, p 262-281

Dhillon, S., Chhabra, A. y Kharb, P. 2007. Recombinant DNA Technology and Biotechnology. Cloning Strategies and Screening of Recombinant DNA Clones. Haryana Agricultural University.

Doe Joint Genome Institute. Standard Operating Procedure.
my.jgi.doe.gov/general/protocols.

El-Sharkawy, W. S. Kim1, S. Jayasankar, A. M. Svircev1 and D. C. W. Brown, 2008 Differential regulation of four members of the ACC synthase gene family in plum Journal of Experimental Botany, Vol. 59, No. 8.

Encyclopedia Britannica, Science & Technology.
www.britannica.com/science-and-technology

Etienne, Jaqueline *et al*. 2001. Bioquímica Genética, Biología Molecular. Editions Masson.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Fong-Chin, H., Yi-Yin, D. & Pung-Ling, H. 2006. Genomic Organization of a Diverse ACC Synthase Gene Family in Banana and Expression Characteristics of the Gene Member Involved in Ripening of Banana Fruits. J. Agric. Food Chem. 2006, 54, 3859-3868.

Galván, A., Tejada, M., Camargo, A., Higuera, J., Mariscal, V., Fernández, E. 2009. Aislamiento y purificación del DNA de un plásmido recombinante. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales.

Gómez, Marisa, Echenique, Viviana. 2004. Parte II, Herramientas Básicas de Ingeniería. En: Dra. Viviana Echenique, Dra. Clara Rubinstein, In. Luis Mroginski, Editores. Genética Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. http://www.inta.gov.ar

González, E., Reyes, L., Padilla, J., Valadez, C., Esquivel, F., Perales, M., y Gutierrez, F. 1997. Manejo Anual para la Producción de Guayaba en Calvillo, Ags. Inifap. No. 20. México. Pág. 2

González, E., Reyes, L., Padilla, J., Valadez, C., Esquivel, F., Perales, M., y Gutierrez, F. 2000. Tecnología para producir Guayaba en Calvillo, Ags. Inifap. No. 28. México. Pág. 2 y 3

Gurrola, A., Calzada, F., Velazco, J. 1992. Cultivo de la Guayaba. Informe Técnico. SARH.

Hiwasa, K., Kinugasa, Y., Amano, S., Hashimoto, A., Nakano, A., Inaba, R. and Kubo, Y. 2003. Ethylene is required for both the initiation and progression of softening in pear (Pyrus communis L.) fruit. Journal of Experimental Botany, Vol. 54, No. 383, pp. 771-779

Huang , F., Do, Yi., Huang, P. 2006. Genomic Organization of a Diverse ACC Synthase Gene Family in Banana and Expression Characteristics of the Gene Member Involved in Ripening of Banana Fruits. J. Agric. Food Chem. 54 (11), 3859-3868

Integrated Taxonomic Information System (ITIS). 2009. API service [En línea]. [Fecha de Consulta: Mayo 2010]. Disponible desde <http://www.itis.gov>.

Invitrogen. 2004. Zero Blunt® PCR Cloning Kit. Instruction Manual. Versión K.

Jakubowicz , M, Sadowski, J. 2002-Aminocyclopropane-l-carboxylate synthase - genes and expression ACTA PHYSIOLOGIAE PLANTARUM
Vol. 24. No. 4.:459-478

Karaaslan, M. y Hrazdina, G. 2009. Characterization of an expansin gene and its ripening-specific promoter fragments from sour cherry (Prunus cerasus L.) cultivars. Acta Physiol Plant.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

King, M. 2000. Screening Recombinant Libraries by Polymerase Chain Reaction. The Nucleic Acid Protocols Handbook. R. Rapley © Humana Press Inc. USA.

Klug, W., Cummings, M. y Spencer, Ch. 2006. Conceptos de Genética. 8ª. Edición. Pearson. España. Pág. 530- 551

Lin, J., Fan, R., Wan, R., Charng, Y. y Wang, N. 2007. Structural analysis of the promoter of tomato1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 6 gene (*Le-ACS6*). Chinese Science Bulletin. Springer-Verlag.

Mata, I. y Rodríguez, A. 1990. Cultivo y Producción de Guayabo. Trillas. México. Pág. 14-147.

McPherson, M.J. & Moller, S.G. 2000. PCR. BIOS Scientific Publishers. U.K.

Morales, F., Garcidueñas, C., Soria, R. and Alpuche, A. 2009. Psidium guajava fruit ripening-related alpha-expansin-like mRNA, partial sequence. Accession FJ744120. NCBI Database.

Nakatsuka, A., Murachi, S., Okunishi, H., Shiomi, Sh., Nakano, R., Kubo, Y. and Inaba, A. 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 118: 1295–1305

Nava, A., González, V., Sánchez, P., Peña, C., Livera, M., Brito, T. 2004. Crecimiento y Fenología del Guayabo (*Psidium guajava* L.) Cv. "Media China" en Iguala, Guerrero. Revista Fitotecnia Mexicana. Octubre-diciembre. Año/vol. 27. Número 004. pp. 349-358.

National Center for Biotechnology Information (NCBI) (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov).

Nishiyama, K., Guis, M., Rose, J., Kubo, Y., Bennett, K., Wangjin, L., Kato, K., Ushijima, K., Nakano, R., Inaba, A., Bouzayen, M., Latch, A., Pech, J-C.y Bennett, A. 2007. Ethylene regulation of fruit softening and cell wall disassembly in Charentais melon. Journal of Experimental Botany, Vol. 58, No. 6, pp. 1281–1290.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). http://www.fao.org

Peterson, D., Boehm, K. & Stack, S. 1997. Isolation of Nuclear DNA from Plants. Mol. Biol. Reptr. 15:148-153

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Real, M., Company, P., García-Agustín, P., Bennett, A. y Gonzá lez-Bosch, C. 2004. Characterization of tomato endo-b-1,4-glucanase Cel1 protein in fruit during ripening and after fungal infection. Planta 220: 80–86.

Reyes, A. 2011. Aislamiento, Caracterización y Estudio de la Expresión de cDNAs Relacionados con la Maduración del Fruto de la Guayaba (*Psidium Guajava* L). Tesis de Maestría. U.A.A.

Rodríguez, I., Barrera, H. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. Ciencia UANL / Vol. VII. No. 3. Julio-Septiembre.

Rose, J., Lee, H. y Bennet, A. 1997. Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific & ripening-regulated. Plant Biology. (94)955-5960

Kew, Royal Botanic Garden. http://www.kew.org/about-kew/index.html

Sambrook, J. y Russell, D. 2001. Molecular Cloning, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. U.S.A. Pag. 1.28

Sampedro, J., Carey, R. & Cosgrove, D. 2006. Genome histories clarify evolution of the expansin superfamily: new insights from the poplar genome and pine ESTs. J. Plant. Res. 119:11-21

Seidman, J. 1991. Current Protocols in Molecular Biology. Construction of Recombinant DNA Libraries. John Wiley & Sons, Inc. 5.0.1-5.0.3.

SIAP - Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SAGARPA - Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. México. www.siap.gob.mx/

Sinha, R. 2005. Modern Plant Physiology. Alpha Sciencie. India. 620p.

Smith, C. y Wood, E. 1998. Biología Molecular y Biotecnología. Addison-Wesley Iberoamericana. E.U.A. Pág. 191.

Srivastava, L. M (2002). Plant Growth and development
Academic Press, Boston.

Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) (http://expasy.org/tools/dna.html)

Taiz, L. & Zeiger, E. 2002. Plant Physiology. 3th Edition. Sinauer Associates, Inc. USA. Pág. 440-530

Trainotti, L., Spolaore, S., Ferrarese, L. y Casadoro, G. 1997. Characterization of ppEG1, a member of a multigene family which encodes endo--1,4-glucanase in peach. Plant Molecular Biology 34: 791–802, 1997. 791

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Vilches, L. 1993. Determinación de la Actividad de Exoglucanasas de Cepas Fúngicas Nativas de las Provincias de Huaylas y Huaraz. Tesis UNMSM. http://sisbib.unmsm.edu.pe/BibVirtualData/Tesis/Basic/Vilches_P_L/Introduccion.pdf

Vishal, P., Prashant, V., Uddhav, S. & Prashant, A. 2007. A Simple Méthod for Isolation of Genomic DNA from Fresh and dry Leaves of *Terminalia arjuna* (Roxb.) Wight and Argot. Electronic Journal of Biotechnology. 10(3):468-472.

Wang, A., Yang, L., Wang, Z., Wei, Y., He, L. y Li, Y. 2006. Sugar Tech. 8 (4): 257-263.

Yilun Wang *et al*, Construction of Genomic Libraries en λ Vectors, en Nicola Casali & Andrew Preston, Editores. E. coli Plasmid Vectors Methods in Molecular Biology. Humana Press. Totowa, New Jersey, 2003.

Yi-Yin Do, Te-Shih Thay, Tang-Wei Chang, and Pung-Ling Huang. 2005. Molecular Cloning and Characterization of A Novel 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate Oxidase Gene Involved in Ripening of Banana Fruits. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, *53* (21), pp 8239–8247

Zacarías, L. y Lafuente, M. 2008. Etileno, Ácido Abscísico y Otros Reguladores del Desarrollo. 2008. En Azcón-Bieto. Fisiología Vegetal. 2da. Edición. McGraw- Hill y Universitat de Barcelona. China. Pág. 445-53

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS