



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ANÁLISIS *IN SILICO* Y EXPRESIÓN DIFERENCIAL
DE GENES QUE CODIFICAN PARA PROTEÍNAS
TIPO FOSFOLIPASAS D (PLD) Y LIPOXIGENASAS
(LOX) EN FRUTOS DE *Carica papaya* SOMETIDOS
A DAÑO MECÁNICO.**

**Tesis propuesta:
JORGE ESPADAS ALCOCER**

En opción al título de

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(Ciencias biológicas: Opción Biotecnología)**

**Mérida, Yucatán, México
Enero 2014**





RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado: "Análisis *in silico* y expresión diferencial de genes que codifican para proteínas tipo fosfolipasas D (PLD) y lipoxigenasas (LOX) en frutos de *Carica papaya* sometidos a daño mecánico" fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata, dentro de la Opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente

Dr. Felipe A. Vázquez Flota

Coordinador de Docencia

Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Mérida, Yucatán, México Enero de 2014



Jorge Luis Espadas Alcocer

AGRADECIMIENTOS

Le doy muchas gracias a Dios, cualquiera sea su nombre, por permitirme existir y poder ayudar a la humanidad con todos los conocimientos que me ha regalado.

También estoy agradecido con el Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por darme la oportunidad de realizar el posgrado, proporcionarme la beca No. 334439 y la oportunidad de haber participado en el proyecto de Ciencia básica 2010_1 No. 155356.

Un especial agradecimiento al Dr. Luis Carlos Rodríguez por su apoyo y por brindarme todos los recursos necesarios para realizar este proyecto y concluir mi posgrado.

Agradezco al Dr. Santy Peraza Echeverría, Dra. Virginia Herrera Valencia y Dr. Víctor Suarez Solís (QEPD) por haber formado parte de mi comité tutorial previo.

Agradezco al Dr. Rodolfo López Gómez, al Dr. Ignacio Islas, al Dr. Luis Carlos Rodríguez y al Dr. Enrique Castaño por haber formado parte de mi comité tutorial en el cuarto semestre.

Agradezco al Dr. Rodolfo López Gómez, al Dr. Rubén Flores-Saaib, al Dr. Ignacio Islas, al Dr. Luis Carlos Rodríguez y al Dr. Enrique Castaño por haber formado parte de mi comité de revisión de tesis.

También estoy muy agradecido con mis compañeros de laboratorio por todo el apoyo que me proporcionaron y su sincera amistad. Mis compañeros: la Dra. Ana Li Arroyo, el Técnico Miguel Keb, el M.C. Luis Joel Figueroa, el M.C. Alejandro Pereira, el Biólogo Samuel Gamboa, la M.C. Montse Recendez y el Biólogo Ángel Dzib.

En general dedico este trabajo a la humanidad, particularmente a las buenas personas que se preocupan por el bienestar de todos. Ejemplos de esas buenas personas son mis padres, Rita Otilia Alcocer Valladares y Carlos Ignacio Espadas Alcocer, quienes me han formado a lo largo de toda mi vida y a quienes les estaré eternamente agradecido. Otros excelentes ejemplos son mis hermanos, Carlos Paúl Espadas Alcocer, María José Espadas Alcocer y María Guadalupe Espadas Alcocer, con quienes compartí una hermosa infancia y quienes me han brindado toso su amor y cariño.

INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
CAPÍTULO I.....	9
1. INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES	9
2.1 Problemática de alimentos	9
2.1.1 Producción de alimentos.....	9
2.2 Daño mecánico en los frutos.....	11
2.3 La papaya	14
2.3.1 Características	14
2.3.2 Morfología.....	14
2.3.3 Genoma de <i>C. papaya</i>	18
2.3.4 Comercio	19
2.4 Fosfolipasas D	22
2.4.1 Clasificación de las PLDs.....	23
2.4.2 Estructura de las PLDs y Sitios Activos.....	23
2.4.3 Efecto del silenciamiento/sobreexpresión de PLDs en plantas.....	25
2.5 Lipoxigenasas	27
2.5.1 Estructura y Sitio Activo de las LOXs	30
2.5.2 Clasificación y nomenclatura.....	32
2.5.3 Localización intracelular y ruta de las oxilipinas	33
2.5.4 Genes que codifican para proteínas tipo LOX.....	34
2.5.5 Expresión de los genes LOX en condiciones de estrés abiótico y biótico	35
2.5.6 Efecto del silenciamiento/sobreexpresión de LOXs en plantas.....	37
2.2 JUSTIFICACIÓN	39
2.3 OBJETIVOS	40
2.3.1 Objetivo general.....	40
2.3.2 Objetivos específicos	40
2.4 HIPÓTESIS	40
2.5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	41
2.6 REFERENCIAS.....	42

CAPÍTULO II. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE GENES QUE CODIFICAN PARA FOSFOLIPASAS D (PLDs) Y LIPOXIGENASAS (LOXs) EN <i>C. papaya</i>	61
2.1 INTRODUCCIÓN	61
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	63
2.3 RESULTADOS	65
2.4 DISCUSIÓN	83
2.5 CONCLUSIÓN	84
2.6 REFERENCIAS	85
CAPÍTULO III. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LOS GENES <i>PLDs</i> Y <i>LOXs</i> EN FRUTOS DE <i>C. papaya</i> SOMETIDOS A DAÑO MECÁNICO	89
3.1 INTRODUCCIÓN	89
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	90
3.3 RESULTADOS	95
3.4 DISCUSIÓN	111
3.5 CONCLUSIÓN	114
3.6 REFERENCIAS	115
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN FINAL	121
4.1 DISCUSIÓN GENERAL	121
4.2 CONCLUSIONES GENERALES	123
4.3 PERSPECTIVAS	123
4.4 REFERENCIAS	125
ANEXOS	127

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición de la fruta de papaya.	16
Cuadro 2. Tipos de flores de <i>C. papaya</i> y sus distintos frutos.	18
Cuadro 3. Algunas de las funciones fisiológicas de los productos derivados de lipoxigenasas en plantas.	30
Cuadro 4. Características de las AtLOXs.	35
Cuadro 5. Análisis bioinformáticos empleados para la predicción de genes y proteínas putativas de PLDs y LOXs en <i>C. papaya</i>	63
Cuadro 6. Números de accesos de genes AtPLDs y AtLOXs.	65
Cuadro 7. Pares de primers para genes LOX de <i>C. (CpLOXs)</i>	82
Cuadro 8. Condiciones de PCR empleadas.	92
Cuadro 9. Valores promedio de los parámetros colorimétricos cuantificados en los frutos de <i>C. papaya</i>	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Carica papaya</i>	14
Figura 2. Corte transversal del fruto sano de papaya en maduración de consumo.	17
Figura 3. Flores masculina (M), femenina (F) y hermafrodita (H).	18
Figura 4. Clasificación de las fosfolipasas y efectos fisiológicos celulares de compuestos derivados de AP.	22
Figura 5. Reacciones catalizadas por las PLDs y estructuras comunes de fosfolípidos que son sustratos de las PLDs.	25
Figura 6. Mecanismo de acción de la hidrólisis de la fosfatidilcolina (PC) a ácido fosfatídico (PA) y colina.	25
Figura 7. Mecanismo de acción de las enzimas lipoxigenasas.	28
Figura 8. Productos de la reacción de las LOXs.	29
Figura 9. Ruta de las oxilipinas.	29

Figura 10. Estructura tridimensional de la lipoxigenasa L-1 de soya	31
Figura 11. Ejemplos de LOXs tipo1 y tipo 2.	33
Figura 12. Localización de las LOXs en la ruta de las oxilipinas	34
Figura 13. Estrategia experimental general para la caracterización de genes LOXs en frutos de <i>C. papaya</i> sometidos a daño mecánico.....	41
Figura 14. Alinamiento de la AtPLD α 1 y la CpPLD α 1 putativa de <i>C. papaya</i>	67
Figura 15. Alineamiento de la e AtPLD δ y la CpPLD δ putativa de <i>C. papaya</i>	68
Figura 16. Alieneamiento de las de AtLOXs y de las CpLOXs putativas.	74
Figura 17. Frecuencias de aminoácidos en dominios de PLD α 1s.	75
Figura 18. Frecuencias de aminoácidos en dominios de PLD δ s.	75
Figura 19. Frecuencias de aminoácidos en dominios de LOXs.....	76
Figura 20. Análisis de dominios de la CpPLD α 1, CpPLD δ y CpLOXs.....	77
Figura 21. Árbol filogenético de secuencias de aminoácidos de PLDs conocidas en plantas y de predicciones en <i>C. papaya</i>	78
Figura 22. Árbol filogenético de secuencias de aminoácidos de LOXs conocidas en plantas y de predicciones en <i>C. papaya</i>	79
Figura 23. Análisis de las estructuras tridimensionales de las proteínas PLD α 1s de <i>A. thaliana</i> y <i>C. papaya</i>	80
Figura 24. Análisis de las estructuras tridimensionales de las proteínas PLD δ s de <i>A. thaliana</i> y <i>C. papaya</i>	80
Figura 25. Análisis de las estructuras tridimensionales de las proteínas LOXs de <i>A. thaliana</i> y <i>C. papaya</i>	81
Figura 26. Frutos maduros e inmaduros de <i>C. papaya</i> sometidos al tratamiento de daño mecánico (corte y golpe).....	95
Figura 27. ARN total extraído de los frutos de papaya sometidos a daño mecánico y ADNc sintetizado a partir de las muestras de ARN total.	96
Figura 28. Expresión diferencial de los genes <i>CpPLDs</i> y <i>CpLOXs</i> en frutos de papaya sometidos a daño mecánico.	97

Figura 29. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de la predicción del gen <i>CpPLDα1</i> (<i>CpPLDα1p</i>) y del gen secuenciado (<i>CpPLDα1s</i>).....	100
Figura 30. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de la predicción del gen <i>CpLOX3</i> (<i>CpLOX3p</i>) y del gen aislado (<i>CpLOX3s</i>).	103
Figura 31. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la predicción del gen <i>CpPLDα1</i> (<i>CpPLDα1p</i>) y del gen aislado secuenciado (<i>CpPLDα1s</i>).....	104
Figura 32. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la predicción del gen <i>CpLOX3</i> (<i>CpLOX3p</i>) y del gen aislado (<i>CpLOX3s</i>).....	105
Figura 33. Alineamientos de secuencias de aminoácidos de <i>CpPLDα1</i> con <i>CsPLDα1</i> ..	106
Figura 34. Alineamientos de secuencias de aminoácidos de <i>CpLOX3</i> con <i>CsLOX1</i>	107
Figura 35. Propuesta de mecanismo de acción de la respuesta del fruto de <i>C. papaya</i> a estrés por daño mecánico.....	108
Figura 36. Concentración de peróxido de hidrógeno en cáscaras de frutos de papaya sometidos a estrés por daño mecánico.....	109
Figura 37. Concentración del complejo MDA-TBA en cáscaras de frutos de papaya sometidos a estrés por daño mecánico.....	110

RESUMEN

En la actualidad el comercio de papaya (*Carica papaya*) ha mantenido una tendencia de crecimiento acelerado debido a la alta demanda de estos frutos en diversos países. México se ha mantenido como el primer país exportador de papaya a nivel mundial (FAO, 2012). Durante el periodo de cultivo, transporte y comercio de los frutos existe un elevado riesgo de pérdidas de producto debido a diferentes circunstancias: abrasiones ocasionadas por insectos, impactos durante la cosecha, selección, manipulación, transporte, compresiones durante el empaquetamiento y almacenamiento, etc. Este fenómeno es conocido como estrés por daño mecánico y generalmente ocasiona que los frutos se deterioren con mayor rapidez y sean más susceptibles al ataque de patógenos.

Estudios previos han evidenciado la participación de dos tipos de enzimas en los mecanismos de respuesta a estrés por daño mecánico en tejidos de frutos: las fosfolipasas D (PLDs) y las lipoxigenasas (LOXs). Las fosfolipasas D son enzimas que hidrolizan parte de los fosfolípidos componentes de las membranas celulares mientras que las lipoxigenasas son enzimas dioxigenasas que estereo-específicamente insertan oxígeno molecular en ácidos grasos poliinsaturados produciendo hidroperóxidos de ácidos grasos poliinsaturados.

Actualmente se desconoce si existen PLDs y LOXs en tejidos de *C. papaya*. Tampoco se sabe si estas enzimas participan en los mecanismos de respuesta ante el estrés por daño mecánico en los frutos. Por tanto en este estudio se llevó a cabo el análisis *in silico* de secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de PLDs y LOXs del genoma de *C. papaya* así como la expresión diferencial de genes que codifiquen para PLDs y LOXs en frutos de papaya sometidos a estrés por daño mecánico, todo esto con el fin de generar información que permita una mejor comprensión de los mecanismos de señalización en frutos de papaya ante el estrés por daño mecánico.

Los resultados obtenidos en esta investigación facilitarán a largo plazo la generación de plantas transgénicas de papaya, con sobreexpresión o silenciamiento de genes *PLDs* o *LOXs*, que produzcan frutos más tolerantes a este tipo de estrés favoreciendo la disminución de las pérdidas de este producto.

4

ABSTRACT

Today papaya (*Carica papaya*) trade has maintained a rapid growth trend due to the high demand for these fruits in different countries. Mexico has remained the leading exporter of papaya worldwide (FAO, 2012). During the cultivation, transport and trade of the fruits there is a high risk of product losses due to different circumstances: abrasions caused by insects, impacts during harvesting, selection, handling, transport, packaging and compressions during storage, etc. This phenomenon is known as stress-induced mechanical damage and usually causes the fruit to deteriorate more quickly and is more susceptible to pathogen attack.

Previous studies have evidenced the involvement of two types of enzymes in the mechanisms of stress response to mechanical damage in tissues of fruits: the phospholipase D (PLD) and lipoxygenases (LOXs). Phospholipases D are enzymes that hydrolyze phospholipids components of the cell membrane while lipoxygenases are dioxygenase enzymes that stereo-specifically insert molecular oxygen in polyunsaturated fatty acids producing polyunsaturated fatty acid hydroperoxides.

At present the existence of PLDs and LOXs in papaya tissues is unknown. It is not known whether these enzymes are involved in the mechanisms of stress response by mechanical damage to the fruit. Therefore in this study was performed *in silico* analysis of nucleotide and amino acid sequences of PLDs and LOXs of the *C. papaya* genome and differential expression of genes coding for PLDs and LOXs in papaya fruit under stress by mechanical damage, all with in order to generate information for a better understanding of the signaling mechanisms in papaya fruits to stress by mechanical damage.

The results obtained in this research will facilitate the long-term generation of transgenic papaya plants, with overexpression or gene silencing of *PLDs* or *LOXs*, which produce fruits more tolerant to this kind of stress favoring the reduction of product losses.

INTRODUCCIÓN

Las frutas contienen muchas vitaminas y minerales que cumplen toda una serie de funciones en el organismo: la vitamina A mantiene la salud de la vista y la inmunidad contra las infecciones; el potasio favorece el correcto funcionamiento del sistema nervioso y los músculos; las vitaminas del grupo B son necesarias para transformar los alimentos en energía; la vitamina C puede incrementar la absorción de calcio, mineral esencial para la salud ósea y dental, así como la de hierro de otros alimentos, etc.. Con lo difícil que puede ser lograr que la población haga caso de un mensaje sencillo, como: “consume más fruta y hortalizas”, el verdadero desafío puede encontrarse en los sistemas de suministro y distribución de alimentos del mundo (FAO, 2003).

El fruto de papaya es un fruto tropical cuya tasa de consumo y producción se ha incrementado en los últimos años ya que el fruto posee un alto valor nutritivo conocido además de ser rico en vitaminas A y C (Chandrika, 2003). En el año 2011 se obtuvo una producción mundial de más de 11 millones de toneladas de papaya. México se ha mantenido como el principal país exportador de papaya y como el quinto productor a nivel mundial (FAO, 2012).

El corto tiempo de vida de almacén del fruto de papaya limita las distancias de exportación y disminuyen la calidad visual de los frutos (Mahmud *et al.*, 2008). Normalmente la recolección, envasado y transporte de las papayas son procesos de larga duración. Estos factores incrementan las posibilidades de que el producto pueda presentar laceraciones físicas, las cuales causan el deterioro fisiológico del tejido, acelerando el proceso de descomposición del fruto antes de llegar a los consumidores (FAO, 1993). El fenómeno anterior es un tipo de estrés abiótico denominado como “daño mecánico”.

Comparados con otros tipos de estrés, existen pocos estudios acerca del efecto del daño mecánico en tejidos de plantas, especialmente frutos. Generalmente estos estudios emplean pruebas bioquímicas, tales como el índice de peroxidación de los tejidos y la concentración de H₂O₂ (Bailey *et al.*, 1996; Low y Merida, 1996; Desikan *et al.*, 2001; Hernández *et al.*, 2001), para analizar el estrés producido en los tejidos de plantas. Algunos de estos estudios se enfocan en las actividades de proteínas que interaccionan con los lípidos de las membranas celulares a partir de los cuales se inician cascadas de

señalización de respuesta al estrés. Las fosfolipasas D (PLDs) y las lipoxigenasas (LOXs) son enzimas que se participan en el catabolismo de parte de los lípidos de las membranas celulares en respuesta a diferentes tipos de estrés. Las PLDs son enzimas que llevan a cabo la hidrólisis de fosfolípidos de las membranas celulares (Wang, 2000) y las LOXs realizan la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados (Koshiishi *et al.*, 2006). Sin embargo, a la fecha no se ha confirmado la existencia de genes que codifiquen para PLDs o LOXs en tejidos de *C. papaya* y tampoco se conoce si estas enzimas están involucradas en los mecanismos de respuesta a estrés por daño mecánico.

En base a la información anterior, se realizó un análisis *in silico* en el genoma de *C. papaya* con el objetivo de elucidar genes que codifiquen para proteínas tipo PLD y LOX. El análisis se realizó por medio de diversas herramientas bioinformáticas y de diferentes bases de datos de proteínas, genes y genomas de plantas. Después de realizar el diseño de los genes putativos por medio de diferentes servidores bioinformáticos disponibles en línea, en base a las secuencias obtenidas se diseñaron oligonucleótidos específicos para la posterior amplificación de los genes por medio de PCR. Posteriormente frutos de *C. papaya* en distintas fases de maduración se sometieron a diferentes tratamientos de daño mecánico. Una vez tratados a estos frutos se les extrajo el ARN total de cada muestra, se sintetizó el ADNc y se realizaron PCRs semicuantitativas de los genes *CpPLDs* y *CpLOXs*.

Una vez realizados los perfiles de los genes *CpPLDs* y *CpLOXs*, se corroboró la existencia y expresión diferencial de los genes *CpPLD α 1* y *CpLOX3*. Ambos genes fueron aislados y posteriormente secuenciados. El grado de similitud de ambos genes con respecto a las predicciones realizadas mediante el análisis *in silico* fue bastante elevado. Simultáneamente se realizaron pruebas bioquímicas en los frutos de papaya sometidos a los tratamientos de estrés por daño mecánico. Los resultados de estas pruebas indicaron distintos niveles de estrés oxidativo dependiendo del tratamiento de daño mecánico aplicado así como de la fase de maduración del fruto. Se observó que el aumento de la expresión del gen *CpPLD α 1* se presentó en frutos maduros e inmaduros sometidos a daño mecánico por golpe mientras que el gen *CpLOX3* aumentó su expresión solo en frutos maduros sometidos a estrés por corte.

Los resultados generados en esta investigación permitieron la elucidación de parte del mecanismo de respuesta de estrés por daño mecánico en frutos de papaya. Debido a la

escasez de información sobre genes presentes en frutos de papaya y en frutos de otras plantas dicotiledóneas tropicales, estos resultados pueden ser empleados para el desarrollo de nuevas investigaciones que permitan una mejor comprensión de los mecanismos de defensa de los frutos de papaya ante estrés por daño mecánico y otros diferentes tipos de estrés.

CAPÍTULO I

1. ANTECEDENTES

1.1 Problemática de alimentos

1.1.1 Producción de alimentos

De acuerdo al programa mundial de alimentos (WFP), hoy en día hay 925 millones de personas con problemas de nutrición en el mundo. Esto significa que al menos una de cada seis personas no tiene alimentos suficientes para estar saludable y llevar una vida activa (WFP, 2012).

La cadena alimentaria es el conjunto de todas las etapas por las que transita todo alimento desde su fuente de producción, pasando por las etapas de procesamiento, almacenamiento, transporte y comercialización hasta ser consumido (Pantoja *et al.*, 2003).

El sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC) es un método empleado internacionalmente para garantizar la seguridad de los alimentos. Consiste en un planteamiento científico, racional y sistemático utilizado para la identificación y el control de peligros microbiológicos, químicos y físicos para garantizar que los alimentos sean seguros en el momento de su consumo (Sánchez, 2003).

La trazabilidad es la posibilidad de encontrar y seguir el rastro, a través de todas las etapas de producción transformación y distribución, de un alimento, un pienso, un animal destinado a la producción de alimentos o una sustancia destinada a ser incorporada en alimentos (García *et al.*, 2007).

La pérdida de alimentos se refiere a la disminución de la cantidad de alimentos que forman parte de la cadena de suministros de alimentos de una o diferentes etapas (producción, postcosecha y almacenamiento) para consumo humano. La pérdida de alimentos que ocurre al final de la cadena alimentaria es llamada "desperdicio de

alimentos", refiriéndose al comportamiento de los minoristas y de los consumidores (Parfitt *et al.*, 2010).

La producción mundial de frutos en los últimos años ha presentado una tendencia de crecimiento acelerado. En el año 2011 se produjeron alrededor de 640 millones de toneladas de frutas destacándose la producción de frutos tropicales y se estima que para el año 2014 la producción mundial de frutos tropicales alcanzará las 82 millones de toneladas. Los países en desarrollo aportan alrededor del 98% de la producción total mientras que los países desarrollados importan y consumen el 80% de la producción mundial. Alrededor de un 78% de la producción corresponde a las principales frutas tropicales (mango, piña, aguacate y papaya) y el 22% a frutas secundarias (guayaba, lichi, granadilla, etc.). El mercado de las frutas tropicales ha evolucionado mucho manteniendo su precio siempre más alto que el de la fruta tradicional ya que este no se basa en la novedad sino en la calidad del producto (FAO, 2012).

La vida postcosecha de las frutas y vegetales ha sido tradicionalmente evaluada en términos de la apariencia visual (frescura, color, ausencia de desórdenes fisiológicos) y textura (firmeza, jugosidad) (Ayala *et al.*, 2004). El mantenimiento de estas propiedades requiere de cuidados especiales después de la cosecha de los frutos, tales como: prevención de daños mecánicos, reducción de la pérdida de agua e inhibición del desarrollo de enfermedades por contaminación con microorganismos oportunistas (Cook, 1999).

1.2 Daño mecánico en los frutos

El estrés se define como cualquier cambio en las condiciones del crecimiento de los organismos que interrumpe la homeostasis metabólica. Estos cambios ocasionan ajustes en las rutas metabólicas en un proceso denominado como aclimatación (Shulaev *et al.*, 2008).

Dependiendo de la naturaleza del factor que causa un estrés este se puede clasificar en biótico (producidos por otros organismos) o abiótico (producido por condiciones ambientales). Dentro del estrés abiótico pueden encontrarse factores físicos (radicación solar, vientos, pluviosidad, temperatura, etc.) y factores químicos (metales pesados, salinidad, pH, etc.) (Peña *et al.*, 2005).

Es bien conocido que la sobrevivencia de todos los organismos depende de su capacidad para percibir y responder al estrés ambiental, ya sea biótico o abiótico. La variabilidad de las condiciones ambientales ocasiona que los mecanismos de respuesta de los organismos cambien rápida y constantemente. Un ejemplo de estas modificaciones es la duplicación de genes, considerada como la fuente principal de innovaciones evolutivas y que ha contribuido significativamente en la complejidad y diversidad morfológica de las plantas (Zou *et al.*, 2009).

El estrés abiótico es la primera causa de pérdida de cultivos en el mundo, reduciendo el rendimiento promedio de los cultivos hasta en un 50%. Las sequías, las altas concentraciones de sales y las temperaturas bajas son los mayores problemas para la agricultura debido a que estos factores ambientales evitan que las plantas crezcan y se reproduzcan de manera óptima por los cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares que estos causan en ellas (Rodríguez *et al.*, 2005).

Los frutos son tejidos vegetales que contienen alrededor de un 65 a 95 % de agua. Sus procesos vitales se mantienen activos aún después de su separación de la planta. Su vida postcosecha depende del ritmo al que se consumen sus reservas de nutrientes y agua. La manipulación negligente del producto fresco puede causar magulladuras o grietas que dan lugar a un deterioro fisiológico, acelerando el proceso de descomposición del fruto antes de llegar a los consumidores (FAO, 1993). Este fenómeno es conocido como daño mecánico y puede ser causado por diferentes circunstancias: abrasiones ocasionadas por

insectos, impactos durante la cosecha, selección, manipulación, transporte, compresiones durante el empaquetamiento y almacenamiento (Kushwada *et al.*, 1995). Muchas veces los frutos que sufren daño mecánico presentan un incremento en la ruptura de las células afectadas cuando la compresión aplicada excede el límite de elasticidad de las membranas celulares, ocasionando la liberación del contenido citosólico en los espacios intracelulares y la pérdida de rigidez del área afectada. Generalmente el daño mecánico ocasiona que los frutos se deterioren con mayor rapidez y sean más susceptibles al ataque de patógenos (Sudheer e Indira, 2007; Florkowski *et al.*, 2009).

El mecanismo de respuesta al daño mecánico en los tejidos de las plantas se lleva a cabo en tres zonas: las células dañadas, el tejido local y el tejido distante al tejido dañado. Las células dañadas producen señales primarias que son percibidas por las células no dañadas del tejido local, estas últimas responden con cambios en la expresión de genes, fosforilación de proteínas y la producción de metabolitos. Estos cambios inducen estrategias defensivas que son percibidas en los tejidos sistémicos en respuesta al daño mecánico (Schilmiller y Howe, 2005). Muchos estudios acerca de las funciones de los lípidos de las membranas celulares en el desarrollo, senescencia y deterioración postcosecha de frutos se han enfocado en las cascadas de señalización en las cuales participan enzimas que llevan a cabo la hidrólisis de fosfolípidos y la peroxidación de ácidos grasos (Whitaker y Lester, 2006). El daño mecánico en los tejidos afectados ocasiona la acumulación de ácido jasmónico (JA por sus siglas en inglés) y jasmonatos los cuales desempeñan una función primordial como compuestos de respuesta a heridas en los tejidos (Schilmiller y Howe, 2005; Wasternack, 2007). Se ha observado que tejidos de planta de soya (Creelman *et al.*, 1992), tomate, papa (Peña-Cortés *et al.*, 1995) y *Arabidopsis thaliana* (Wang *et al.*, 2000; Chauvin *et al.*, 2012) presentan un incremento significativo de la producción de JA en los tejidos dañados.

La síntesis del ácido jasmónico inicia con la remoción de fosfolípidos polares (como la fosfatidil-colina, fosfatidil-etanolamina y el fosfatidil-inositol) por acción de las fosfolipasas D (PLDs por sus siglas en inglés) (Bargman *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009), generando productos como el ácido fosfatídico (Jenkins y Frohman, 2005; Oblozinsky *et al.*, 2011) el cual es desfosforilado por una fosfatasa específica convirtiéndolo en un diacilglicerol. Consecutivamente una hidrolasa acil-lipolítica interacciona con el diacilglicerol, liberando ácidos grasos (Paliyath y Thompson, 1986). Entre estos ácidos se encuentran el ácido

linoleico y α -linolénico que son sustratos de las enzimas 13-lipoxigenasas (13-LOXs por sus siglas en inglés) las cuales forman parte de las rutas de las oxilipinas (Oliw, 2002; Youn *et al.*, 2006). La 13-LOX realiza la peroxidación del ácido α -linolénico generando ácido 13(S)-hidroperxilinoleico el cual posteriormente es deshidratado y ciclado produciendo ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA por sus siglas en inglés) en el plástido antes de ser enviado a los peroxisomas. Una vez en el peroxisoma el OPDA es transformado en JA por acción de reductasas y una triple β -oxidación. Finalmente, el proceso de biosíntesis de los compuestos derivados del JA, como el metil-jasmonato (MeJA) y la jasmonil-soleucina, se lleva a cabo cuando el JA es exportado desde el peroxisoma hacia otras cavidades (Staswick y Tiryaki, 2004; Browse, 2009). Durante la actividad de las LOXs se generan especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como radicales hidroperóxidos y radicales peróxilos de ácidos grasos poliinsaturados (Koshiishi *et al.*, 2006), los cuales pueden causar daños en las membranas celulares de las plantas (Bailey *et al.*, 2006; Halliwell, 2006). Con base en la información anterior se denota que las enzimas PLDs y las LOXs desempeñan un papel importante en el catabolismo de fosfolípidos en las membranas celulares durante condiciones de estrés abiótico (Bargman *et al.*, 2009), tales como el daño mecánico (Wang, 2000).

1.3 La papaya

1.3.1 Características

La papaya (*Carica papaya L.*) es un frutal que se encuentra distribuido en varias regiones tropicales y subtropicales del mundo. Es ampliamente cultivada ya que su fruto es uno de los de mayor valor nutritivo conocido (rico en vitaminas A y C) (Chandrika, 2003), alto valor medicinal y de fácil digestión. La papaína, una proteasa que se obtiene de los frutos de papaya, es una de las proteasas más aprovechadas debido a sus diversas aplicaciones industriales (alimentos, cosméticos, farmacéuticos, curtido de cuero, medicina, etc.) (Li *et al.*, 2010).

Esta planta tropical crece principalmente entre la latitud 32°N y 32°S, desde el nivel de mar hasta 2000 m cerca del Ecuador. Requiere mucha luz, altas temperaturas y suelo bien drenado (Hill, 2009). El rango de temperatura del desarrollo del fruto es de entre los 22°C y 30°C, pero su desarrollo óptimo se da entre los 23° y 26°C. Las temperaturas bajas inhiben su crecimiento y las temperaturas altas le provocan abscisión floral (SAGARPA, 2005).

1.3.2 Morfología



Figura 1. *Carica papaya*. Tomado de Photomazza (<http://www.photomazza.com/?Carica-papaia&lang=es>).

La taxonomía de la papaya es la siguiente: Reino: Plantae; División: Tracheophytina; Clase: Magnoliopsida; Orden: Brassicales; Familia: Caricaceae; Género: *Carica*, Especie: *papaya* (ITIS, 2012).

La papaya es una planta trioica (Olayede, 2005) que produce plantas de tres sexos diferentes: femenino (sólo flores femeninas), masculino (flores predominantemente masculinas) y hermafroditas, teniendo los frutos distintas formas según el tipo de flor. Las plantas hermafroditas se autopolinizan antes de la apertura de la flor, evitando depresión endogámica lo que permite realizar repetidos autocruzamientos para fijar el carácter deseado (Carrera y Mateo, 2005).

La forma de la planta de papaya es similar a una palmera. Las plantas jóvenes (1 a 2 años de edad) tienen un tallo único que en cultivos fértiles puede desarrollar ramas gruesas a partir de este. Las hojas son palmeadas, con lóbulos profundos soportadas por pecíolos lisos y huecos que forman cicatrices bastante texturizadas en el reverso de la hoja. Tienen un tiempo de generación corto (alrededor de 8 a 12 meses) desde la etapa de semilla hasta la maduración de nuevos frutos (Litz, 2005). Es una especie semi-perenne que a nivel comercial tiene una vida productiva de dos años y medio (IICA, 2008).

Los frutos de la papaya son grandes y de forma oval. Estos se forman en el tallo principal, usualmente de manera individual y algunas veces en pequeños grupos. El peso de los frutos varía desde los 200 gramos hasta los 9 Kg y son verdes hasta la maduración volviéndose rojos-naranjas. La composición nutrimental de la papaya se enlista en el Cuadro 1. El tipo de fruta varía según el sexo de la planta. Los frutos de las plantas hermafroditas tienen forma piriforme/ovalada y de piel gruesa, mientras que los de las plantas femeninas son más redondos y de piel delgada (ver Cuadro 2). El mesocarpio (pulpa) tiene un color amarillo-naranja, es comestible y rodea a la cavidad de semillas, las cuales son negras y pequeñas (0.47 cm). Las semillas están rodeadas por un arilo gelatinoso que las une a la pulpa (Baraona y Sancho, 1991; Rieger, 2006).

Cuadro 1. Composición de la fruta de papaya. Tomado de FAO, 2012.

Componente	Papaya de México
Humedad %	88.80
Proteínas %	0.60
Grasa %	0.10
Cenizas %	0.60
Fibra diet. %	
Carbohidratos %	9.90
Potasio (K) mg	257.00
Calcio (Ca) mg	24.00
Fósforo (P) mg	5.00
Hierro (Fe) mg	0.10
Vitamina A mg	21.00
b Caroteno mg	
Tiamina mg	0.03
Riboflavina mg	0.03
Niacina mg	0.30
Vitamina C mg	62.00

La superficie del fruto está cubierta por una capa de ceras epicuticulares y por la cutícula las cuales se ubican encima del tejido epidérmico, este último está compuesto de una capa de células alargadas y uniformes en tamaño y forma (ver Figura 2). Después de la epidermis se encuentran varias capas de células de parénquima: el epicarpio (contiene células pequeñas, cloroplastos y no presenta espacios intracelulares), el mesocarpio (contiene células grandes e isodiamétricas con espacios celulares) y el endocarpio (contiene células estrechas tangencialmente y con brazos grandes de unión a células adyacentes) (Casarrubias *et al.*, 2002).

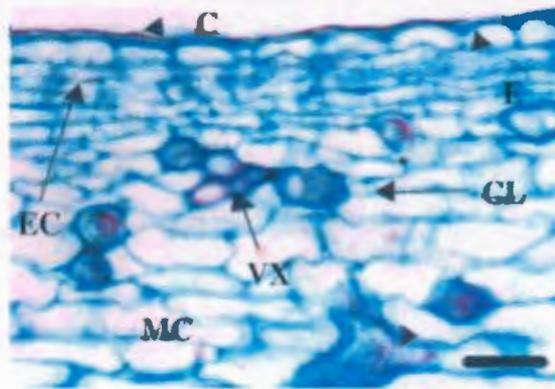


Figura 2. Corte transversal del fruto sano de papaya en maduración de consumo: cutícula (C), epidermis (E), parénquima del epicarpio (EC), mesocarpio (MC), canales lactíferos (CL) y vasos xilemáticos (VX). Barra = 89 μ m. Tomado de Casarrubias *et al.*, 2002.

Las flores masculinas y femeninas son blancuzcas de color amarillo pálido y crecen en diferentes plantas (dioicos): todas tienen cinco pétalos. Las flores masculinas (ver Figura 3M) son tubulares, estrechas y numerosas de 2.5 a 3.8 cm de largo. Están localizadas en racimos ramificados. Las flores masculinas presentan diez estambres, pistilo muy delgado y carecen de estigma (Calderón y Cepeda, 1999). Las flores femeninas (ver Figura 3F) miden alrededor de 5 cm de largo, tienen un tallo muy corto y crecen de manera individual o en pequeños grupos en la base de la hoja (Little *et al.*, 2001). Las flores femeninas no presentan estambres y el pistilo está constituido por un ovario elipsoidal liso, con estigma muy grande y recortado (Calderón y Cepeda, 1999). Los pedúnculos de las flores masculinas son largos mientras que los de las flores femeninas y hermafroditas son cortos (Ríos, 2004). Las flores hermafroditas (ver Figura 3H) tienen pétalos unidos, poseen alrededor de 10 estambres situados al final del tubo de la corola y su pistilo tiene el ovario alargado (Gil y Miranda, 2005).



Figura 3. Flores masculinas (M), femeninas (F) y hermafroditas (H). Tomado de Photomazza (M y F) y Técnicas de Cultivo en las Canarias (H).

Cuadro 2. Tipos de flores de *C. papaya* y sus distintos frutos. Tomado de Baraona y Sancho, 1991.

Tipo	Descripción	Tipo de fruto
Femenina o pistilada	Flores aisladas en las zonas axilares de las hojas unidas con pedúnculo pequeño. Pistilo engrosado y ovoide. Estigma dividido.	Frutos redondeados u ovales. En la base presenta una cicatriz pentagonal.
Masculina o estaminada	Flores que crecen en partículas largas. Corola en forma de tubo con alrededor de 10 estambres.	No produce, aunque a veces estas flores derivan en hermafroditas y producen frutos no comerciales.
Hermafrodita	Crece en racimos cortos en axilas de las hojas. Tienen ambos sexos y tres tipos de flores: petandria, intermedia y elongata (más común).	Frutos con forma de globo o irregulares de poco valor comercial. Frutos alargados.

1.3.3 Genoma de *Carica papaya*

Carica papaya pertenece al orden de las brassicales que se encuentra conformado de 17 familias, tales como las caricáceas (que incluye a *C. papaya*) y a las brasicáceas (que incluye a *Arabidopsis thaliana*). Ambas especies comparten un ancestro común de aproximadamente 70 millones de años. Esta divergencia entre ambas especies y el

conocimiento de sus genomas permite la caracterización funcional de distintos genes en papaya a partir de genes previamente caracterizados en *Arabidopsis* y viceversa (Yang *et al.*, 2004; Lyons *et al.*, 2008).

Comparado con el genoma de otras plantas secuenciadas, *C. papaya* tiene un genoma relativamente pequeño de 372 Mb (que incluye a aproximadamente 27,746 genes) y pocos genes funcionales, teniendo 20% menos que el de *Arabidopsis* y 34% menos que el de arroz (*Oryza sativa*) (Arumuganathan y Earle, 1991; Moore y Ming, 2008). Un poco más de la mitad (52%) del genoma de la papaya consiste en secuencias repetitivas, la mayoría de las cuales son elementos móviles (Nagarajan *et al.*, 2008). Los telómeros en el genoma de papaya consisten en repeticiones de TTTAGGG y estos son aproximadamente diez veces más largos que los presentes en otros miembros de la familia de las brassicáceas. Los genes involucrados en el mantenimiento de los telómeros y la protección de los extremos del cromosoma existen como copias simples, en lugar de copias múltiples como en *Arabidopsis* (Shakirov *et al.*, 2008). Las repeticiones en tándem más abundantes son los microsatélites, pero estos solo representan el 0.19% del genoma de la papaya, teniendo una densidad de uno por cada 0.7 Kb de la secuencia del genoma (Wang *et al.*, 2008).

1.3.4 Comercio

A nivel mundial en el año 2011 se obtuvo una producción de más de 11 millones de toneladas de papaya en una extensión de alrededor de 438,558 Ha, continuando así la tendencia anual de crecimiento en producción y exportación. México se ha mantenido como el principal país exportador de papaya y como el quinto productor a nivel mundial (FAO, 2012).

México es uno de los principales productores de frutas del mundo y ocupa el primer lugar en exportación de aguacate, sandía, limón y papaya, siendo Estados Unidos y Canadá sus principales compradores. De 1994 a 2010 las exportaciones de frutas crecieron en promedio anual un 11.3%. De la producción de los 17.2 millones de toneladas de frutas que se obtuvieron en 2010, 2.6 millones se destinaron al mercado de exportación de fruta en fresco, con un valor superior a los 2,567 millones de dólares. De enero a octubre del 2011 las exportaciones de frutas frescas alcanzaron los 2.2 millones de toneladas con un valor superior a los 2,506 millones de dólares. Los productos agrícolas mexicanos tienen

una buena reputación en el mundo gracias a sus altos niveles de diversidad, sanidad e inocuidad. Esta situación permite a los productores nacionales realizar exportaciones a 43 países del mundo con los que se tienen acuerdos comerciales, principalmente países europeos y asiáticos que cuentan con los más rigurosos estándares de calidad (SAGARPA, 2012).

La producción anual de papaya en México en 2010 fue de alrededor de 616,215 toneladas, siendo los estados de Oaxaca, Chiapas y Veracruz los mayores productores. El estado de Yucatán se ubicó como el octavo productor de papaya a nivel nacional con una producción anual de 17,164 toneladas siendo los municipios de Tizimín, Tepakán y Temozón los mayores productores (SIAP, 2012).

Para poder cosechar los frutos de papaya, los agricultores deben esperar hasta que las papayas cambien naturalmente a un color amarillo. Sin embargo, este proceso no es uniforme en todas las frutas recolectadas. Además, debido a la suavidad de los frutos estos pueden sufrir daños durante el transporte y el tiempo de adquisición a los distribuidores reduciendo su calidad (Roselan y Hidayah, 2010). Basado en su color y etapa de desarrollo, la papaya puede ser exportada a lugares distantes cuando tiene una coloración verde con estrías amarillas, mientras que para mercados locales esta puede transportarse cuando tiene una coloración verde con estrías amarillas y naranjas (Santamaría *et al.*, 2009).

Cuando los frutos de papaya son manipulados o almacenados de manera inadecuada (durante su transporte o comercialización) pueden generarse pérdidas del producto que pueden variar desde un 5 hasta un 100% (Propapaya, 2012). El corto tiempo de vida de almacenamiento del fruto de papaya limita las distancias de exportaciones. Los frutos maduros se suavizan rápidamente y son fácilmente infectados por enfermedades a temperaturas bajas, lo que ocasiona que mucha de la fruta se desperdicie (Mahmud *et al.*, 2008). Para evitar su descomposición los frutos de papaya deben mantenerse refrigerados durante su comercialización, transporte y consumo. El fruto es susceptible al daño por enfriamiento por lo cual no debe almacenarse a temperaturas menores de 7°C. La fruta puede conservarse de 1 a 3 semanas entre 7°C y 13°C en presencia de una humedad relativa entre 85% a 90% dependiendo del grado de maduración (Arias y Toledo, 2007). Se sabe que las temperaturas bajas estimulan la síntesis de etileno, ocasionando

una aceleración de la maduración de los frutos (Wang, 1982; Chan *et al*, 1985). El etileno es una hormona que juega un papel vital en el reblandecimiento y maduración de las frutas. Estudios previos indican que la producción de etileno en frutos, como tomate y pepino, así como el reblandecimiento y maduración de los frutos se ven influenciados por radicales libres superperóxidos e hidroperóxidos producidos por ciertas proteínas tales como las LOXs (Sheng *et al.*, 2000; Xue-Yong *et al.*, 2012).

Normalmente la recolección, envasado y transporte de las papayas son procesos de larga duración. Estos factores incrementan las posibilidades de que el producto pueda presentar laceraciones físicas. Debido a la gran diversidad de dificultades que pueden presentarse durante el manejo, almacenamiento y transporte de los frutos se requiere la generación de nuevos conocimientos que permitan la disminución de las pérdidas o la prolongación del tiempo de vida de anaquel de los frutos de papaya.

1.4 Fosfolipasas D

Las fosfolipasas son enzimas que hidrolizan parte de los fosfolípidos componentes de las membranas celulares (Wang, 2000). Constituyen un grupo diverso y pueden ser clasificadas en fosfolipasas D (PLD), C (PLC), A₂ (PLA₂), A₁ (PLA₁) y B (PLB) de acuerdo al sitio de hidrólisis en los fosfolípidos. Cada clase puede dividirse en subfamilias basadas en sus secuencias, propiedades bioquímicas o una combinación de ambas (Richmond y Smith, 2011). La estabilidad de las membranas celulares está altamente relacionada con la tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico (Campos *et al.*, 2003). El deterioro de las membranas celulares acelera el oscurecimiento enzimático y la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) en los frutos de diversas plantas (ver Figura 4). Las fosfolipasas se consideran enzimas clave en la medición de la degradación de las membranas celulares, un acontecimiento rápido y temprano en la senescencia de los tejidos durante la postcosecha (Li *et al.*, 2009). Las plantas acumulan ácido fosfatídico y ácidos grasos insaturados que son liberados a partir de lípidos, probablemente por fosfolipasas tipos D y A₂ (Wang, 2000; Bargman *et al.*, 2009).

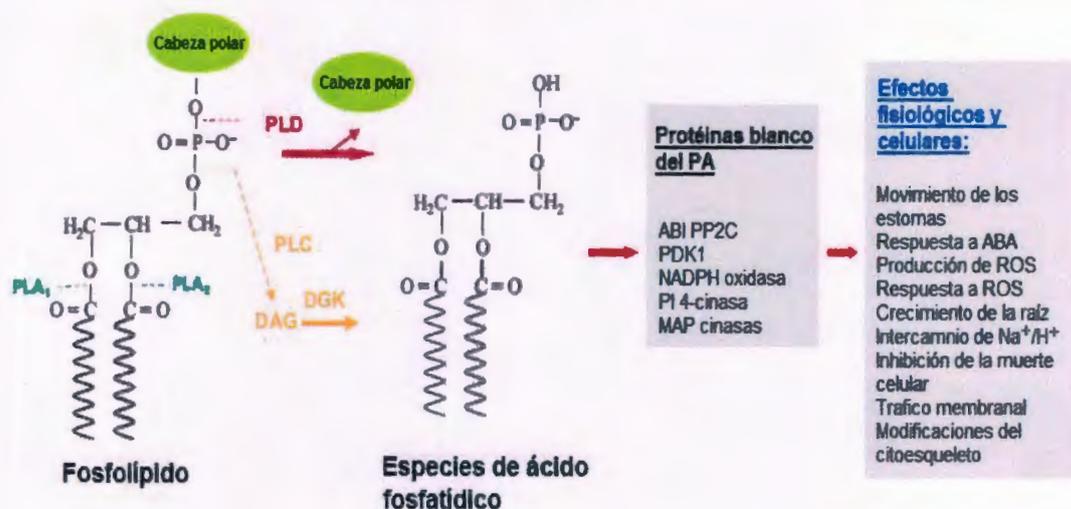


Figura 4. Clasificación de las fosfolipasas y efectos fisiológicos celulares de compuestos derivados de Ácido Fosfatídico (PA). Modificado de Hong *et al.*, 2010.

Las fosfolipasas D (PLDs por sus siglas en inglés) hidrolizan fosfolípidos, como la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina, en el enlace fosfodiéster del carbono en la

posición 3 liberando una molécula denominada grupo cabeza (un amino alcohol o una base nitrogenada) y ácido fosfatídico (PA por sus siglas en inglés), este último funciona como un mensajero lipídico implicado en el transporte intracelular de la membrana (ver Figura 4) (McDermott *et al.*, 2004). Reportes previos en diferentes tejidos vegetales indican un aumento significativo de la producción de PA generado por las PLDs en áreas sometidas a daño mecánico. Las PLDs y sus productos inician la ruta de las oxilipinas la cual podría estar involucrada en la actividad de respuesta a daño mecánico, la acumulación de fenoles y el oscurecimiento enzimático en diversos tejidos vegetales (Lee *et al.*, 2001; Bargman y Munik, 2006).

1.4.1 Clasificación de las PLDs

En *Arabidopsis thaliana* se conocen 12 genes que codifican para proteínas tipo PLDs: PLD α (1, 2 y 3), β (1 y 2), γ (1, 2 y 3), δ , ϵ y ζ (1 y 2) (Wang, 2005; Hong *et al.*, 2010). Las PLDs muestran diferentes dependencia hacia dos reguladores celulares: el Ca^{2+} y el fosfatidil-inositol 4,5-bifosfato (PIP_2). Las PLD α s representan la actividad convencional y predominante de las PLDs, son independientes del PIP_2 y actúan en concentraciones milimolares de Ca^{2+} (Pappan y Wang, 1999). Las PLDs β y γ son dependientes del PIP_2 y de concentraciones micromolares de Ca^{2+} (Qin *et al.*, 1997). Las PLD δ s son reactivas a altas concentraciones micromolares o bajas concentraciones milimolares de Ca^{2+} y son estimuladas por la inclusión de ácido oleico; en contraste, las PLD ζ s son dependientes del PIP_2 pero independientes del Ca^{2+} (Qin *et al.*, 2002).

Los productos lipolíticos de las PLDs, tales como el PA y sus derivados, funcionan como mensajeros secundarios que afectan la estabilidad de las membranas celulares durante la senescencia y otros tipos de estrés (Paliyath y Droillard, 1992; Munnik *et al.*, 1998; Liscovitch *et al.*, 2000). Se ha observado en plantas de tomate que estos productos interactúan con proteínas G estimulando la apertura de canales de calcio (Aharon *et al.*, 1998). Las proteínas G son estimuladas por diferentes tipos de estrés abiótico incluyendo al estrés por daño mecánico (Urao *et al.*, 1999).

1.4.2 Estructura de las PLDs y Sitios Activos

El sitio activo de las PLDs está formado por cuatro dominios conservados de aminoácidos (I-IV) de los cuales los dominios II y III contienen la secuencia HxKxxxxDxxxxxxGSxN

(abreviados como HKD, donde x representan aminoácidos no conservados) que se encargan de la hidrólisis de los fosfolípidos (Ponting y Kerr, 1996; Xie *et al.*, 2000). Los residuos de histidina (H), lisina (K) y ácido aspártico (D) están involucrados en la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster de los fosfolípidos (ver Figura 5). La histidina actúa como un nucleófilo que ataca al átomo de fósforo del fosfolípido (Sung *et al.*, 1997; Stuckey y Dixon, 1999). El sitio activo de las PLDs se forma cuando las secuencias de HKD están en la proximidad adecuada (ver Figura 6). La reacción ocurre de acuerdo al mecanismo ping-pong: un ataque sucesivo al sustrato por el grupo imidazol de las histidinas, componentes de las secuencias HKD. El ácido fosfatídico del fosfolípido liberado forma un enlace covalente temporal con el grupo imidazol del grupo histidina de la PLD produciendo un intermediario temporal que puede ser fácilmente liberado al reaccionar con agua (Tavernier y Pugin, 1995; Orth *et al.*, 2010).

Las PLDs de plantas contienen un dominio encargado de la captación del Ca^{2+} y la interacción con los fosfolípidos, llamado dominio C2. Este dominio se ubica en el extremo N terminal, y regula la translocación del Ca^{2+} entre el citosol y las membranas (Wang, 2000; Müller y Petry, 2006). La unión del dominio C2 con el Ca^{2+} participa en el proceso de translocación de la PLD a sus sustratos en las membranas e induce cambios en la conformación de la enzima (Tiwari y Paliyath, 2011). Cuando la concentración de Ca^{2+} es baja, las moléculas con carga negativa PtdInsP y PtdIns(4,5)P_2 atraen a los aminoácidos arginina (R) y lisina (K), con carga positiva, del dominio C2 favoreciendo el enlace con los sustratos de la $\text{PLD}\alpha$ y la catálisis por $\text{PLD}\beta$ y $\text{PLD}\gamma$ (Hong *et al.*, 2010). Las PLDs también incluyen al dominio PLD C terminal, el cual tiene una longitud aproximada de 70 aminoácidos. Posee una secuencia conservada de FPD que está asociado a los dominios C2 y a los motivos del sitio activo de las PLD (Guo *et al.*, 2006).

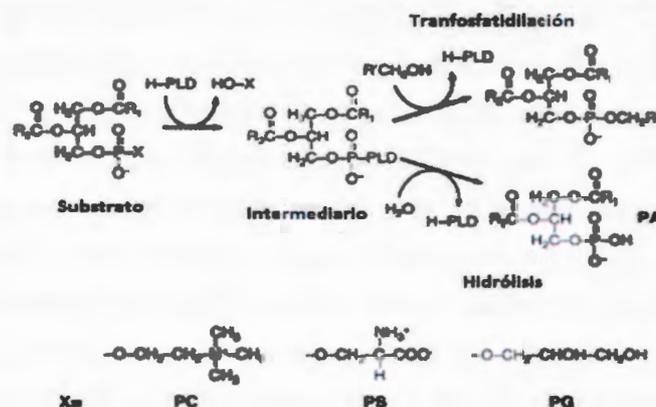


Figura 5. Reacciones catalizadas por las PLDs y estructuras comunes de fosfolípidos que son sustratos de las PLDs. R representa un grupo alquilo, X representa un grupo polar. Modificado de Uesugi y Hatanaka, 2009.

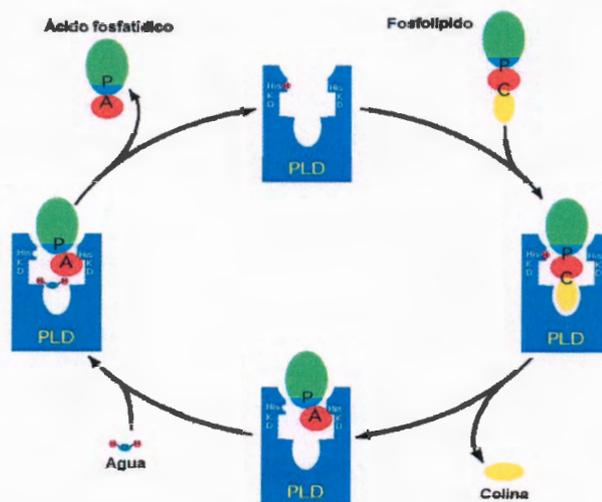


Figura 6. Mecanismo de acción de la hidrólisis de la fosfatidilcolina (PC) a ácido fosfatídico (PA) y colina. Modificado de Jenkins y Frohman, 2005.

1.4.3 Efecto del silenciamiento/sobreexpresión de PLDs en plantas

Se ha reportado que el silenciamiento del gen *AtPLD α 1* de *Arabidopsis thaliana*, tanto en variedades silvestres como tolerantes a temperaturas bajas, genera plantas con mayor tolerancia a la congelación (Welti *et al.*, 2002). También se ha observado aumentos significativos en la acumulación de osmolitos en plantas deficientes del gen *AtPLD α 1*

(Rajashekar et al., 2006). Otros reportes indican que el silenciamiento del gen *AtPLD α 1* disminuye la respuesta del cierre de estomas en presencia de ABA debido a la disminución de la producción de óxido nítrico (NO), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y PA (Zhang et al., 2009). La sobreexpresión del gen *AtPLD δ* de *Arabidopsis thaliana*, tanto en variedades silvestres como tolerantes a temperaturas bajas, genera plantas con mayor tolerancia a la congelación (Li et al., 2004). Se ha reportado que la supresión de los genes *AtPLD α 1* y *AtPLD δ* , ya sea de manera individual o simultánea, en *Arabidopsis thaliana* inhibe el cierre de los estomas ante condiciones de estrés hídrico (Uraji et al., 2012). También se ha demostrado que la supresión de los genes *AtPLD α 1* y *AtPLD δ* disminuye la producción de PA cuando las plantas son sometidas a estrés por daño mecánico; sin embargo, las plantas con silenciamiento no son más susceptibles al daño mecánico que las plantas control (Bargmann et al., 2009).



1.5 Lipoxigenasas

Las lipoxigenasas son enzimas dioxigenasas que estereo específicamente insertan oxígeno molecular en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs por sus siglas en inglés) produciendo hidroperóxidos de ácidos grasos poliinsaturados (Koshiishi *et al.*, 2006). Se encuentran ampliamente expresadas en animales, plantas y también en algunos hongos y bacterias (Quinn y Wang, 2008; Zheng y Brash, 2010). Las enzimas LOXs de plantas no se encuentran delimitadas en un órgano en particular. Su presencia se ha confirmado en raíces, cotiledones, hipocótilos, flores y hojas y aún dentro de una misma planta, la actividad enzimática puede variar ampliamente dependiendo del órgano (Sanz *et al.*, 1992).

Las lipoxigenasas llevan a cabo la transformación de los sistemas 1,4-cis (cispentadieno) de los PUFAs hasta un sistema 1-hidroperoxi-2,4-cis, trans-pentadieno (ver Figura 7) (Fernández *et al.*, 1994; Staswick y Tiryaki, 2004). Su especificidad requiere que los dobles enlaces tengan una configuración *cis*, que el grupo metilénico central ocupe la posición ω -8 y que el átomo de hidrógeno que se va a separar del mismo esté en posición L (Bello, 2000). El paso inicial y limitante de la velocidad de la reacción involucra la abstracción concertada de un protón y la oxidación de un electrón del sustrato PUFA produciendo un radical que es deslocalizado a través del sistema pentadieno. Después, el radical del PUFA reacciona con una molécula de oxígeno formando un radical peróxido intermediario que es después reducido y protonado por el centro ferroso de la enzima y una molécula de agua, respectivamente. La enzima entonces se prepara para la siguiente reacción (Youn *et al.*, 2006; Koshiishi *et al.*, 2006). La reacción enzimática requiere una energía de activación menor que la reacción puramente química y se requieren sustratos específicos ya que el ácido graso debe contener al menos dos enlaces dobles *cis* interrumpidos por un grupo metileno (Gurr *et al.*, 2002; Ivanov *et al.*, 2010).

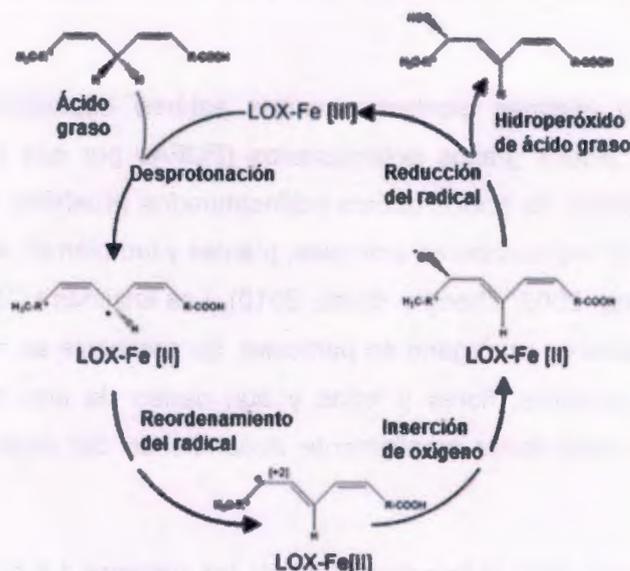


Figura 7. Mecanismo de acción de las enzimas lipoxigenasas. Modificado de Ivanov *et al.*, 2010.

En plantas, la inserción del oxígeno puede darse en dos posiciones: en el carbono en la posición 9 (C-9) o en el carbono en la posición 13 (C-13), dando lugar a hidroperóxidos 9- ó 13- con estereoespecificidad S (Palmieri-Thiers *et al.*, 2009) (ver Figura 8). Reaccionan predominantemente con ácidos grasos poliinsaturados C-18, tales como el ácido linoleico (18:2) (LA por sus siglas en inglés) y el ácido α -linolénico (18:3) (ALA por sus siglas en inglés), produciendo mayormente ácido 13-hidroperoxioctadecadienoico (13-HPODE por sus siglas en inglés) y ácido 13-hidroperoxioctadecatrienoico (13-HPOTrE por sus siglas en inglés), respectivamente (Oliw, 2002; Youn *et al.*, 2006). Estos productos, los hidroperóxidos de ácido octadecadienoico (HPOD por sus siglas en inglés) y los de ácido octadecatrienoico (HPOT por sus siglas en inglés), son sustratos de diferentes enzimas (incluso otras LOXs) en la ruta metabólica de las LOXs (Gobel *et al.*, 2001) y son referidas como fito-oxilipinas u oxilipinas (Feussner y Wasternack, 2002; Liu y Han, 2010). Las oxilipinas son una clase amplia y diversa de ácidos grasos poliinsaturados oxigenados y otros derivados (Rosahl y Feussner, 2005). La mayoría de las oxilipinas son producidas a través de la ruta de las LOXs la cual está involucrada con al menos otras siete rutas multienzimáticas (Feussner y Wasternack, 2002). Dos de las más estudiadas son la ruta de la aleno óxido sintetasa (AOS por sus siglas en inglés) y la hidroperóxido liasa (HPL por sus siglas en inglés). En la ruta de la HPL se generan compuestos volátiles C6

conocidos como GLVs (Green Leaf Volatiles por sus siglas en inglés) los cuales poseen actividad antimicrobiana (Prost *et al.*, 2005) y de defensa (Bate y Rothstein, 1998). En la ruta de la AOS se produce ácido jasmónico y otros derivados, como la jasmonil-isoleucina (JA-Ile) (ver Figura 9), llamados jasmonatos. Los jasmonatos están involucrados en funciones fisiológicas (ver Cuadro 3) de las plantas tales como su crecimiento, desarrollo, senescencia y respuestas al estrés (Tumer *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2008; Hwang y Hwang, 2010).

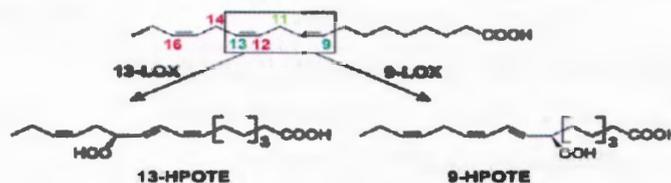


Figura 8. Productos de la reacción de las LOXs. Tomado de Feussner y Wasternack, 2002.

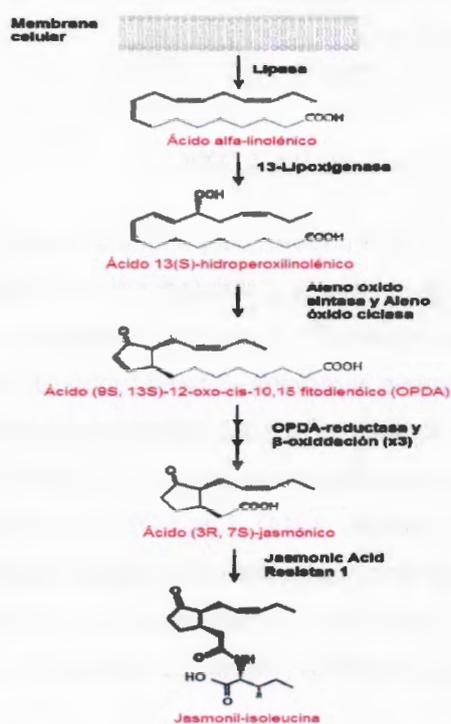


Figura 9. Ruta de las oxilipinas. Modificado de Browse, 2009 y Hamann *et al.*, 2009. Nomenclatura: 13-LOX: 13-lipoxigenasa, AOS: aleno óxido sintasa, AOC: aleno óxido ciclasa, JAR1: Jasmonic Acid Resistant1.

Cuadro 3. Algunas de las funciones fisiológicas de los productos derivados de lipoxigenasas en plantas. Tomado de Gurr *et al.*, 2002.

Situación	Respuesta(s)	Compuestos involucrados
Resistencia a patógenos	Expresión de LOXs como sistemas de defensa.	Ácido jasmónico; fitoalexinas (Hexanal).
Estrés por sequía	Acumulación de derivados 9-hidroperoxi de lípidos de la membrana.	Lípidos 9-hidroperoxigenados.
Senescencia	Inactivación del sistema fotosintético y oxidación de la clorofila. Efectos complementarios con ABA y la producción de oxígeno.	Jasmoninas.
Maduración de frutos	Efectos diferenciales de jasmonatos en la formación de etileno.	Jasmoninas.
Inducción de tubérculos	Estimulación de la expansión celular y acumulación de carbohidratos.	Ácido tuberónico y otras jasmoninas.

1.5.1 Estructura y Sitio Activo de las LOXs

Las lipoxigenasas consisten en una cadena polipeptídica simple con una masa molecular de alrededor de 75-80 kDa en animales y alrededor de 94-104 kDa en plantas (Brash, 1999). La estructura general de las LOXs, tanto en plantas como animales, consiste en dos dominios grandes: un dominio N-terminal- β -barril (conocido como PLAT) y un dominio C-terminal (conocido como dominio LOX) mayormente α -helicoidal (ver Figura 10). Un átomo de hierro (que forma parte del sitio activo) se encuentra situado en el dominio C-terminal (Rapp *et al.*, 2009; Umate, 2011). Las LOXs de algunas plantas pueden ser enzimáticamente divididas en dos fragmentos que pueden permanecer estrechamente asociados mientras que la enzima aún permanece activa. La separación de los dominios produce la pérdida de actividad catalítica (Ramachandran *et al.*, 1992).

El dominio C-terminal o dominio LOX consiste de 18 a 22 hélices y de una a dos láminas β antiparalelas en el extremo opuesto al barril N-terminal. Dos largas hélices centrales cruzan por el sitio activo; ambas hélices incluyen tramos internos de la hélice que proveen tres ligandos de histidina al sitio activo de hierro (Gillmor *et al.*, 1997).

El dominio N-terminal o dominio PLAT está compuesto de aproximadamente 150 residuos. Este dominio lleva a cabo la unión de la LOXs con las membranas y la adquisición del sustrato. Posee una estructura de β -barril compuesto de dos hojas de cuatro hebras cada una. Las regiones más conservadas coinciden con las hebras β y la mayoría de los residuos conservados son internos a excepción de una lisina o arginina que se produce en la superficie de la quinta hebra β (Bateman y Sandford, 1999; Tatulian *et al.*, 1998). Estudios recientes de la sobreexpresión de una lipoxigenasa del maíz (*Zea mays*), la ZmLOX1, en plantas transgénicas de arroz (*Oryza sativa*) indican que el dominio PLAT desempeña una función esencial en la captación del Ca^{2+} así como en la translocación y adhesión de la ZmLOX1 a las membranas de los cloroplastos (Cho *et al.*, 2011).

La activación específica de las LOXs es una propiedad muy importante de sus roles en las funciones celulares ya que al encontrarse aisladas éstas presentan un estado ferroso (Fe^{2+}) inactivo el cual cambia a un estado férrico activo (Fe^{3+}) cuando reaccionan con un equivalente del producto hidroperóxido (Fernández *et al.*, 1994; Weckler *et al.*, 2008).

La oxidación de la enzima férrica activa es requerida para la catálisis (Brash, 1999). El átomo de hierro está octaédricamente coordinado con cinco residuos de aminoácidos conservados entre los distintos reinos: tres histidinas, una asparragina y un residuo de isoleucina (o valina) en el extremo C-terminal. Una molécula de agua o un grupo hidróxido pueden ocupar la posición del sexto ligando (Brash, 1999; Andreou *et al.*, 2010).

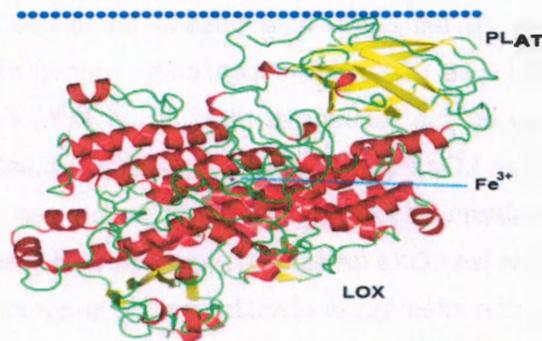


Figura 10. Estructura tridimensional de la proteína lipoxigenasa L-1 de soja. Componentes: dominio PLAT (N-terminal), dominio LOX (C-terminal) y el átomo de hierro (integrado en el dominio LOX). Modificado de OPM, 2013.

1.5.2 Clasificación y nomenclatura

Existen diferentes clasificaciones de las LOXs. Una forma de clasificar a las LOXs de plantas consiste en su agrupación de acuerdo a la regioespecificidad de la oxigenación clasificándose en enzimas 9-LOX, que forman específicamente ácidos 9-hidroxi-peroxi grasos, o 13-LOX, que predominantemente catalizan la formación de ácidos 13-hidroperoxi grasos (Youn *et al.*, 2006; Bannenberg *et al.*, 2009). Esta nomenclatura está basada en la inserción del oxígeno (carbono 9 o 13) y en las estereoconfiguraciones R/S y E/Z del producto hidróxido-PUFA resultante (Stanley, 2000; Farooqui, 2011). Los sustratos más comunes de las LOXs de plantas (linoleatos o linolenatos) siguen un mecanismo 13-LOX. Los carbonos de los sustratos se cuentan desde la cola hasta el final de la cadena y el oxígeno reacciona en la posición ω -6 (Brash, 1999). Algunas enzimas LOX pueden formar ácidos grasos 9- y 13- hidroperoxi y son denominadas como LOXs no tradicionales. Las LOXs no tradicionales son recurrentes en plantas monocotiledóneas (Kim *et al.*, 2003; Jang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008). Las lipoxigenasas LOX1, 2 y 3 de la soya tienen distintos productos específicos a distintos valores de pH. La LOX1 tiene un pH óptimo de 9, produciendo ácido (13S)-hidroxiperioxioctadecanoico (HPOD) como el mayor producto del ácido linoléico. La LOX2 tiene un pH óptimo de 6.1 y forma proporciones iguales de 9- y 13-HPODs, mientras que la LOX3 tiene un pH óptimo de 6.5 y produce aproximadamente 9- y 13-HPODs con una relación respectiva de 65% y 35% (Huang y Schawn, 2011).

Otra forma de clasificación de las LOXs está basada en el tipo de similitud de sus secuencias de aminoácidos. Las LOXs tipo 1 contienen aminoácidos de no-transición, comparten una similitud alta en sus secuencias (más de un 75%) y pueden ser 9- o 13-LOXs (Liu y Han, 2010). Las LOXs tipo 2 poseen secuencias putativas de péptidos de tránsito al cloroplasto, muestran una similitud moderada de sus secuencias (alrededor de un 35%) y la gran mayoría de las LOXs de este tipo son 13-LOXs (Feussner y Wasternack, 2002). Las LOXs tipo 2 pueden además ser divididas en dos subgrupos (ver Figura 11). El primero incluye a aquellas LOXs involucradas en la biosíntesis de ácido jasmónico inducida por lesiones en la planta. El segundo grupo consiste en isoformas de LOXs que juegan un papel clave en la generación de derivados de ácidos grasos volátiles de cadena corta (Mariutto *et al.*, 2011).

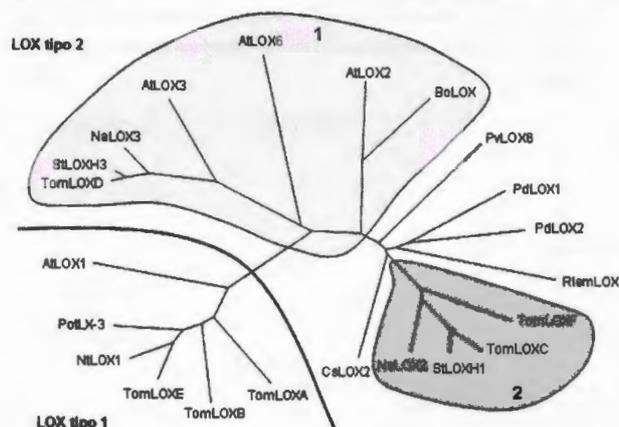


Figura 11. Ejemplos de LOXs tipo1 y tipo 2. Tomado de Mariutto *et al.*, 2011.

1.5.3 Localización intracelular y ruta de las oxilipinas

La localización intracelular de las LOXs proporciona información de sus distintas funciones fisiológicas en las plantas. Se ha observado una ocurrencia de formas particulares en el citosol y las vacuolas. En cotiledóneas además de LOXs solubles se han encontrado LOXs particulares en las membranas microsomales, membranas plasmáticas y en cuerpos lipídicos. Se pueden distinguir 12 diferentes LOXs en pepino, mientras que en las hojas de soya hay más de seis diferentes LOXs. En plantas como la cebada, *Arabidopsis thaliana* y la espinaca se han detectado LOXs mayormente en el interior de los cloroplastos de las hojas (Feussner y Wasternack, 2002; Xue-Yong *et al.*, 2012).

La Figura 12 es un modelo propuesto de la localización de las LOXs y otras enzimas en la ruta de las oxilipinas. Las 13-LOXs cloroplásticas producen 13-HPOT que es empleado en la síntesis de ácido jasmónico por la acción de la AOS en la envoltura interna del cloroplasto. Los hidroperóxidos 9- y 13-, que son empleados para la síntesis de compuestos C6 volátiles por la acción de la hidroperóxido liasa (HPL), localizada en la envoltura externa del cloroplasto, son producidos por LOXs citosólicas o cloroplásticas. Estos compuestos también están involucrados en la peroxidación de los lípidos de la membrana que eventualmente actúan como parte de la respuesta hipersensible de plantas infectadas por patógenos (Porta y Rocha, 2002).

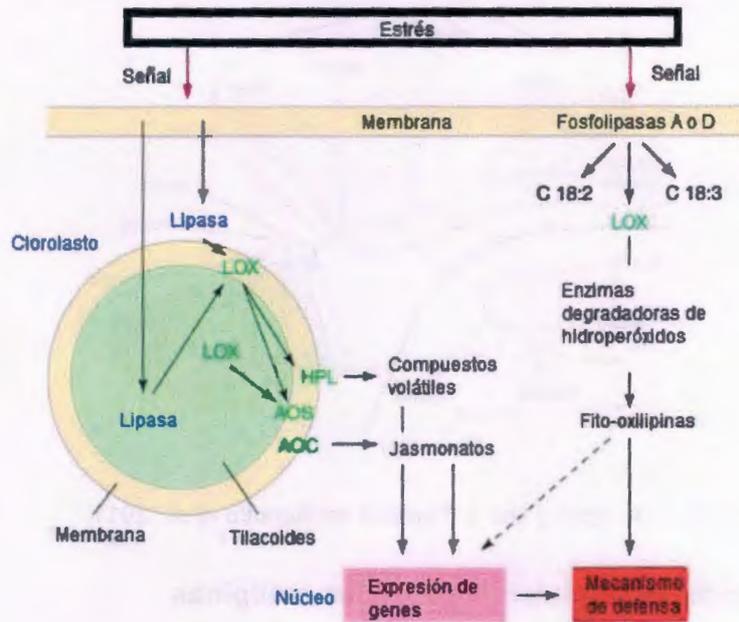


Figura 12. Localización de las LOXs en la ruta de las oxilipinas. Modificado de Blee, 2002.

1.5.4 Genes que codifican para proteínas tipo LOX

Los genes LOXs de la oliva (*Olea europaea*) son predominantemente expresados durante la maduración del fruto y se cree que este hecho se relaciona con la senescencia de la planta (Palmieri-Thiers *et al.*, 2009). Casos similares se han observado en el kiwi (*Actinida deliciosa*), puesto que parece ser que la actividad de los genes LOXs incrementa con la maduración del fruto inducida por etileno (Zhang *et al.*, 2006). También se sabe que algunos genes LOXs intervienen en la germinación de arroz (*Oryza sativa*) (Mizuno *et al.*, 2003) y de la almendra (*Prunus dulcis*) (Mita *et al.*, 2001). Los genes LOXs son de suma importancia en la generación de los compuestos volátiles que conforman el aroma del durazno (*Prunus persica*) (Zhang *et al.*, 2011). Se han identificado cinco diferentes genes LOXs durante la maduración del tomate (*Solanum lycopersicum*) (*TomLOXA, B, C, D* y *E*) (Schawb *et al.*, 2008).

En chícharo (*Pisum sativum*), los genes LOXs exhiben especificidad tisular y regulan el desarrollo. Se cree que algunos participan en el desarrollo de nódulos de las raíces y tiene un papel defensivo en las relaciones tróficas entre plantas y nematodos patógenos (Veronico *et al.*, 2006). Un gen 9-LOX es transitoriamente inducido durante el crecimiento

de la papa y su supresión resulta en la reducción del tamaño del tubérculo (Kolomiets *et al.*, 2001). Se han identificado varios locus de lipoxigenasas en el genoma completo de *Arabidopsis thaliana* (ver Cuadro 4) y en genoma casi completo de *Medicago truncatula*. Esto sugiere que pueden existir genes LOXs no identificados en otras especies de plantas (Shin *et al.*, 2008).

Cuadro 4. Características de las AtLOXs. Tomado de TAIR, 2012.

AtLOX	Funciones	Localización	Número de acceso (NCBI)
AtLOX1	Defensa contra bacterias, crecimiento, oxidación de lípidos, degradación de las membranas celulares y biosíntesis de ácido jasmónico.	Citoplasma, plásmidos	NM_104376.2
AtLOX2	Transporte de iones de calcio, biosíntesis de ácido jasmónico y respuesta a temperaturas bajas.	Cloroplasto, citoplasma	NM_114383
AtLOX3	Sistema de defensa del cloroplasto, biosíntesis de etileno, crecimiento y oxidación de lípidos.	Cloroplasto	NM_101603
AtLOX4	Crecimiento, oxidación de lípidos, defensa contra bacterias, respuesta a daños mecánicos y biosíntesis de ácido jasmónico.	Cloroplasto	NM_105911
AtLOX5	Defensa contra insectos, oxidación de lípidos, desarrollo de raíces y biosíntesis de ácido jasmónico.	Cloroplasto, citoplasma	NM_113137
AtLOX6	Oxidación de lípidos, respuesta a daños mecánicos y biosíntesis de ácido jasmónico.	Cloroplasto, membrana plasmática	NM_105423

1.5.5 Expresión de los genes LOX en condiciones de estrés abiótico y biótico

En la actualidad se conocen varios factores que propician la expresión de genes LOXs. Algunos ejemplos son la inducción por jasmonatos, heridas en las plantas (Seltman *et al.*,

2010), infestación por plagas de insectos (Liu y Han, 2010) y la disminución de la temperatura (Zhang *et al.*, 2011).

Algunos genes LOXs son activados por el daño causado por gusanos en plantas como *Arabidopsis thaliana*, tabaco y tomate (Bruinsma *et al.*, 2010). Se conocen seis diferentes genes LOXs en *Arabidopsis thaliana*: dos 9-LOXs (*AtLOX1* y *AtLOX5*) y cuatro 13-LOXs (*AtLOX2*, *AtLOX3*, *AtLOX4* y *AtLOX6*) (TAIR, 2010; Kilaru *et al.*, 2011). El gen *AtLOX1* aumenta su expresión durante el ataque de patógenos y durante el tratamiento con ácido jasmónico y MeJA (Melan *et al.*, 1993). El gen *AtLOX2* es necesario para la síntesis de ácido jasmónico por heridas en la planta (Bell *et al.*, 1995). Los genes *AtLOX3* y *AtLOX4* son necesarios para la fertilidad masculina (Caldelari *et al.*, 2011). El gen *AtLOX5* participa en el desarrollo de las raíces (Vellosillo *et al.*, 2007). Los genes *AtLOX6*, *AtLOX2*, *AtLOX3* y *AtLOX4* participan en el sistema de respuesta de hojas sometidas a daño mecánicos (Chauvin *et al.*, 2012).

Dos genes 13-LOXs de *Solanum tuberosum* (papa), *LOXH1* y *LOXH3*, presentan diferentes patrones de expresión cuando el tejido de la planta es dañado: *LOXH1* mantiene su expresión constante mientras que *LOXH3* aumenta su expresión de manera significativa (Royo *et al.*, 1996; Farmaki *et al.*, 2007). En plantas de *Solanum lycopersicum* (tomate) sometidas a daño mecánico se presenta un incremento de la expresión del *TomLOXD* (ortólogo de la *LOXH3* de papa) en hojas mientras que la expresión del *TomLOXC* (ortólogo de la *LOXH1* de papa) mantiene su expresión constante en frutos dañados (Heitz *et al.*, 1997).

Se ha observado que los genes LOXs de diversas plantas sometidas a tratamientos con fitohormonas presentan diferentes respuestas de expresión. Recientemente los genes LOXs del maíz *ZmLOX10* y *ZmLOX11* han sido caracterizados molecular y bioquímicamente. *ZmLOX10* se expresa preferencialmente en hojas y es inducido en respuesta a heridas, temperaturas bajas, inoculación con *Cochliobolus carbonum*, hormonas defensivas como el JA, SA y ABA. *ZmLOX11* se expresa preferencialmente en los estigmas y es inducido en las hojas por la presencia de ABA, lo que indica su posible participación en las respuestas al estrés osmótico (Nemchenko *et al.*, 2006). *ZmLOX6* presenta una disminución de su expresión al ser sometido a tratamientos con SA y ABA, mientras que es inducido por el JA (Nemchenko *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2008).

Estudios realizados en frutos de durazno (*Prunus persica*) sometido a temperaturas bajas reportaron que el gen *PpLOX4* aumenta su expresión durante el tiempo que el fruto es almacenado a bajas temperaturas y posteriormente disminuye su expresión cuando el fruto se mantiene a temperatura ambiente. La expresión de los genes *PpLOX1*, *PpLOX2* y *PpLOX3* en general presentaron un comportamiento contrario al del *PpLOX4* en las mismas condiciones de estrés (Zhang *et al.*, 2011).

Un estudio realizado en *Caragana jubata*, una especie de planta que crece en zonas de elevada altitud y de frío extremo de los Himalayas (Bhardwaj *et al.*, 2010), reveló que el gen *CjLOX* se expresa a temperaturas bajas y que su regulación está influenciada por distintas fitohormonas tales como el ABA, SA y MeJA, observándose un aumento de la expresión debido al MeJA. Esta información sugiere que la ruta metabólica del jasmonato tiene un rol importante en respuestas a las bajas temperaturas (Kumar *et al.*, 2011).

Se ha reportado que frutos de pepino (*Cucumis sativus L.*) sometidos a tratamientos con MeJA y daño mecánico aumentan la expresión de 10 genes *CsLOXs* (Xue-Yong *et al.*, 2012).

1.5.6 Efecto del silenciamiento/sobreexpresión de LOXs en plantas

La modificación de la expresión de las LOXs en diferentes especies de plantas genera cambios significativos en los mecanismos de respuesta a distintos tipos de estrés. Por ejemplo, plantas transformadas de tabaco con silenciamiento de los genes que codifican para las LOXs son más susceptibles al ataque de insectos que suelen alimentarse de la planta de tabaco así como de nuevas especies de insectos (Kessler, Halitschke y Baldwin, 2004). Un efecto similar se observa en plantas de papa con silenciamiento del gen *LOXH3* ya que estas presentan menor resistencia al daño mecánico producido por herbívoros. Esto probablemente se deba a la disminución de la actividad de los genes de respuesta al JA y de inhibidores de proteínas. Sin embargo, los niveles de jasmonatos se mantuvieron constantes (Royo *et al.*, 1999). En contraste, el silenciamiento del gen *LOXH1* en la planta de papa genera una disminución de la cantidad e intensidad de los compuestos volátiles mientras que los genes de respuesta al JA no modificaron su nivel de expresión cuando se aplicó estrés por daño mecánico en la planta (León *et al.*, 2002; Salas *et al.*, 2005).

Los silenciamientos de los genes *TomLOXA* y *TomLOXB* no producen cambios significativos en el aroma de frutos de tomate; pero la supresión del gen *TomLOXC* afecta de manera importante la producción de compuestos volátiles derivados de ácidos grasos (Chen *et al.*, 2004; Schawb *et al.*, 2008).

En el caso de *Arabidopsis thaliana* la supresión del gen *AtLOX2* disminuye la susceptibilidad de la planta al parasitoide *C. rubecula*, debido probablemente al cambio de la producción de compuestos volátiles (Van Poecke y Dicke, 2002). También se ha reportado que la supresión simple o combinada de las *AtLOXs* 2, 3, 4 y 6 causan una disminución significativa de la síntesis de JA y jasmonil-isoleucina, mayor susceptibilidad de las plantas al daño mecánico producido por larvas de insectos que se alimentan de las hojas nuevas y modificación del fenotipo de la planta (Chauvin *et al.*, 2012).

1.2 JUSTIFICACIÓN

México presenta una gran variedad de vegetación, ocupando el cuarto lugar a nivel mundial con 25,000 especies registrada de las 250,000 conocidas y se calcula que hay 30,000 más aún no descritas dentro del territorio nacional, lo cual lo colocaría en segundo lugar en el mundo (INEGI, 2011). México es uno de los países líderes en el comercio internacional de productos hortofrutícolas (Macías, 2010) siendo en el 2010 el primer exportador de Papaya a nivel mundial (FAO, 2012). Sin embargo, se ha reportado que las frutas tropicales pueden presentar pérdidas de entre el 30% y 60% después de su cosecha durante su transporte y almacenamiento (Hewett, 2003). En el caso de los frutos de papaya mexicana no se conoce una cifra exacta sobre la cantidad de las pérdidas a nivel postcosecha debido a daño mecánico; sin embargo, según Propapaya (2012), se sabe que las pérdidas pueden ser desde un 5% y hasta un 100% cuando el producto no ha sido tratado adecuadamente y las condiciones de mercado no son las adecuadas.

A pesar de los esfuerzos de los productores para prevenir pérdidas en la producción de frutos de papaya, estas pérdidas permanecen latentes. Una alternativa que ha tomado mucha importancia en los últimos años es la modificación genética de las plantas, debido a que esta alternativa resulta más eficiente cuando se pretende que un organismo tenga una característica determinada. Se sabe que las fosfolipasas D y las lipoxigenasas intervienen de manera importante en las rutas metabólicas de las fitohormonas de las plantas y de respuestas a estrés (Zhao *et al.*, 2010). Estudios previos señalan que la sobreexpresión o el silenciamiento de genes que codifican para las enzimas anteriores tienen importantes consecuencias en estas rutas. A la fecha en el caso de frutos de *C. papaya* no se conoce en su totalidad que elementos de señalización se encuentran involucrados en respuesta a un daño mecánico. Por medio de la presente investigación se pretende llevar a cabo la caracterización a nivel molecular de fosfolipasas D y lipoxigenasas en frutos de *C. papaya* permitiendo a corto plazo entender mejor el mecanismo de señalización activado por un daño mecánico y a largo plazo la generación de frutos más tolerantes a este tipo de estrés favoreciendo la disminución de las pérdidas de este producto.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general

Determinar la participación de los genes que codifiquen para fosfolipasas D y lipoxigenasas en condiciones de estrés por daño mecánico en frutos de *Carica papaya* cultivar Maradol.

1.3.2 Objetivos específicos

- Detectar mediante un análisis *in silico* posibles secuencias homólogas a genes *PLDs* y de *LOXs* en el genoma de *C. papaya*.
- Determinar la expresión diferencial de genes que codifican para proteínas tipo *PLDs* y *LOXs* en frutos de *C. papaya* sometidos a un daño mecánico.
- Estandarizar una metodología para la determinación del grado de peroxidación lipídica y la concentración de peróxido de hidrógeno en tejidos de cáscara de frutos de papaya sometidos a daño mecánico.

1.4 HIPÓTESIS

Estudios bioquímicos en frutos y otros tipos de tejidos de plantas han evidenciado la participación de las *PLDs* y *LOXs* en el(los) mecanismo(s) de respuesta causado(s) por daño mecánico. Con base a los antecedentes, genes homólogos de *PLDs* y *LOXs* podrían participar en el estrés causado por daño mecánico en frutos de *C. papaya* cultivar Maradol.

1.5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

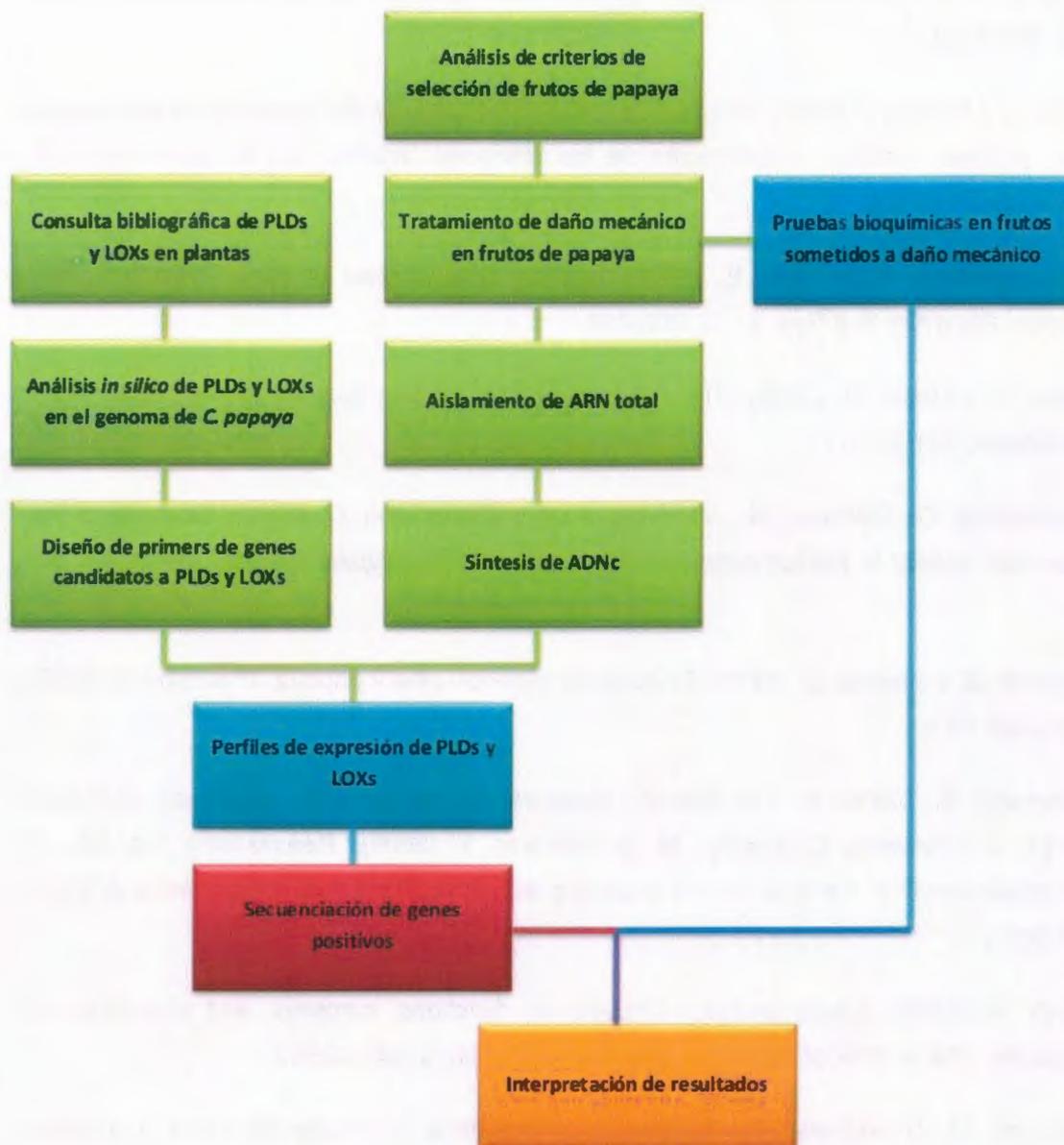


Figura 13. Estrategia experimental general para la caracterización de genes PLDs y LOXs en frutos de *C. papaya* sometidos a daño mecánico.

1.6 REFERENCIAS

- Aharon, G., Gelli, A., Snedden, W. y Blumwald, E. (1998). Activation of a plant plasma membrane Ca²⁺ channel by TGa1, a heterotrimeric G protein A-subunit homologue. *FEBS Lett*, 424, 17-21.
- Arias, C. y Toledo, J. (2007). Manual de manejo postcosecha de frutas tropicales (papaya, piña, plátano, cítricos). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).
- Arumuganathan, K. y Earle, E. (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep*, 9, (3), 208-218.
- Bailey, J. y Mittler, R. (2006). The roles of reactive oxygen species in plant cells. *Plant Physiology*, 141(2), 311.
- Bannenberg, G., Martínez, M., Hamberg, Mats y Castresana, C. (2009). Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Lipids*, 44, 85-95.
- Baraona, M. y Sancho, E. (1991). Fruticultura especial: piña y papaya, 1ª edición. EUNED, San José. 48 p.
- Bargmann, B., Laxalt, A., Ter Riet, B., Testerink, C., Merquiol, E., Mosblech, A., Leon-Reyes, A., Pieterse, C. Haring, M. y Heimann, I. (2009). Reassessing the role of phospholipase D in the *Arabidopsis* wounding response. *Plant Cell & Environment*, 32(7), 837-850.
- Brash, A. (1999). Lipoxygenases: Occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(34), 23679-23682.
- Bruinsma, M., Broekhoven, S., Poelman, E., Posthumus, M., Muller, M., Loon, J. y Dicke, M. (2010). Inhibition of lipoxygenase affects induction of both direct and indirect plant defenses against herbivorous insects. *Oecologia*, 162, 393-404.
- Bate, N. y Rothstein, S. (1998). C6-Volatiles derived from lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. *The Plant Journal*, 16, 561-569.
-

Bateman, A. y Sandford, R. (1999). The PLAT domain: a new piece in the PKD1 puzzle. *Current Biology*, 9(16), R588-R590.

Bell, E., Crellman, R. y Mullet, J. (1995). A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92(19), 8675-8679.

Bhardwaj, P., Ahuja, P. y Kumar, S. (2010). characterization of gene expression of qm from *Caragana jubata*, a plant species that grows under extreme cold. *Mol Biol Rep*, 37(2), 1003-10.

Brash, A. (1999). Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(34), 23679-23682.

Browse, J. (2009). Jasmonates passes muster: a receptor and targets for defense hormone. *Annu. Rev. Plant. Biol.*, 60, 183-205.

Caldelari, D., Wang, G., Farmer, E. y Dong, X. (2011). *Arabidopsis* lox3 lox4 double mutants are male sterile and defective in global proliferative arrest. *Plant Mol Biol*, 75(1-2), 25, 33.

Calderón, G. y Cepeda, R. (1999). El Cultivo de la papaya. PM, Colombia. 4 p.

Campos, P., Quartín, V., Ramalho, J. y Nunes, M. (2003). Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. *J. Plant Physiol*, 160, 283-292.

Carrera, M. y Mateo, J. (2005). Prontuario de agricultura. Cultivos agrícolas. Mundi-Prensa, Madrid. 851 p.

Casarrubias, U., Cárdenas, E., Nieto, D. y Gutiérrez, J. (2002). Histopatología de frutos de papaya (*Carica papaya* L.) infectados por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 20(1), 88-93 pp.

Chan, H., Sanxter, S. y Couey, H. (1985). Electrolyte leakage and ethylene production induced by chilling injury of papayas. *HortScience*, 20, 1070-1072.

Chandrika, U., Jansz, E., Wickramasinha, S.M.D. y Warnasuriya, N. (2003). Carotenoids in yellow- and red-fleshed papaya (*Carica papaya L.*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(12), 1279-1282.

Chauvin, A., Caldelari, D., Wolfender, J. y Farmer, E. (2012). Four 13-lipoxygenases contribute to rapid jasmonate synthesis in wounded *Arabidopsis thaliana* leaves: a role for lipoxygenase 6 in responses to long-distance wound signals. *New Phytologist*, 197, 566-575.

Chen, G., Hackett, R., Walker, D., Taylor, A., Lin, Z. y Grierson, D. (2004). Identification of a specific isoform of tomato lipoxygenase (tomlox) involved in the generation of fatty acid-derived flavor compounds. *Plant Physiology*, 136(1), 2641-2651.

Cho, K., Han, Y., Woo, J.C., Baudisch, B., Klösgen, R.B., Oh, S., Han, J. y Han O. (2011). Cellular localization of dual positional specific maize lipoxygenase-1 in transgenic rice and calcium-mediated membrane association. *Plant Science*, 18(3), 242-248.

Creelman, R., Tierney, M. y Mullet, J. (1992). Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89(11), 4938-4941.

Farmaki, T., Santamarín, M., Jiménez, P., Paneque, M., Sanz, C., Vancanneyt, G., León, J. y Sánchez, J. (2007). Differential distribution of the lipoxygenase pathway enzymes within potato chloroplasts. *Journal of Experimental Botany*, 58(3), 555-568.

Farooqui, A. (2011). *Lipid mediators and their metabolism in the brain*. Springer, Columbus. 12 p.

Feussner, I. y Wasternack, C. (2002). The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol*, 53, 275-297.

Fernández, J.A., Almela, L. y Fernández, J. (1994). *La nutrición férrica de las plantas: el problema de la clorosis*. Editum, Murcia. 29p.

Food & Agriculture Organization. (1993). *Prevención de pérdidas de alimentos poscosecha: frutas, hortalizas, raíces y tubérculos*. Roma. 17-18 pp.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2012. FAOSTAT.

Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>

[Acceso: 29 marzo 2012].

Florkowski, W., Prussia, S., Shewfelt, R. y Brueckner, B. (2009). Postharvest handling: a system approach. 2a edición. Academic Press, USA. 447 p.

Gao, X., Stumpe, M., Feussner, I. y Kolomiets, M. (2008). A novel plastidial lipoxygenase of maize (*Zea mays*) ZmLOX6 encodes for a fatty acid hydroperoxide lyase and is uniquely regulated by phytohormones and pathogen infection. *Planta*, 227, 491-503.

García, C., García, P. y Gil, M. (2007). Técnicas de servicio y atención al cliente, 2ª edición. Parainfo, Madrid. 42 p.

Gil, A. y Miranda, D. (2005). Morfología de la flor y de la semilla de papaya (*Carica papaya L.*): variedad maradol e híbrido tainun-1. *Agronomía Colombiana*, 23(2), 217-222

Gillmor, S., Villaseñor, A., Fletterick, R., Sigal, E. y Browner, M. (1997). The structure of mammalian 15 lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity. *Nature Struct. Biol.*, 4(12), 1003-1009..

Gobel, C., Feussner, I., Schmidt, A., Scheel, D., Sanchez, J., Hamberg, M. y Rosehl, S. (2001). Oxylipin profiling reveals the preferential stimulation of the 9-lipoxygenase pathway in elicitor-treated potato cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(9), 6267-6273.

Guo, B., Xu, G., Cao, Y., Holbrook, K. y Lynch, R. (2006). Identification and characterization of phospholipase d and its association with drought susceptibilities in peanut (*Arachis hypogaea*). *Planta*, 223(3), 12-20.

Gurr, M., Harwood, J. y Frayn, K. (2002). Lipid biochemistry. 5th edition. Blackwell Publishing Ltd, Oxford. 71-74 pp.

Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*, 141, 312-322.

Hamann, T., Bennett, M., Mansfield, J. y Somerville, C. (2009). Identification of cell-wall stress as a hexose-dependent and osmosensitive regulator of plant responses. *Plant J*, 57(6), 1015-1026.

Heitz, T., Bergey, D. y Ryan, C. (1997). A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Physiol*, 114(3), 1085-1093.

Hewett, E. (2003). Recent technological advances in post-harvest handling and processing of tropical fruits. proceedings of the international seminar on post-harvest handling & processing of tropical and subtropical fruits. & tfnet General Assembly Kuala Lumpur, Malaysia.

Hong, Y., Zhang, W. y Wang, X. (2010). Phospholipase D and phosphatidic acid signaling in plant response drought and salinity. *Plant Cell Env.*, 33, 627-635.

Huang, F. y Schawn, W. (2011). Cloning and characterization of a 9-lipoxygenase gene induced by pathogen attack from *Nicotiana benthamiana* for biotechnological application. *BMC Biotechnology*, 1(30), 1472-1650.

Hwang I.S. y Hwang B.K. (2009). The pepper 9-lipoxygenase gene calox1 functions in defense and cell death responses to microbial pathogens. *Plant Physiology*, Febrero 2010, 152, 948-967.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), 2011. Principales tipos de vegetación.

Disponible en:
<http://mapserver.inegi.gob.mx/geografia/espanol/datosgeogra/vegfauna/vegetaci.cfm?c=1>
91

[Acceso 15 mayo 2012].

Integrated Taxonomix Information System (ITIS), 2012. *Carica papaya L.*

Disponible en:
http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=22324

[Acceso 15 septiembre 2012].

Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). (2008). La fruticultura en Panamá: potencial socioeconómico e iniciativas para impulsar su desarrollo. Oficina del IICA en Panamá, Panamá. 117 p.

Ivanov, I., Heydeck, D., Hofheinz, K., Roffeis, J., O'Donnell, V., Kuhn, H. y Walther, M. (2010). Molecular enzymology of lipoxygenases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 503(2), 161-174.

Jang, S., Huon, T., Kim, K. Um, E. y Han, O. (2007). Regiochemical and stereochemical evidence for enzyme-initiated catalysis in dual positional specific maize lipoxygenase-1. *Org. Lett.*, 9(16), 3113-3116.

Jenkins, G. y Frohman, M. (2005). Phospholipase D: a lipid centric review. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, 62, 2305-2316.

Kessler, A., Halitschke, R. y Baldwin, I. (2004). Silencing the jasmonate cascade: induced plant defenses and insect populations. *Science*, 305, 665-668.

Kim, E., Choi, E., Kim, Y., Cho, K., Lee, A., Shim, J., Rakwal, R., Agrawal, G.K. y Han, O. (2003). Dual positional specificity and expression of non-traditional lipoxygenase induced by wounding and methyl jasmonate in maize seedlings. *Plant Mol. Biol.*, 52 (6), 1203-1213.

Kilaru, A., Herrfurth, C., Keereetaweeep, J., Hornung, E., Venables, B., Feussner, I. y Chapman, K. (2011). Lipoxygenase-mediated oxidation of polyunsaturated n-acyl ethanolamines in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 286(17), 15205-14.

Kolomiets, M., Hannapel, D., Chen, H., Tymeson y M., Gladon, R. (2001). Lipoxygenase is involved in the control of potato tuber development. *Plant Cell*, 13, 613-626.

Koshiishi, I., Tsuchida, K., Takajo, T. y Komatsu, M. (2006). Radical scavenger can scavenge lipid allyl radicals complexed with lipoxygenase at lower oxygen content. *Biochem J.*, 395, 303-309.

Kumar, P., Kaur, J., Chander, R., Singh, P. y Sanjay, K. (2011). Lipoxygenase in *Caragana jubata* responds to low temperature, abscisic acid, methyl jasmonate and salicylic acid. *Gene*, 483(1-2), 49-53.

Kushwada, L., Serwatowski, R. y Brook, R. (1995). Harvest and postharvest technologies for fresh fruits and vegetables. ASAE, Guanajuato. 168-175 pp.

Lee, S., Hirt, H. y Lee, Y. (2001). Phosphatidic acid activates a wound-activated MAPK in *Glycine max*. *The Plant Journal*, 26(5), 479-486.

León, J., Royo, J., Vancanneyt, G., Sanz, C., Silkowski, H., Griffiths, G. y Sánchez-Serrano, J. (2002). Lipoxygenase H1 gene silencing reveals a specific role in supplying fatty acid hydroperoxides for aliphatic aldehyde production. *Journal of Biological Chemistry*, 277(1), 416-423.

Li, M., Hong, Y., Wang, X. (2009). Phospholipase D and phosphatidic acid-mediated signaling in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1791, 927-935.

Li, M., Su, E., You, P., Gong, X. Sun, M., Xu, D. y Wei, D. (2010). Purification and in situ immobilization of papain with aqueous two-phase system. *PLoS ONE*, 5(12), e15168.

Li, W., Li, M., Zhang, W., Welti, R. y Wang, X. (2004). The plasma membrane-bound phospholipase D delta enhances freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Nature Biotechnology*, 22(4), 427-33.

Liscovitch, M., Czarny, M., Fiucci, G. y Tang, X. (2000). Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family. *Biochem. J.*, 345, 401-415.

Little, E., Wadsworth, F. y Marrero, J. (2001). Árboles comunes de Puerto Rico y las islas Vírgenes. Editorial de la Universidad de Puerto Rico, Puerto Rico. 457 p.

Litz, R. (2005). *Biotechnology of Fruit and Nut Corps*. CABI Publishing, 174 p.

Liu, S. y Han, B. (2010). Differential expression pattern of an acidic 9/13 lipoxygenase in flower opening and senescence and in leaf response to phloem feeders in the tea plant. *BMC Plant Biology*, 10(228), 1471-2229.

Lyons, E., Pedersen, B., Kane, J. y Feeling, M. (2008). The value of nonmodel genomes and an example using snymap with coge to dissect the hexaploidy that predates the rosids. *Top Plant Biol*, 1(3-4), 181-190.

Macías, A. (2010). Competitividad de México en el mercado de frutas y hortalizas de Estados Unidos de América, 1989-2009. *Agroalimentaria*, 16(31), 31-48.

Mahmud, T., Al Eryani-Raqeeb, A., Syed Omar, S., Mohamed Zaki, A. y Al Eryani, A. (2008). Effects of different concentrations and applications of calcium on storage life and physicochemical characteristics of papaya (*Carica Papaya L.*). *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 3(3), 526-533.

Mariutto, M., Duby, F., Adam, A., Bureau, C., Fauconnier, M., Ongena, M., Thonart, P. y Dommès, J. (2011). The elicitation of a systemic resistance by *Pseudomonas putida* BTP1 in tomato involves the stimulation of two lipoxygenase isoforms. *BMC Plant Biology*, 1471-2229, 11-29.

McDermott, M., Wakelam, M. y Morris, A. (2004) Phospholipase D. *Biochem Cell Biol*, 82(1), 225-53.

Melan, M., Dong, X., Endara, M., Davis, K., Ausubel, F. y Peterman T. (1993). An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. *Plant Physiol*, 101(2), 441-50.

Mita, G., Gallo, A., Greco, V., Zasiura, C., Casey, R., Zacheo, G. y Satino, A. (2001). Molecular cloning and biochemical characterization of a lipoxygenase in almond (*Prunus dulcis*) Seed. *Eur. J. Biochem.*, 268, 1500-1507.

Mizuno, K., Lida, T., Takano, A., Yokoyama, M. y Fujimura, T. (2003). A new 9-lipoxygenase cDNA from developing rice seeds. *Plant Cell Physiol*, 44(11), 1168-1175.

Moore, P. y Ming, R. (2008). Papaya genome: A model for tropical fruit trees and beyond. *Tropical Plant Biol*, 1, 179-180.

Mueller, M. y Mechler, E. (2005). Medicinal plants in tropical countries: traditional use, experience, facts. Thieme, Stuttgart. 51 p.

Müller, G. y Petry, S. (2006). Lipases and phospholipases in drug development. WILEY-VCH, Weinheim, 55p.

Munnik, T., Irvine, R. y Musgrave, A. (1998). Phospholipid signaling in plants. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1389(3), 222-22.

Nagarajan, N., Navajas-Perez, R., Pop, M., Alam, M., Ming, R., Paterson, A. y Salzberg, S. (2008). Genome-wide analysis of repetitive elements in papaya. *Trop Plant Biol*, 1, 191-201.

Nemchenko, A., Kunze, S., Feussner, I. y Kolomiets, M. (2006). Duplicate maize 13-lipoxygenase genes are differentially regulated by circadian rhythm, cold stress, wounding, pathogen infection, and hormonal treatments. *Journal of Experimental Botany*, 57(14), 3767-3779.

Oblozinsky, M., Bezakova, L., Mansfeld, J. y Ulbrich Hofmann, R. (2011). The transphosphatidylation potential of a membrane-bound phospholipase D from poppy seedlings. *Phytochemistry*, 72(2-3), 160-165.

Olayede, O. (2005). Chemical profile of unripe pulp of *Carica papaya*. *Pakistan Journal of Nutrition*, 4(6), 379-381.

Oliw, EH. (2002). Plant and fungal lipoxygenases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68-69:313-323 pp.

Orientations of Proteins in Membranes (OPM), 2013.

Disponible en: <http://opm.phar.umich.edu/protein.php?pdbid=2iuj>

[Acceso: 4 noviembre 2013].

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), 2003. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe.

Disponible en: <http://www.fao.org/spanish/newsroom/focus/2003/fruitveg1.htm>

[Acceso: 19 septiembre 2013].

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), 2012. Agronoticias. América Latina y el Caribe.

Disponible en: http://www.fao.org/agronoticias/agronoticias/detalle/en/?dyna_fef%5Buid%5D=159358

[Acceso: 16 marzo 2012].

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), 2012. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe.

Disponible en: <http://www.rlc.fao.org/es/conozca-fao/que-hace-fao/estadisticas/composicion-alimentos/busqueda/?clave=C437>

[Acceso: 21 septiembre 2012].

Orth, E., Brandao, T., Souza, B., Pliego, J., Vaz, B., Eberlin, M., Kirby, A. y Nome, F. (2010). Intramolecula catalysis of phosphodiester hydrolysis by two imidazoles .J. Am. Chem. Soc., 132, 8513-8523.

Paliyath, G.y Droillard, M. (1992). The mechanism of membrane deterioration and disassembly during senescence. Plant Physiol. Biochem., 30, 789-812.

Paliyath, G. y Thompson, E. (1986). Calcium- and calmodulin- regulated breakdown of phospholipid by microsomal membranes from bean cotyledons. Plant Physiol, 83- 63-68.

Pantoja, M., Delgadillo, G. y Rodríguez, C. (2003). Manual del manipulador de alimentos. OMS, La Paz. 10 p.

Palmieri-Thiers, C., Canaan, S., Brunini, V., Lorenzi, V., Tomi, F., Desseyn, JL., Garscha, U., Oliw, EH., Berti, L. y Maury, J. (2009). a lipoxygenase with dual positional specificity is expressed in olives (*Olea europaea L.*) during ripening. Biochim Biophys Acta. 1791(5), 339-346.

Pappan, K. y Wang, X. (1999). Plant phospholipase D is an acidic phospholipase active at near-physiological Ca²⁺ concentrations. Arch Biochem Biophys, 368, 347-353.

Parfitt, J., Barthel, M. y Macnaughton, S. (2010). Food waste within food supply chains: quantification and potential for change to 2050. *Phil. Trans. R. Soc.*, 365, 3065-3081.

Peña, E., Palacios, M. y Ospina, N. (2005). Algas como indicadores de contaminación. Universidad del Valle, 113 p.

Peña-Cortés, H., Fisahn, J. y Willmitzer, L. (1995). Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor ii gene expression in tomato and potato plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92(10), 4106-4113.

Photomaza. *Carica papaya*.

Disponible en: <http://www.photomazza.com/?Carica-papaia&lang=es>

[Acceso 18 junio 2012].

Ponting, C y Kerr, I. (1996). A novel family of phospholipase d homologues that includes phospholipid synthases and putative endonucleases: identification of duplicated repeats and potential active site residues. *Protein Science*, 5, 914-922.

Porta, H. y Rocha, M. (2002). Plant lipoxygenases. physiological and molecular features. *Plant Physiology*, 130(1), 15-21.

Programa Mundial de Alimentos (WFP), 2012. Hambre.

Disponible en: <http://es.wfp.org/hambre/el-hambre>

[Acceso 2 febrero 2012].

Propapaya, 2012.

Disponible en: <http://www.propapaya.org/>

[Acceso 2 febrero 2012].

Prost, I., Dhondt, S., Rothe, G., Vicente, J., Rodriguez, M., Kift, N., Carbonne, F., Griffiths, G., Esquerré-Tugayé, M., Rosahl, S., Castresana, C., Hamberg, M. y Fournier, J. (2005).

Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. *Plant Physiology* 139, 1902-1913.

Qin, C., Wang, C. y Wang, X. (2002). Kinetic analysis of *Arabidopsis* phospholipase D Delta. Substrate preference and mechanism of activation by Ca²⁺ and phosphatidylinositol 4,5-biphosphate. *Journal of Biological Chemistry* 277(51), 49685-49690.

Quinn, P. y Wang, X. (2008). *Lipids in health and disease*. Springer, London. 152-153 pp.

Qin, W., Pappan, K. y Wang, X. (1997). Molecular heterogeneity of phospholipase D (PLD): cloning of PLD γ and regulation of plant PLD α , β , and γ by polyphosphoinositides and calcium. *J. Biol. Chem.*, 272, 28267-73.

Rajashekar, C., Zhou, H., Zhang, Y., Li, W. y Wang, X. (2006). Suppression of phospholipase D α 1 induces freezing tolerance in *Arabidopsis*: response of cold-responsive genes and osmolyte accumulation. *Journal of Plant Physiology*, 163(9), 916-926.

Ramachandran, S., Carrol, R., Dunham, W. y Funk, M. (1992). Limited proteolysis and activesite labeling studies of soybean lipoxygenase. *Biochemistry*, 31(33), 7700-7706.

Rapp, J., Xu, S., Sharp, A., Griffith, W., Kim, Y. y Funk, M. (2009). EPR spectroscopy and electrospray ionization mass spectrometry reveal distinctive features of the iron site in leukocyte 12-lipoxygenase. *Arch Biochem Biophys*, 490(1), 50-56.

Richmond, G. y Smith, T. (2011). Phospholipases A1. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 588-612.

Rieger, M. (2006). *Introduction to fruit crops*. Routledge, 305 p.

Ríos, C. (2004). *Guía para la instalación y manejo de los policultivos de la huerta familiar*. Convenio Andrés Bello, 16 p.

Rodríguez, M., Canales, E. y Borrás, O. (2005). Molecular aspects of abiotic stress in plants. *Biotechnología Aplicada*, 22, 1-10.

Rosahl, S. y Feussner, I. (2005). *Oxylipins*. *Plant Lipids*, Oxford: Blackwell Publishing. 329-354 pp.

Roselan, Md. y Hidayah, N. (2010). Comparison of nutritional content of *Carica papaya* SP ripened by ripening agents. Grado de Licenciatura en Ciencias. University Teknologi MARA (UiTM). Malasia. 3 p.

Royo, J., Vancanneyt, G., Pérez, A., Sanz, C., Störmann, K., Rosahl, S. y Sánchez-Serrano, J. (1996). Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. *J. Biol. Chem.*, 271(35), 21012-21019.

Salas, J., Sánchez, C., García, D. y Aparicio, R. (2005). Impact of the suppression of lipoxygenase and hydroperoxide lyase on the quality of the green odor in green leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1648-55.

Sánchez, M. (2003). *Procesos de elaboración de alimentos y bebidas*, 1ª edición. Mundi-Prensa, Madrid. 43 p.

Santamaría, F., Sauri, E., Espadas, F., Díaz, R., Larqué, A. y Santamaría, J. (2009). Postharvest ripening and maturity indicator for maradol papaya. *Interciencia*, 34(8), 583-588.

Sanz, L., Pérez, A. y Olías, J. (1992). La lipoxigenasa en el reino vegetal: propiedades. *Grasas y aceites*, 43(4), 231-239.

Schawb, W., Davidovich-Rikanati, R. y Lewinsohn, E. (2008). Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The Plant Journal*, 54, 712-732.

Schillmiller A. y Howe, G. (2005). Systemic signaling in the wound response. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(4), 369-377.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), 2012. *Boletín Frutas*.

Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Paginas/Boletin1-Frutas.aspx>

[Acceso 18 noviembre 2012].

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Plan Rector Sistema Nacional Papaya. Segunda Fase: Diagnóstico Inicial Base de Referencia Estructura Estratégica, 2005.

Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), 2012. Cierre de la producción agrícola por estado.

Disponible en: <http://www.siap.gob.mx>

[Acceso 20 abril 2012].

Seltman, M., Stingl, N., Lautenschlaeger, J., Kriscke, M., Mueller, M. y Berger, S. (2010). Differential impact of lipoxygenase 2 and jasmonates on natural and stress-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2010, 152, 1940-1950.

Shakirov, E., Salzberg, S., Alam, M. y Shippen, D. (2008). The analysis of *Carica papaya* telomeres and telomere-associated proteins: insights into the evolution of telomere maintenance in *Brassicales*. *Trop Plant Biol*, 1(3-4), 202-215.

Sheng, J., Luo, Y. y Wainwright, H. (2000). Studies on lipoxygenase and the formation of ethylene in tomato. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75, 69-71.

Shin, J., Van, K., Kim, D., Kim, K., Jang, Y., Choi, B., Kim, M. y Lee, S. (2008). The lipoxygenase gene family: a genomic fossil of shared polyploidy between *Glycine max* and *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biology*, 2008, 8-133.

Shulaev, V., Cortes, D., Miler, G. y Mittler, R. (2008). Metabolites for plants stress response. *Physiol Plant*, 132(2), 199-208.

Stanley, D. (2000). Eicosanoids in invertebrate signal transduction systems. Princeton University Press, New Jersey, 21 p.

Staswick, P. y Tiryaki, I. (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16(8), 2117-2127.

Stuckey, J. y Dixon J. (1999). Crystal structure of a phospholipase D family member. *Nat. Struct. Biol.*, 6, 278-84.

Sudheer, K. y Indira, V. (2007). Post harvest technology of horticultural crops. New India Publishing, New Delhi. 3 p.

Sung, T., Roper, R., Zhang, Y., Rudge, S., Temel, R., Hammond, S., Morris, A., Moss, B., Engebrecht, J. y Frohman, M. (1997). Mutagenesis of phospholipase D defines a superfamily including a trans-golgi viral protein required for poxvirus pathogenicity. *EMBO J.*, 16(15), 4519-4530.

Tatulian, S., Steczko, J. y Minor, W. (1998). Uncovering a calcium-regulated membrane-binding mechanism for soybean lipoxygenase-1. *Biochemistry*, 37(44), 15481-15490.

Tavernier, E. y Pugin, A. (1995). Phospholipase activities associated with the tonoplast from *Acer Pseudoplatanus* cells: identification of a phospholipase A1 activity. *Biochim. Biophys. Acta*, 1233, 118-22.

The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR), 2012. TAIR Gene Search Results. Disponible en: http://www.arabidopsis.org/servlets/Search?type=general&search_action=detail&method=1&show_obsolete=F&name=lipoxygenase&sub_type=gene&SEARCH_EXACT=4&SEARCH_CONTAINS=1

[Acceso 20 agosto 2012]

Tiwari, K. y Paliyath, G. (2011). Cloning, expression and functional characterization of the C2 domain from tomato phospholipase D α . *Plant Physiol. Biochem.*, 49(1), 18-32.

Turner, J., Ellis, C. y Devoto, A. (2002). The jasmonate signal pathway. *The Plant Cell*, 14, S153, S-164.

Uesugi, Y. y Hatanaka, T. (2009). Phospholipase D mechanism using strptomyces PLD. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1791, 962-969.

Umate, P. (2011). Genome-wide analysis of lipoxygenase gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Signaling & Behavior*, 6(3), 335-338.

Uraji, M., Katagiri, T., Okuma, E., Ye, W., Anowar, M.m Masuda, C., Miura, A., Nakamura, Y., Mori, I., Shinozaki, K. y Murata, Y. (2012). Cooperative function of PLDd and PLDa1 in abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 159, 450-460.

Urao, T., Katagiri, T., Mizoguchi, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Hayashida, N., y Shinozaki, K. (1994). Two genes that encode Ca²⁺ dependent protein kinases are induced by drought and high salt stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.*, 224, 331-340.

Van Poecke, R. y Dicke, M. (2002). Induced parasitoid attraction by *Arabidopsis thaliana*: involvement of the octadecanoid and the salicylic acid pathway. *Journal of Experimental Botany*, 53(375), 1793-1799.

Vellosillo, T., Martínez, M., López, M., Vicente, J., Cascón, T., Dolan, L., Hamberg, M. y Casresana, C. (2007). Oxylipins Produced by the 9-lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *Plant Cell*, 19(3), 831-46.

Veronico, P., Giannino, D., Melilo, M., Leone, A., Reyes, A., Kennedy, M. y Bleve-Zacheo, T. (2006). A novel lipoxygenase in pea roots. Its function in wounding and biotic stress. *Plant Physiology*, 141(3), 1045-1055.

Wang, C. (1982). Physiological and biochemical responses of plants to chilling stress. *HortScience*, 17, 173-186.

Wang, J., Chen, C., Na, J., Yu, Q., Hou, S., Paull, R., Moore, P., Alam, M. y Ming, R. (2008). Genome-wide comparative analyses of microsatellites in papaya. *Trop Plant Biol*, 1(3-4), 278-292.

Wang, R., Shen, W., Liu, L., Jiang, L., Liu, Y., Su, N. y Wan, J. (2008). A novel lipoxygenase gene from developing rice seeds confers dual position specificity and responds to wounding and insect attack. *Plant Mol. Biol.*, 66(4) 401-414.

Wang, X. (2000). Multiple forms of PLD in plant: the gene family catalytic and regulatory properties, and cellular functions. *Progress in Lipid Research*, 39(2), 109-149.

Wasternack, C. (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany*, 100(4), 681-697.

Wecksler, A., Kenyon, V., Deschamps, J. y Holman, T. (2008). Substrate specificity changes for human reticulocyte and epithelial 15-lipoxygenases reveal allosteric product regulation. *Biochemistry*, 47(28), 7364-7375.

Welti, R., Li, W., Li, M., Sang, Y., Biesada, H., Zhou, H., Rajashekar, C., Williams, T. y Wang, X. (2002). Profiling membrane lipids in plant stress responses. role of phospholipase D α in freezing induced lipid changes in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(35), 31994-3202.

Whitaker, B. y Lester, G. (2006). Cloning of phospholipase D α and lipoxygenase genes CmPLD α 1 and CmLOX1 and their expression in fruit, floral, and vegetative tissues of "Honey brew" hybrid honeydew melon. *J. AMos. SOC. HOLr. Si.*, 131(4), 544-550.

Xie, Z., Ho, W. y Exton, J. (2000). Association of the N- and C-terminal domains of phospholipase D: contribution of the conserved HKD motifs to the interaction and the requirement of the association for Ser/Thr phosphorylation of the enzyme. *J. Biol. Chem.*, 275, 24962-69.

Xue-Yong, Y., Wei-Jie, J. y Hong-Jun, Y. (2012). The expression profiling of the lipoxygenase (LOX) family genes during fruit development, abiotic stress and hormonal treatments in cucumber (*Cucumis sativus L.*). *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 2481-2500.

Yang, S., Kim, S. y Kim, W. (2004). Perturbation of NgTRF1 expression induces apoptosis-like cell death in tobacco BY-2 cells and implicates NgTRF1 in the control of telomere length and stability. *Plant Cell*, 16 (12), 3370-3385.

Youn, B., Sellhorn, G. Mirchel, R., Gaffney, B., Grimes, H. y Kang, C. (2006). Crystal structures of vegetative soybean lipoxygenase VLX-B and VLX-D, and comparisons with seed isoforms LOX-1 and LOX-3. *Proteins*, 65(4), 1008-1020.

Zhang, B., Chen, K., Bowen, J., Allan, A., Espley, R., Karunairetnam S. y Ferguson, I. (2006). Differential expression within the LOX gene family in ripening kiwifruit. *Journal of Experimental Botany*, 57(14), 3825-3836.

Zhang, B., Xi, W., Wei, W., Shen, J., Ferguson, I. y Chen, K. (2011). Changes in aroma-related volatiles and gene expression during low temperature storage and subsequent shelf-life of peach fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 60 (2011), 7-16.

Zhang, Y., Zhu, H., Zhang, Q., Li, M., Yan, M., Wang, R., Wang, L., Welti, R., Zhang, W. y Wang, X. (2009) Phospholipase Da1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in aba-mediated stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21(8), 2357–2377.

Zhao, Y., Qian, C., Chen, J., Peng, Y. y Mao, L. (2010). Responses of phospholipase D and lipoxygenase to mechanical wounding in postharvest cucumber fruits. *J Zhejiang Univ Sci B*, 11(6), 443-450.

Zheng, Y. y Brash, A. (2010). On the role of molecular oxygen in lipoxygenase activation: comparison and contrast of epidermal lipoxygenase-3 with soybean lipoxygenase. *J Biol Chem*, 285(51), 39876-39887.

Zou, C., Lehti-Shiu, M., Thomashow, M. y Shiu, S. (2009). Evolution of stress-regulated gene expression in duplicate genes of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet*, 5(7), e10000581.

CAPÍTULO II. ANÁLISIS *IN SILICO* DE GENES QUE CODIFICAN PARA FOSFOLIPASAS D (PLDs) Y LIPOXIGENASAS (LOXs) EN *C. papaya*

2.1 INTRODUCCIÓN

La investigación biotecnológica moderna se apoya por un lado en procesos experimentales y por otro en la búsqueda de información asistida por computadoras e internet en bancos de datos estructurales y funcionales de genes, proteínas y otras biomoléculas. Este último proceso es conocido como análisis *in silico* (Muller, 2009).

Estas nuevas metodologías son posibles gracias al avance en el campo de la bioinformática que permite ordenar la gigantesca cantidad de datos que se han generado por la constante secuenciación de nuevos genomas de organismos de interés (NCBI, Phytozome, EMBL-EBI). Las herramientas bioinformáticas disponibles de forma gratuita nos permiten buscar y comparar de una manera rápida y eficiente estas secuencias entre distintas especies (BLAST y FASTA), predecir *in silico* las secuencias nucleotídicas y proteicas de nuevos genes y proteínas (Softberry), predecir la posible estructura y posible función de los genes y proteínas elucidadas (Multiple Sequence Alignment, Phyre 2, Pfam, Prosite) así como el diseño de oligonucleótidos específicos para los genes putativos (IDT) (Oliva y Vidal, 2006).

Una vez obtenidas las secuencias putativas de interés estas pueden analizarse para construir arboles filogenéticos (diagramas que indican las relaciones ancestrales entre los organismos que producen las proteínas o los genes que las codifican) (Voet *et al.*, 2007) cuya construcción puede realizarse por distintos métodos. Entre estos métodos se encuentran el de distancias, en el cual las relaciones evolutivas se infieren sobre la base del grado de similitud global de los organismos, y el de parsimonia, que infiere las relaciones filogenéticas sobre la base del número mínimo de cambios evolutivos que deben haberse producido desde que los organismos compartieron por última vez un ancestro común (Pierce, 2010). A partir de la construcción de estos árboles se pueden elucidar las posibles funciones de las proteínas putativas en estudio.

La utilización de estas herramientas bioinformáticas permite el constante diseño de secuencias de nuevos genes y proteínas que sean los mejores candidatos para la función deseada.

En este capítulo se describen las diferentes herramientas bioinformáticas empleadas para el análisis *in silico* de genes putativos de *PLDs* y *LOXs* en el genoma de *C. papaya* a partir de genes *PLDs* y *LOXs* conocidos en el genoma de *A. thaliana*. Las secuencias nucleotídicas de los genes candidatos de *CpPLDs* y *CpLOXs* fueron empleadas para el diseño de oligonucleótidos específicos (primers) así como para la obtención de predicciones de proteínas *CpPLDs* y *CpLOXs* a las cuales se les realizaron diferentes análisis filogenéticos.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó una consulta bibliográfica para seleccionar genes PLDs y LOXs presentes en el genoma de *A. thaliana* de los cuales existen antecedentes de su participación en los mecanismos de respuesta a diferentes tipos de estrés abióticos. Una vez seleccionados, se obtuvieron las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de los genes candidatos, por medio de la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), y se procedió a realizar predicciones de genes ortólogos en el genoma de *C. papaya* por medio de la herramienta FASTA de la base de datos EMBL-EBI (The European Bioinformatic Institute; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/>) y de la herramienta FGNEISH+ del servidor SOFTBERRY (<http://www.phytozome.net/>).

Posteriormente se realizaron diferentes análisis bioinformáticos para una mejor caracterización de los genes y proteínas putativas de PLDs y LOXs en *C. papaya*. A continuación se enlistan los análisis realizados:

Cuadro 5. Análisis bioinformáticos empleados para la predicción de genes y proteínas putativas de PLDs y LOXs en *C. papaya*.

Análisis	Herramienta	Servidor	Fuente
Alineamientos de secuencias de aminoácidos	ClustalW2 BOXSHADE 3.21	EMBL-EBI Expasy	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/ http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html
Análisis de dominios y motivos	Pfam 27.0 Prosit y Translate tool Multiple Sequence Alignment	Sanger Expasy WEBLOGO	http://pfam.sanger.ac.uk/ http://prosite.expasy.org/ http://web.expasy.org/translate/ http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi
Análisis tridimensionales de proteínas	PHYRE Automatic fold Recognition	Phyre2	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index

	Server		
Análisis filogenéticos	Construct Maximum Likelihood Tree Construct Neighbor-Joining Tree	MEGA 5.1	Tamura <i>et al.</i> , 2011

Una vez que se obtuvieron las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos putativas de los mejores candidatos se procedió a realizar el diseño de oligonucleótidos de ADN (primers) específicos de los genes candidatos empleando el programa OligoAnalyzer3.1 de IDT (Integrated Device Technology; <http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>).

2.3 RESULTADOS

Se obtuvieron las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de 2 PLDs (AtPLD α 1 y AtPLD δ) y 6 LOXs (AtLOX1-6). Los genes anteriores fueron seleccionados debido a que existen antecedentes de la participación de estos en los sistemas de señalización por daño mecánico en hojas de *A. thaliana* (Wang *et al.*, 2000; Zien *et al.*, 2001; Bell *et al.*, 1995; Chauvin *et al.*, 2012). En el cuadro siguiente se indican los números de acceso de la base de datos NCBI de los genes seleccionados:

Cuadro 6. Números de accesos de genes AtPLDs y AtLOXs del NCBI.

Gen	Número de acceso de la secuencia nucleotídica	Número de acceso de la secuencia de aminoácidos
AtPLD α 1	NM_112443.2	NP_188194.1
AtPLD δ	NM_119745.3	NP_567989.1
AtLOX1	NM_104376.2	NP_175900.1
AtLOX2	NM_114383.2	NP_566875.1
AtLOX3	NM_101603.2	NP_564021.1
AtLOX4	NM_105911.4	NP_177396.1
AtLOX5	NM_113137.3	NP_188879.2
AtLOX6	NM_105423.2	NP_176923.1

Las secuencias nucleotídicas seleccionadas fueron comparadas con el genoma de *C. papaya* empleado la herramienta FASTA de EMBL-EBI. A partir de cada análisis se obtuvo una lista de los contigs del genoma de *C. papaya* que presentaban homología con las secuencias nucleotídicas de los genes seleccionados de *A. thaliana*. Se obtuvieron las secuencias de los contigs de *C. papaya* que presentaron los mejores parámetros estadísticos (mayores valores de score, identidad y valores negativos de E menores a -20). En el caso de las CpPLDs putativas se seleccionaron los primeros contigs de sus respectivas listas de contigs homólogos en *C. papaya* mientras que para las LOXs putativas se seleccionaron los seis primeros contigs de sus respectivas listas.

Se realizaron predicciones de genes y proteínas putativas de PLDs y LOXs en el genoma de *C. papaya* por medio de la herramienta FGNEISH+ del servidor SOFTBERRY. El análisis se realizó empleando los contigs de *C. papaya* seleccionados así como las secuencias de aminoácidos de los genes en *A. thaliana*. Se obtuvieron un total de 38 predicciones: una CpPLD α 1, una CpPLD δ y 36 CpLOXs (seis predicciones por cada AtLOX). Es necesario mencionar que varias predicciones proteicas de las LOXs eran casi idénticas (con una diferencia de 30 a 40 aminoácidos) ya que varios de los contigs de *C. papaya* seleccionados presentaron diferentes valores de identidad con más de un AtLOXs. Por lo tanto, se descartaron las predicciones repetidas con parámetros estadísticos menores y se obtuvieron un total de 8 predicciones nucleotídicas y proteicas de CpLOXs putativos: tres genes ortólogos a AtLOX1 (CpLOX1.1, CpLOX1.2 y CpLOX1.3), un gen ortólogo a AtLOX2 (CpLOX2), un gen ortólogo a AtLOX3 (CpLOX3), dos genes ortólogos a AtLOX5 (CpLOX5.1 y CpLOX5.3) y un gen ortólogo a AtLOX6 (CpLOX6).

Posteriormente se realizaron alineamientos de las secuencias de aminoácidos de los genes *AtPLDs* y los *CpPLDs* putativos y de los *AtLOXs* y los *CpLOXs* putativos empleando las herramientas ClustalW2 y BOXSHADE 3.21 (ver Figuras 14, 15 y 16). Puede observarse que tanto las *AtPLDs* como los segmentos de contigs seleccionados (predicciones) presentan los dominios C2, HKD (por duplicado) y el dominio PLD C terminal. Se observó la conservación de grupos de lisina y arginina en todas las *AtLOXs* y los contigs de *C. papaya* en el intervalo comprendido entre los primeros 100 aminoácidos.

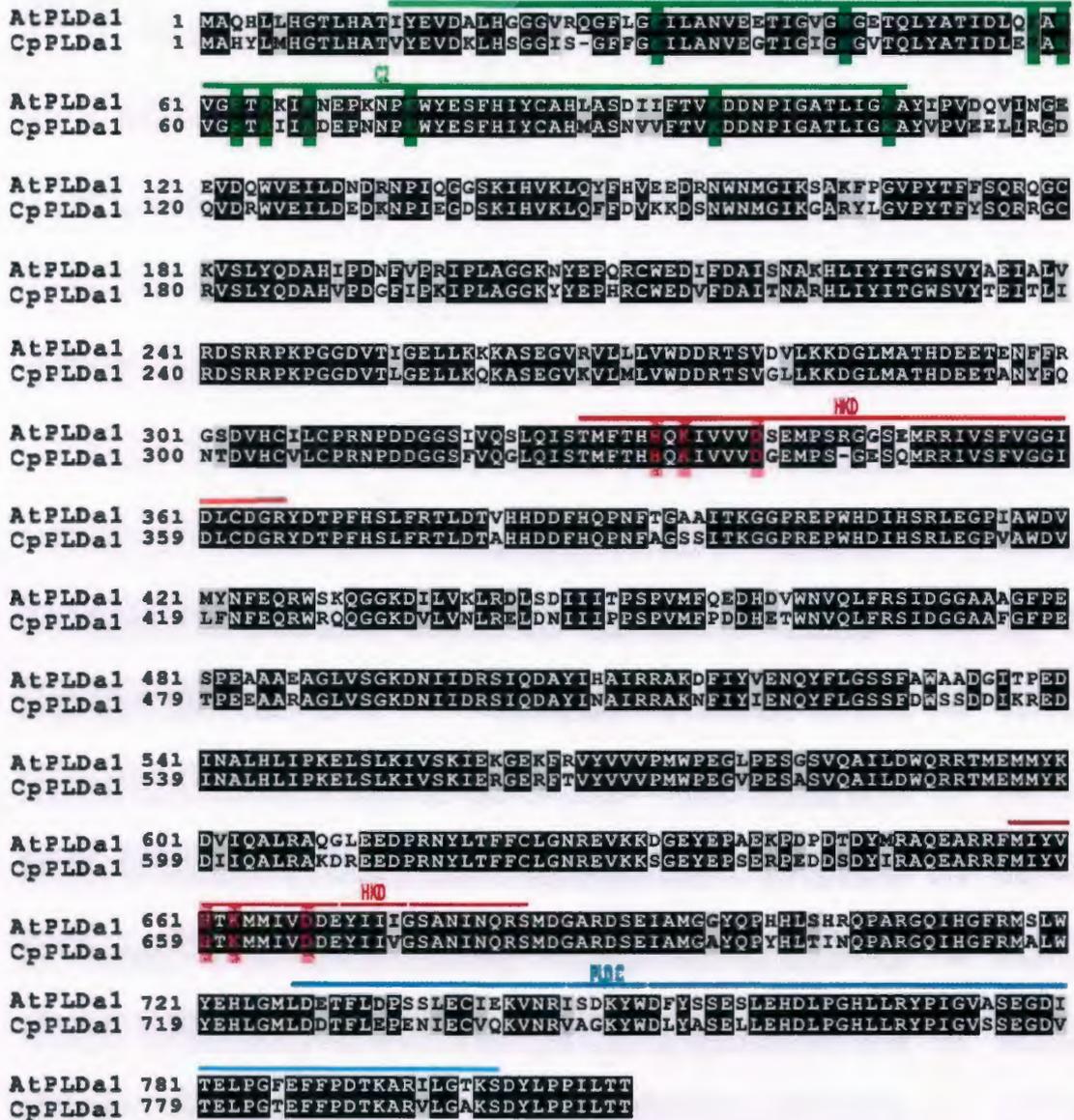


Figura 14. Alineamiento de la AtPLDa1 y la CpPLDa1 putativa de *C. papaya*. C2: dominio C2 (línea verde), HKD: dominios HKD (línea roja) y PLD C: dominio PLD terminal (línea azul). Los aminoácidos resaltados son los característicos de sus respectivos dominios.

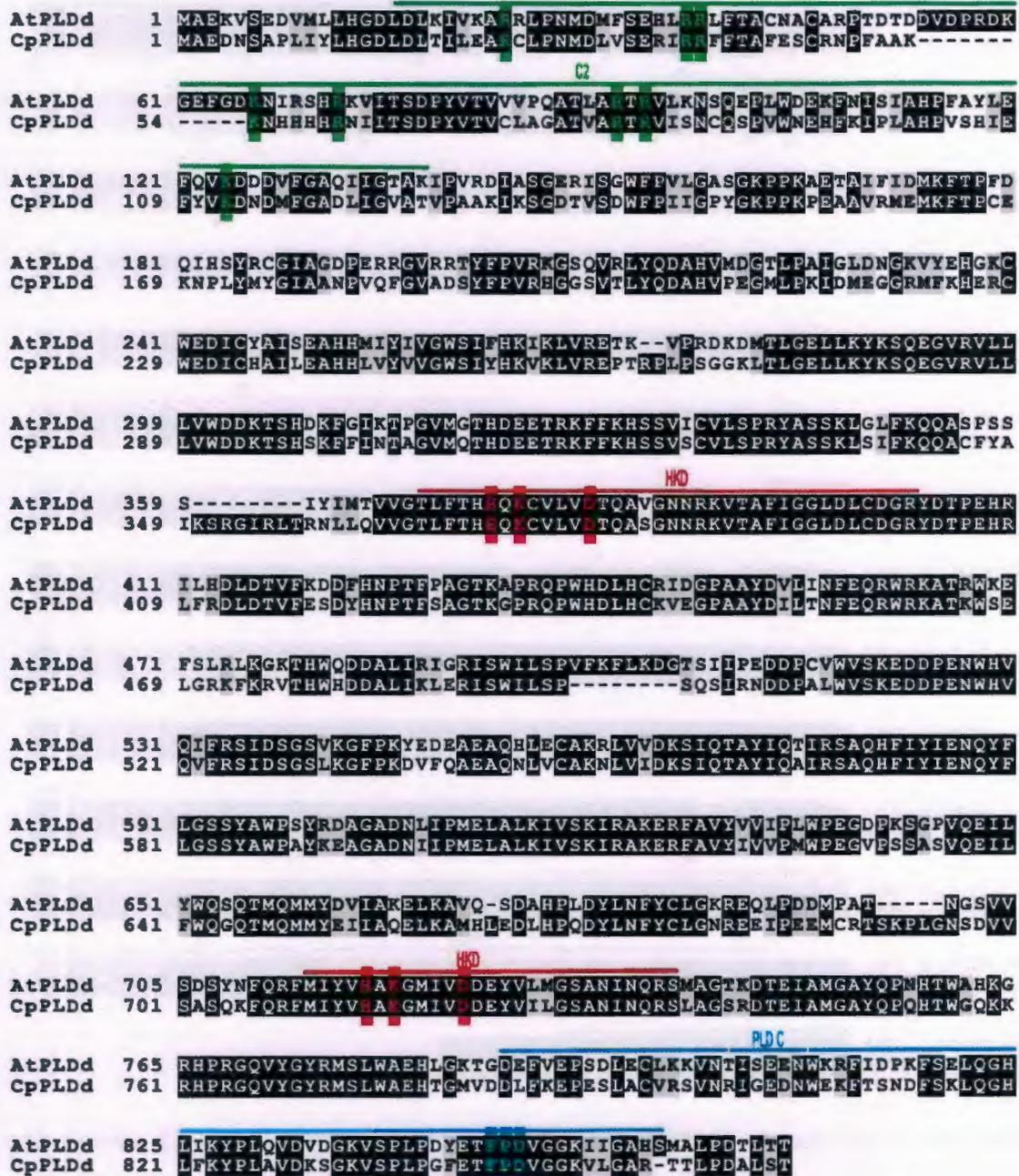


Figura 15. Alineamiento de la AtPLDδ y la CpPLDδ putativa de *C. papaya*. C2: dominio C2 (línea verde), HKD: dominios HKD (línea roja) y PLD C: dominio PLD terminal (línea azul). Los aminoácidos resaltados son los característicos de sus respectivos dominios.

Puede observarse que tanto los AtLOXs como las predicciones en *C. papaya* presentan los dominios PLAT y LOX. Se observó la conservación de grupos de histidinas en todas las AtLOXs y los contigs de *C. papaya* en el intervalo comprendido entre los aminoácidos 400 y 600. Estas histidinas son parte del sitio activo de las lipoxigenasas (Steczko *et al.*, 1992).

CpLOX1_1 1 -----
 CpLOX1_3 1 -----
 CpLOX1_2 1 -----
 AtLOX1 1 -----
 CpLOX5_2 1 -----
 CpLOX5_1 1 -----
 AtLOX5 1 -----
 AtLOX2 1 -----MYCRES-----LSSLQTLNVAKSLSSLFPKQSA
 CpLOX2 1 MAYRVAPRQRTLPRSAALRSCRITTKFKVSSSENKKMNTRIE TLHTTNLFPLYSSSPSSSTS
 AtLOX3 1 -----MALAKELMGYPLITERSSLVSSASH----FKKRTQS---TQF
 AtLOX4 1 -----MALANEIMGSRILIFERSSSLASPFHSRFSIKKKTQR---TQF
 CpLOX3 1 -----MALAKEMGYSMIE-RSPWLASSKKLRLKYRDNSLPQRKTQL
 AtLOX6 1 -----MFVASPV---KTNFNGVSLVKSPA-----FSALSCRKQH
 CpLOX6 1 -----MYAIKPIPLFKTEFFGATVRNVFANYGGGENEFMQGSYRVGS

CpLOX1_1 1 -----MLRHLKAFAGE---DGAIVIGK-----SRFGVGEQK
 CpLOX1_3 1 -----MMKHVIDLWASKYCRSKKMLKQC-----GRRCDETR
 CpLOX1_2 1 -----MSTQTTAIVGK-----
 AtLOX1 1 -----MFGELRDLTGG-----GNETTTK
 CpLOX5_2 1 -----MDETI
 CpLOX5_1 1 -----MDETI
 AtLOX5 1 -----MIHTDIAIILCVKPKTKTKTME-----EDVKTKTTM
 AtLOX2 29 LIN-PI SAGRRNNLPRPNLRRRCKVTASRANIEQEGN-----TVKEPIQNI
 CpLOX2 61 NVSKPSALS HDRNFLRPIYTHHYS LCKSKKLLQHARS LCVRGSTNPFQELSIRYKQDHI
 AtLOX3 36 SINPFDRRPRKTK--SGVVAATSEDLVKTLRFSTTTGDRK-----SEEEKAAVKF
 AtLOX4 40 SINPFDRPMRAVNSSGVVAATSEDLVKTLRISTVGRKQE-----KEEEKSVKF
 CpLOX3 42 RINPGSVFLEHRRNTNPVVVAALSEDLIKSIGSSNSSSGR-----ENENKAVKF
 AtLOX6 32 RVP--ISRQVRAVISREKAVDQEDGKKSTNKPLINSSQF-----PWQRSKYTGSK
 CpLOX6 43 RVK--GAGSIRAVISREDPIVES---KQSLEAKEVSGSVA-----SCS-SNVKRG I

CpLOX1_1 30 KITGTVALMKQVSLDVT---ALVSEGLHEL FHKRVHQLVSTQNSD--SANELQSKL GK
 CpLOX1_3 33 KIKGTVVL MKNKLDVTDL-AALVSDVDDEL FHKHVS LQLVSAENSD--PANGFOCKL GK
 CpLOX1_2 13 KIQGTVVL MKNVAEVDL-GALVSDDIHEL FRNRVSLQLVSAQNSD SAAANE LKGL GK
 AtLOX1 20 KVKGTVVL MKNVLD FDFD-NASFLDRLHEFLGNKITERLVSSDVTD--SENGSKGL GK
 CpLOX5_2 6 IIKGTVVL MKNLDFHDV-KASFLDRVHELLGKRVS LQLISSDHPD--PENENRGMK SK
 CpLOX5_1 6 IIVKGTVVL MKNLDFHDV-KASFLDRVRELLGKRVS LQLISSDHPD--PENENRGMK SK
 AtLOX5 34 KIEGEVVVMKKNLLDFKDV-MASFLDRVNE LLGRRVSLHLISSHQPD--PANERGR L GK
 AtLOX2 74 KVKGYITAE---EFLEGITVSRGLDDIADIRGRSLLVELIS-----AKTD---Q
 CpLOX2 121 KVKSVTVKVTIGGFFANLDVTRPLDDIADLLGKTL LVLVS-----SHLDPETGLE
 AtLOX3 85 KVRAVTVRNKNKEDLKET-LVKHLDADFADKIGRNIVLELIS-TQLD---PKTKLPKSN
 AtLOX4 91 KVRAVATVRNKNKEDFKET-LVKHLDADFADKIGRNIVLELIS-TQVD---PKTNEPKKSK
 CpLOX3 90 KVRAVMTVRNKSQDLKDT-IVKHLDAFSEKIGRNIVLELISSTEID---PRTKEPKSN
 AtLOX6 81 TVTAVVKIRKKIKELTER-FEHLDFMKAIGQGMLIQLVSE-EIID---PETGKERKSL
 CpLOX6 88 DVRAVTVIRRKMKKEKVTEK-IEHQWELFMNGIGQGILIRLIS-EEVD---PVTKSG-KSV

PLAT

CpLOX1_1 84 KVSLENRISKTTLSTGDETM LYSVTFDWDADIGTPGVFLIYNGYENKFFLES LILEDVPE-
 CpLOX1_3 90 KAFLENWITKFTPLTNRET-AYEVTFDWDDEEAGTPGAF LVENGNNEFFLKL TLEDVPE-
 CpLOX1_2 72 KAFLENWIGTTLLVANES-AYKVTFDWDEDIGIPGAF LCNANNEFVY LKSLTLEDVPE-
 AtLOX1 77 AAHLEDWITTTISLTAGES-AFKVTEDYETDFGYPGAF LRNSHFSEFL LKSLTLEDVPE-
 CpLOX5_2 63 EAYLEKAGRTITSLVKVGETALS VREFWGKKMGVPGAF IIRNYHHSQFYIKTL TLEDVPE-
 CpLOX5_1 63 EAYLEKATTTITSLVKVEETALS VREFWRKEMGVPGAF IIRNYHHSQFYIKTL TLEDVPE-
 AtLOX5 91 AAHLEKVTIKTSVTAETAFTGVTEDWDESMGPPAFVIRNHHHSQFY LKSLTLRGFPD
 AtLOX2 118 RITVEDYARVWAEAPDEK--YECFEFMPEDFGPVGAIKLQNYHRQLFLKGVELK-LP-
 CpLOX2 173 KEVKAF AHRSSQEGDEVK--YECDFSI PADFGSIGAVVVENEHNE MFLKDIVLDGLE
 AtLOX3 140 AAVLKDWSKRSKTKAERVH--YTAETVDAAFGSPGAI TVMKNKQKEFFLESITIEGFA-
 AtLOX4 146 AAVLKDWSKRSNSKAERVH--YTAETVDSAFGSPGAI TVTNKQKEFFLESITIEGFA-
 CpLOX3 146 QAVIKDWYKSNVKAERVH--YATELLVDSNFGGAGAITVINKHNEFFLESITIEGFA-
 AtLOX6 136 ESPVMG-LPKAVKDPRLV--FTADETVPI NFGKPGAILVTNLLSTEICLSEI IEDS--
 CpLOX6 142 ESSVRGTLKPKPSEHEHIIE--YAADESVPDFGQPGAVLITNLEGKEFYLL EIVIHGFQ-

PLAT

CpLOX1_1 143 ---DQGR~~LFHFCNSWIYPSNNEEKYRVFF~~IN~~KT~~YLP~~SOTPLFLCKYREEELMKLRGDGKR~~
 CpLOX1_3 148 ---GQGR~~LHFVCNSWVYPSNDOEKYRIF~~FV~~NKT~~YLP~~NP~~TPL~~FLCKYREEELMNLRGDGKR~~
 CpLOX1_2 130 ---GEGR~~MHFVCNSWIYPTTDNEKYRIF~~F~~F~~IN~~KT~~YLP~~PNR~~TPL~~PLRKYREEELTNLRGDGKR~~
 AtLOX1 135 ---GHGR~~VHYICNSWIYPAKHYYTDRV~~FF~~S~~N~~KT~~YLP~~PH~~ET~~PAT~~L~~LKYREEELVSLRGTGEG~~
 CpLOX5_2 122 ---SHGR~~LHFVCNSWVYPVHHCCKYRIF~~FS~~NKS~~YLP~~FEMPE~~LR~~KFREELANLRGNKGE~~
 CpLOX5_1 122 ---GHGR~~LHFVCNSWVYPVHRYKYDRIF~~FS~~NKS~~YLP~~FEMPE~~LR~~KFREELANLRGNKGD~~
 AtLOX5 151 GEGGATAI~~HFCNSWIYPNHRYRSRDRV~~FF~~S~~N~~KAY~~LP~~SETPE~~L~~I~~KEL~~REEELKNLRGNEKG~~
 AtLOX2 174 ----GGSIT~~FCE~~SW~~VAPKSVDP~~TKR~~IFF~~S~~DKS~~YLP~~SOTPE~~FL~~KKYRKEELETLOGKNRE~~
 CpLOX2 230 ----DGSV~~HVSCQSWIHSKFDNPDRIF~~FT~~NKS~~YI~~TOETPE~~GL~~RRLRELELENLRGNQ~~-
 AtLOX3 197 ----LGPV~~HPCNSWVQSQKDHDPKRIF~~FT~~NQ~~PY~~LP~~NET~~PSGLRVLREKELKNLRGDGS-~~
 AtLOX4 203 ----CGPV~~HPCNSWVQSQKDHPSKRIL~~FT~~NQ~~PY~~LP~~SET~~PSGLRTLREKELNLRGNK~~-
 CpLOX3 203 ----SGPL~~HPCNSWVQEVKHHSSRIF~~FS~~NKPY~~LP~~SDE~~PV~~GLKALREKELKDLRGDK-~~
 AtLOX6 191 ----TDTIL~~EPANTWIHSKNDNPQARIL~~FR~~SQ~~PCL~~PSET~~PD~~G~~IKEL~~REKDLVSRGDGK-~~
 CpLOX6 199 ----QGPI~~FEPANTWIHSRKHNPESRI~~FR~~NQ~~AY~~LP~~SOT~~PAGL~~KDL~~LRREDLLSIRGNK-~~

LOX

CpLOX1_1 200 ---ELK~~KRDRVYDYAYNDLGE~~P---TKD~~PRPV~~LGG~~STE~~Y~~PY~~PRR~~GRTGRPPA~~EED~~PKTE~~
 CpLOX1_3 205 ---ELK~~ERDRVYDYAYNDLGE~~P---TKE~~PRPV~~LGG~~SSE~~Y~~PY~~PRR~~GRTSRPP~~TKED~~PKSE~~
 CpLOX1_2 187 ---ELK~~ERDRVYDYAYNDLGE~~P---AKS~~PRP~~LGG~~STKY~~PY~~PRR~~GRT~~GRP~~RE~~ID~~PK~~SE~~
 AtLOX1 192 ---ELK~~EWDRVYDYAYNDLGE~~P---PKN~~PRPV~~LGG~~TOE~~Y~~PY~~PRR~~GRTGRKPT~~KED~~PQTE~~
 CpLOX5_2 179 ---ELK~~EWDRVYDYAYNDLGE~~P---GSE~~DQRP~~LGG~~SQY~~PY~~PRR~~GRT~~GRKPT~~KED~~PRYE~~
 CpLOX5_1 179 ---EQK~~EWDRVYDYAYNDLGE~~P---GSE~~DQRA~~VGG~~SQY~~PY~~PRR~~GRT~~GRKPT~~KED~~PRYE~~
 AtLOX5 211 G---EFK~~EWDRVYDYAYNDLGE~~PDK~~G~~PDS~~V~~RPV~~LGG~~SP~~EL~~PY~~PRR~~GRT~~GRK~~ST~~KSD~~PK~~SE~~
 AtLOX2 230 EVGE~~FTKFERIYDYDVYNDLGD~~PND~~PEL~~AR~~PV~~LGG--LTH~~PY~~PRR~~CKTGRK~~EC~~ETD~~PS~~SE~~
 CpLOX2 285 --GER~~KKFERIYDYDVYNDLGE~~P--NQ~~PDL~~AR~~PV~~LGG--KQ~~NPY~~PRR~~CRTGRP~~TKED~~PLSE~~
 AtLOX3 252 --GVR~~KLSDRYDYDVYNDLGN~~PK~~S~~SELS~~SRPK~~LGG--KE~~V~~PY~~PRR~~CRT~~GR~~PS~~T~~VSD~~PKDAE~~
 AtLOX4 258 --GER~~KLSDRYDYDVYNDLGN~~PD~~I~~SREL~~ARPT~~LGG--RE~~F~~PY~~PRR~~CRT~~GR~~SS~~T~~DT~~DM~~MS~~E~~
 CpLOX3 258 --GVR~~NLSDRYDYDVYNDLGN~~PK~~G~~SDF~~AR~~PV~~L~~G--RO~~I~~PY~~PRR~~CRT~~GR~~PP~~T~~DT~~M~~HV~~E~~
 AtLOX6 246 --GER~~KPHERIYDYDVYNDLGD~~PR~~K~~--TER~~V~~RPV~~L~~GV--PE~~T~~PY~~PRR~~CRT~~GR~~PL~~V~~SK~~D~~PP~~CE~~
 CpLOX6 254 --GER~~KAHDRYDYAPYNDLGN~~PK~~D~~ED~~LL~~RPV~~M~~GG--ER~~R~~PY~~PRR~~CRT~~GR~~PP~~T~~KY~~PE~~FE

LOX

CpLOX1_1 254 SRLP~~LLKSLKIYVPRDERF~~SHL~~KMH~~DEF~~FAYG~~FK~~SII~~QL~~IK~~EF~~FKAL~~FDD~~TINE~~FD~~T~~FK~~DI~~
 CpLOX1_3 259 SRLP~~LLKSLDYVPRDERF~~SHL~~KMS~~DEL~~AYG~~IK~~S~~LI~~QV~~LR~~HD~~FK~~AL~~LG~~ST~~DK~~ED~~ES~~LED~~T
 CpLOX1_2 241 SRIPL~~IKSLDIYVPRDEK~~F~~NHL~~KMS~~DEF~~FAY~~AFKS~~IV~~HF~~IK~~BE~~IK~~AL~~FK~~K~~NI~~NE~~NS~~LED~~I
 AtLOX1 246 SRLP~~ITSSLDIYVPRDERF~~G~~H~~LK~~MS~~DEL~~AY~~AL~~K~~IA~~IQ~~PA~~LE~~AV~~FDD~~TP~~K~~ED~~S~~FED~~V~~
 CpLOX5_2 232 SRLP~~LLS-LNFYVPRDEK~~F~~N~~YK~~FSD~~EI~~AY~~GL~~KAL~~VR~~V~~VE~~IT~~SL~~CD~~KT~~IDE~~ED~~S~~FED~~V~~
 CpLOX5_1 232 SRLP~~LLS-LNFYVPRDEK~~F~~N~~HK~~IFSD~~EI~~AY~~TL~~KAI~~VQ~~V~~FV~~PE~~IT~~SL~~CD~~KT~~IDE~~ED~~S~~F~~K~~D~~V
 AtLOX5 269 SRL~~ALLN-LNIYVPRDERF~~SH~~VK~~FSD~~E~~L~~AY~~AL~~K~~SV~~T~~Q~~V~~VE~~PI~~AS~~V~~CD~~KT~~INE~~ED~~S~~F~~ED~~V~~
 AtLOX2 289 QRYGG---EFY~~VPRDEEF~~STAK~~GT~~SET~~G~~KAV~~L~~AL~~PS~~IF~~PO~~IES~~V~~LL~~S~~PQ~~EP~~PH~~FKAT~~
 CpLOX2 341 TRSS----SVY~~VPRDEAF~~SEI~~K~~Q~~L~~T~~F~~SG~~NT~~L~~K~~SV~~L~~HA~~NI~~PO~~IE~~SEL~~V~~D~~PH~~LR~~EP~~Y~~FTAI~~
 AtLOX3 309 SRV~~EKPL--PMYVPRDEQ~~F~~E~~ES~~K~~Q~~D~~T~~F~~AG~~R~~L~~KAVL~~HN~~L~~IP~~SL~~KAS~~I~~VAE--DE~~AD~~F~~GEI~~
 AtLOX4 313 RRV~~EKPL--PMYVPRDEQ~~F~~E~~ES~~K~~Q~~N~~T~~F~~AA~~C~~R~~LKAVL~~HN~~L~~IP~~SL~~KAS~~I~~AE--DE~~AN~~F~~GEI~~
 CpLOX3 314 SRV~~EKPL--PVYVPRDEQ~~F~~E~~ES~~K~~Q~~D~~T~~F~~S~~A~~G~~R~~L~~KAVL~~HN~~L~~IP~~SL~~KAT~~I~~SAD~~N~~HD~~E~~NA~~F~~SD~~I~~
 AtLOX6 302 SRG~~KEKE--EFYVPRDEV~~F~~E~~EI~~K~~RD~~T~~FR~~A~~G~~R~~F~~KAL~~FN~~L~~IP~~SL~~AA~~AL~~SN~~LD~~IP~~ET~~CF~~S~~DI
 CpLOX6 311 SRI~~EKPH--PVYVPRDET~~F~~E~~EI~~K~~Q~~N~~SE~~S~~AG~~R~~L~~KALL~~HN~~L~~IP~~SL~~AA~~AL~~SS~~SD~~IP~~ET~~CF~~S~~DI

LOX

CpLOX1_1 314 MEI~~YEDGRK~~VSD~~S~~PL~~LET~~IK~~KN~~VP~~LE~~LL~~RE~~IF~~FR~~TG~~ERN~~FN~~F~~MP~~Q~~VIK-----
 CpLOX1_3 319 MKV~~YQ~~EA~~N~~MAC~~SS~~PL~~LE~~KI~~KN~~IP~~EM~~LR~~E~~IF~~FR~~SD~~GER~~H~~F~~N~~F~~VP~~Q~~VIK~~GN~~K~~KT~~PL~~IS~~Y
 CpLOX1_2 301 MKL~~Y~~GE~~GS~~SH~~SS~~LL~~D~~HI~~REN~~IP~~LET~~L~~KE~~IL~~R~~TG~~ESH~~FN~~F~~PL~~Q~~VIK-----
 AtLOX1 306 LKI~~Y~~EE~~G~~IDL~~PN~~QAL~~IDS~~IV~~KN~~IP~~LE~~ML~~KE~~IF~~FR~~TG~~Q~~KE~~L~~K~~F~~VP~~Q~~VIK-----
 CpLOX5_2 291 LDLY~~Q~~GGI~~K~~LP~~NG~~PT~~I~~NKI~~REL~~V~~P~~EW~~ML~~KE~~L~~IR~~ND~~GER~~L~~L~~K~~FP~~M~~PD~~V~~IK-----
 CpLOX5_1 291 LDLY~~Q~~GGI~~K~~LP~~NG~~PI~~I~~NKI~~REL~~V~~P~~EW~~ML~~KE~~L~~IR~~ND~~GER~~L~~L~~K~~FP~~M~~PD~~V~~IK-----
 AtLOX5 328 FHLY~~D~~GS~~IK~~L~~ANG~~HT~~I~~SK~~L~~RD~~V~~IE~~W~~EM~~F~~REL~~V~~R~~ND~~GER~~L~~K~~Y~~PL~~D~~IL~~K~~-----
 AtLOX2 345 QNL~~F~~EE~~G~~I~~Q~~EP~~KD~~----AG~~L~~PL~~L~~PR~~II~~K--AL~~GE~~AQ~~DD~~IL~~Q~~ED~~AP~~V~~L~~IN-----
 CpLOX2 396 DSL~~F~~NE~~G~~HS~~E~~PK~~P~~K~~N~~AF~~S~~GV~~K~~SI~~I~~PR~~L~~V~~K~~--AV~~AS~~KQ~~N~~EM~~L~~CF~~ET~~PE~~M~~VD-----
 AtLOX3 365 DRLY~~K~~E~~G~~LL~~L~~K~~L~~G~~F~~Q~~DD~~IF~~K~~FL~~P~~L~~K~~V~~V~~DT~~L~~Q~~ES~~T~~K~~GL~~L~~K~~Y~~DT~~P~~K~~I~~LS-----
 AtLOX4 371 DSL~~Y~~KE~~G~~LL~~L~~K~~L~~G~~F~~Q~~DD~~MF~~K~~FL~~P~~L~~K~~IV~~T~~--TL~~Q~~K~~SS~~E~~G~~L~~L~~Y~~D~~T~~P~~K~~I~~VS-----
 CpLOX3 372 DNLY~~R~~E~~G~~LL~~L~~K~~I~~G~~L~~Q~~DEL~~IK~~L~~PL~~P~~TV~~VN~~--TI~~Q~~ESS~~R~~LL~~K~~Y~~NT~~P~~K~~I~~V~~S-----
 AtLOX6 360 DNLY~~K~~SN~~T~~V~~L~~G~~H~~TE~~P~~K~~D~~T~~G~~L~~G~~GF~~I~~GG~~F~~MN--GIL~~N~~VT~~E~~LL~~K~~Y~~DT~~P~~A~~VIK-----
 CpLOX6 369 DKLY~~S~~D~~G~~V~~V~~IK~~D~~E~~E~~K~~R~~EV~~V~~ANT~~F~~E~~G~~N~~M~~M~~K~~--QL~~L~~T~~V~~GE~~R~~L~~L~~K~~Y~~EV~~P~~AV~~I~~R-----

LOX

CpLOX1_1	363	-----	EDKSAWRTDEEFAREMLAGVNPVVI	RHLQEFPPVS
CpLOX1_3	379	KMQNFTLSVLAFTLFSDFVVLFKSD	DKSAWRTDEEFAREMLAGLHPVVI	IHLQEFPPSS
CpLOX1_2	350	-----	EDKSAWRTDEEFAREMLAGVNPVVI	CLLQEFPPTS
AtLOX1	353	-----	EDKTAWRTDEEFAREMLAGVNPVVI	QLLKEFPKPS
CpLOX5_2	340	-----	EDRSAWRTDEEFGREMLAGVNPVVI	IRLLQEFPPAS
CpLOX5_1	340	-----	EDRSAWRTDEEFGREMLAGVNPVVI	IRLLQKFPFAS
AtLOX5	377	-----	ESRSAWRTDEEFAREMLAGVNPVVI	SRLQEFPPAS
AtLOX2	389	-----	RDRFSWLRDDEFARQTLAGLNPYSI	QLVEEWPLIS
CpLOX2	444	-----	RDKFAWFRDEEFARQMLAGLNPYSI	QLVAEWPLKS
AtLOX3	414	-----	KDKNAWLRDDEFARQAIAGLNPVNI	IERVKTFPFVS
AtLOX4	419	-----	KDKYAWLRDDEFARQAIAGLNPVNI	IERVTSYPPVS
CpLOX3	420	-----	KDKFAWLRDDEFARQTMAGLNPVSI	IERLRVFPFVS
AtLOX6	408	-----	WDRFAWLRDNEFGRQALAGVNPVNI	IELLKELPFIS
CpLOX6	417	-----	RDRFSWLRDNEFARQALAGVNPVSI	IELLRELPLIS

LOX

CpLOX1_1	398	KLEPKLYGN-QNSSINKGHVENNLOG	--LTVDEALVQNRFLILDHHDITL	MPYLKRN-TT
CpLOX1_3	439	NLEPKVYGN-QNSSINRSHVEKNLDK	--LSVDEALKHNRLFILDYHDVLM	MPYLKRNINDT
CpLOX1_2	385	KLDEPKLYGD-QSSSIDKSHIEKNLDG	--LSTEAEALQKRLFILDHHDIM	MPCLRKN-TT
AtLOX1	390	KLDSESYGN-QNSTITKSHIEKNLDG	--LTVDEALEKERLFILDHHDITL	MPYLGRN-TT
CpLOX5_2	375	KLDPRVYGN-QHSSITKEHIEKNMNR	--LTVDEALEKKKLFILDHHDITL	MPYLARIN-ST
CpLOX5_1	375	KLDEPKVYGN-QHSSITKEHVEKNMNG	--LTVDEALEKKKLFILDHHDISL	MPYLARIN-ST
AtLOX5	412	CLDSAKYGN-QHSSIRTEHIESNMNG	--LNVQEALEONKLYILDHHDAL	MPYLTRIN-ST
AtLOX2	424	KLDPAVYGD-PTSLITWEIVEREVKG	-NMTVDEALKNKRLFVLDYHDLL	LPYVKNVRELN
CpLOX2	479	KLDPQIYGP-PESLITTELVEKEIKG	-IMTVQEALEKQKRLFILDYHDF	FLPYVHKVREIE
AtLOX3	449	NLDPKIYGP-QHSALTDHIIIGHLD	--GFSVQQALENRLYMLDYHDI	FLPFLDRINALD
AtLOX4	454	NLDPEIYGPGLHSALTEDHIIIGQLD	--GLTVQQALETNRLFMVDYHDI	YLPFLDRINALD
CpLOX3	455	NLDPQIYGS-QPSALQEHIIAPHLH	-CMTVQQALEEKKLYIMDYHDI	YLPFLDRINALD
AtLOX6	443	NLDPALYGP-QESVLTBEIIEAREVEHYGT	TEKALEEKKRLFVLDYHDI	LLPFVEKINSIK
CpLOX6	452	KLDESVYGP-PESALTEELIEQELH	--GMSVKKAMEDKRLFILDYHDM	LLPFINKMNDLP

LOX

CpLOX1_1	454	S--KKTYASRTILFLNDDGTLRPLAIELSLPH	PEIDQLGAVSKVYTPADDG	IEGSLWQLA
CpLOX1_3	496	S--TKTYASRTLLFLKDDGTLTPLAIELSLPH	PGDKQLGCVSNVYTPAQD	GIEGSLWQLA
CpLOX1_2	441	S--TKTYASRTLLFLKDDGTLKPLAIELSLPH	PEIDQLGAIKVLTPAEND	VEGSMWQLA
AtLOX1	446	T--TKTYASRTLLFLKDDGTLKPLVIELSLPH	PNGDKFGAVSEVYTPGE	-GVYDSLWQLA
CpLOX5_2	431	K--TKAYATRTVFLQDDGTLIPVAIELSLPH	PQGDLDHGSVSKVTPAE	QGVKSSVWQLA
CpLOX5_1	431	K--TKTYASRTVFLQDDGALKPLAIELSLPH	PEEDHHCVSKVTPAQG	VEGVSVMWQLA
AtLOX5	468	N--TKTYATRTLLFLQADGTLKPLAIELSLPH	AQGESYGSVSKVTPAE	KGVGVSVMWQLA
AtLOX2	482	N--TTLYASRTLFFLSDGTLRPAVIAELTC	PPNI--NKPQWKQVTP	PGYDATSCWLWQLA
CpLOX2	537	G--TTLYGSRTLFFLTDGTLMLPLAIELTR	PKNG--EKPOWKQVTP	PSHSTDCWLWQLA
AtLOX3	506	G--RKAYATRTIFFLTRLGLTKPVAIELSLPH	PHG--PKHRSKRVLP	PPVDATSNWVMWQLA
AtLOX4	512	G--RKAYATRTIFFLTRLGLTKPIAIELSLP	QSS-SNQKSKRVLP	PPVDATSNWVMWQLA
CpLOX3	512	G--RKAYATRTIFFLTPQGCLKPIAIELSLP	HGT--PTSROKRVLP	PPVDATSNWVMWQLA
AtLOX6	502	EDPRKTYASRTIFFYSKNICALRPLAIELSL	PFTA--ES-ENKFVY	THGDATTHWIKWQLA
CpLOX6	509	K--RKAYASRTVFEYFKTG-IRPIIIIELSL	PPSP--YSSQNKFIY	THGDATTHWIKWQA

LOX

CpLOX1_1	512	KAYVAVNDSGYHQLISHWLNTHAVIE	PFVIATNRQLSSLHPIH	KLLHPHFRDTM	NINAF
CpLOX1_3	554	KAYVAVNDSGYHQLISHWLNSHAAIE	PFVIATNRQLSVLHPIH	RLLHPHFRDTM	FINAF
CpLOX1_2	499	KAYVSVNDAGYHQLISHWLTHAVIE	PFVIATNRQLSVLHPIH	KLLYPHFRDTM	TINALS
AtLOX1	503	KAYVGVNDSGNHQLISHWMTTHASIE	PFVIATNRQLSVLHPVFK	LLPHFRDTM	NINALA
CpLOX5_2	489	KAYVAVNDSGYHQLISHWLNTHAVIE	PFVIATNRQLSIVHPIY	KLLHPHFRDTM	YINALA
CpLOX5_1	489	KAYVAVNDSGYHQLISHWLNTHAVIE	PFVIATNRQLSIVHPIY	KLLHPHFRDTM	NINAIG
AtLOX5	526	KAYAAVNDSDGYHQLISHWLQTHAVIE	PFVIATNRQLSVVHPIH	KLLHPHFRDTM	NINALA
AtLOX2	538	KTHAISHDAGYHQLISHWLRTTHACTE	PYIIAANRQLSAMHPIY	RLLHPHFRYTM	EINARA
CpLOX2	593	KAHVCAHDAGFHQLVAHWLRTTHACTE	PYIIAANRQLSAMHPIH	RLLHPHFRYTM	EINARA
AtLOX3	562	KAHVSSNDAGVHQLVNEWLRTTHACLE	PFIIAANRQLSAMHPIK	LLDPHMRYTLE	INARA
AtLOX4	569	KAHVGSNDAGVHQLVNEWLRTTHACLE	PFIIAANRQLSAMHPIK	LLDPHMRYTLE	INARA
CpLOX3	568	KAHVCSNDAGVHQLVNEWLRTTHASME	PFIIAANRQLSAMHPIK	LLDPHMRYTLE	INARA
AtLOX6	559	KAHVCSNDAGVHQLVNEWLRTTHASME	PFIIATNRQLSTMHPVY	KLLHPHMR	RYTLEINARA
CpLOX6	564	KAHVCSNDAGVHQLVNEWLRTTHACME	PYIIATNRQLSSMHPVY	KLLHPHMR	RYTLEINARA

Firma de histidinas

Firma de histidinas

		LOX																																																				
CpLOX1_1	807	PLEAFRRF	G	E	K	L	A	E	I	E	K	R	I	V	E	M	N	D	K	K	L	K	N	R	F	G	P	V	K	M	P	Y	T	L	L	Y	P	-----	T	S	D	L	G	L	T	G	R	G	I					
CpLOX1_3	849	PLEAFKRF	G	D	K	L	A	E	V	E	E	K	I	I	K	L	N	D	K	K	L	K	N	R	V	G	P	V	N	M	P	Y	T	L	L	Y	P	-----	T	G	E	T	G	L	S	G	R	G	I					
CpLOX1_2	794	TLEAFKRF	G	N	K	L	A	E	I	E	E	K	I	V	E	R	N	D	K	E	S	K	N	R	I	G	P	V	N	M	P	Y	T	L	L	Y	P	-----	T	G	E	I	G	L	I	G	K	G	I					
AtLOX1	799	ALEAFKRF	G	E	K	V	K	E	I	E	K	N	I	D	E	R	N	D	E	T	L	K	N	R	T	G	L	V	K	M	P	Y	T	L	L	F	P	-----	S	S	E	G	G	V	T	G	R	G	I					
CpLOX5_2	784	VIAAFERF	G	K	K	L	Q	E	I	E	N	N	I	I	R	R	N	D	D	K	K	L	K	N	R	V	G	P	V	K	V	P	Y	S	L	L	Y	P	N	T	S	D	Y	S	K	Q	G	G	L	T	G	K	G	I
CpLOX5_1	784	VIAAFERF	S	K	K	L	Q	E	I	E	N	N	I	I	L	R	N	D	D	K	K	L	K	N	R	V	G	P	V	K	V	P	Y	Y	L	L	Y	P	S	T	S	D	Y	S	K	Q	G	R	L	A	G	K	G	I
AtLOX5	821	PLEAFKRF	G	K	E	L	E	L	I	E	N	N	I	I	R	R	N	D	K	R	F	K	N	R	T	G	P	V	N	I	P	Y	T	L	L	Y	P	N	T	D	Y	T	R	E	G	G	I	T	G	K	G	I		
AtLOX2	836	INAAFERF	K	G	K	L	Q	Y	L	E	G	V	I	D	E	R	N	V	N	I	T	L	K	N	R	A	G	A	G	V	V	K	Y	E	L	L	K	P	-----	T	S	E	H	G	V	T	G	M	G	V				
CpLOX2	891	IKFAFDRF	N	V	K	L	K	E	L	E	K	I	I	D	E	R	N	G	N	L	K	L	K	N	R	S	G	A	G	V	V	P	Y	E	L	L	K	P	-----	E	S	E	P	G	V	T	G	K	G	V				
AtLOX3	859	IVFAFYGF	A	A	E	I	G	R	I	E	K	E	I	E	K	R	N	A	D	P	D	R	R	N	R	C	G	A	G	V	L	P	Y	E	L	L	V	P	-----	S	S	E	P	G	V	T	C	R	G	V				
AtLOX4	866	IVDAFYGF	S	A	E	I	G	R	I	E	K	E	I	E	K	R	N	R	D	P	S	R	R	N	R	C	G	A	G	V	L	P	Y	E	L	M	A	P	-----	S	S	E	P	G	V	T	C	R	G	V				
CpLOX3	865	IIEAFYGF	S	A	E	I	I	R	I	E	K	E	I	E	K	R	N	Q	D	P	S	L	K	N	R	C	G	A	G	V	L	P	Y	E	L	L	A	P	-----	S	S	E	P	G	V	T	C	R	G	V				
AtLOX6	857	VVKYFNKF	S	E	E	L	V	K	I	E	K	T	I	N	E	R	N	K	D	K	K	L	K	N	R	T	G	A	G	M	P	P	Y	E	L	L	L	P	-----	T	S	P	H	G	V	T	G	R	G	I				
CpLOX6	862	ILKLEDF	S	A	K	L	S	E	A	E	E	I	I	N	R	R	N	K	D	I	R	L	K	N	R	G	A	G	V	P	P	Y	E	L	L	L	P	-----	S	S	G	P	G	V	T	G	R	G	I					

CpLOX1_1	862	PNSVSI
CpLOX1_3	904	PNSISI
CpLOX1_2	849	PNSISI
AtLOX1	854	PNSVSI
CpLOX5_2	844	PNSISI
CpLOX5_1	844	PNSISI
AtLOX5	881	PNSVSI
AtLOX2	891	PYSISI
CpLOX2	946	PNSISI
AtLOX3	914	PNSVSI
AtLOX4	921	PNSVSI
CpLOX3	920	PNSVSI
AtLOX6	912	PNSISI
CpLOX6	917	PNSISI

Figura 16. Alineamiento de las AtLOXs y de las CpLOXs putativas. PLAT: dominio PLAT (línea roja) y LOX: dominio lipoxigenasa (línea azul). Los aminoácidos resaltados son los característicos de sus respectivos dominios.

Posteriormente se realizaron análisis de la conservación de aminoácidos de los distintos motivos de las PLDs y LOXs de *A. thaliana* y las predicciones de *C. papaya* por medio del servido WEBLOGO (ver Figuras 17, 18 y 19). El análisis en el dominio PLAT de ambas PLDs indica la conservación de residuos lisina y arginina los cuales son característicos de este dominio. También se observó la conservación de los motivos HxKxxxxD en los dominios HKD1 y HKD2. El análisis del dominio LOX indica la conservación de los motivos de histidinas (tres histidinas en el primer motivo y dos histidinas en el segundo motivo).

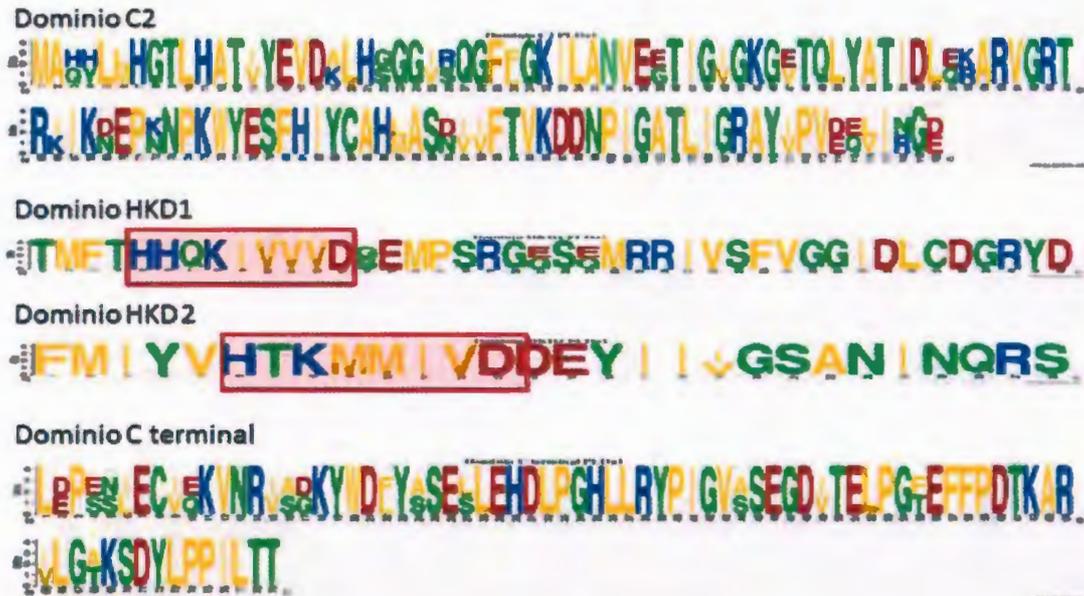


Figura 17. Frecuencias de aminoácidos en los dominios de las PLD α 1s de *A. thaliana* y *C. papaya*. Los aminoácidos resaltados en los cuadros rojos son los característicos de los dominios HKD.

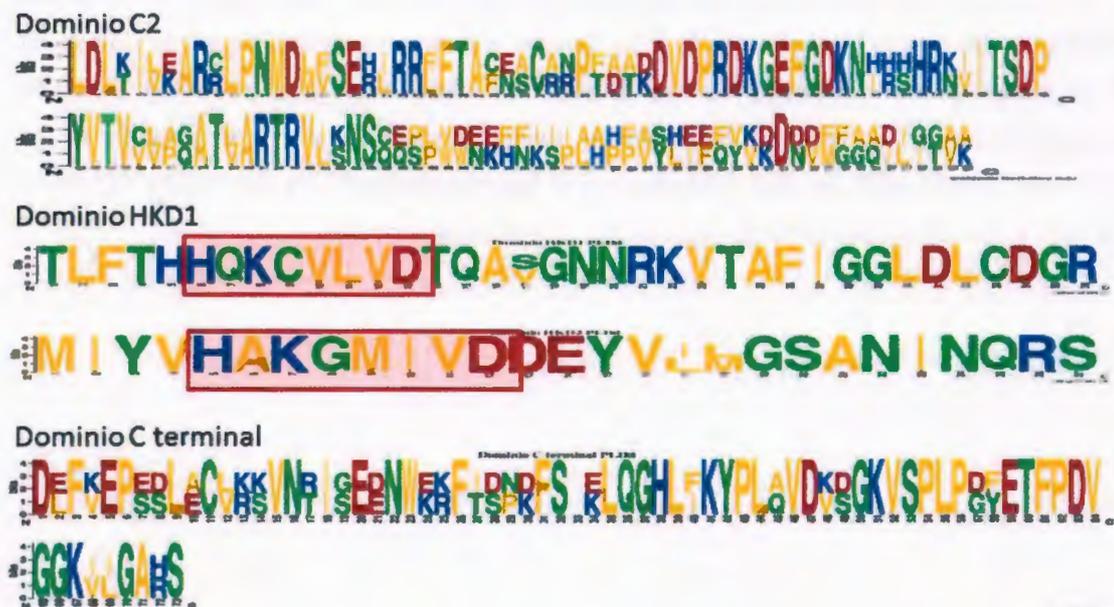


Figura 18. Frecuencias de aminoácidos en los dominios de las PLD δ s de *A. thaliana* y *C. papaya*. Los aminoácidos resaltados en los cuadros rojos son los característicos de los dominios HKD.

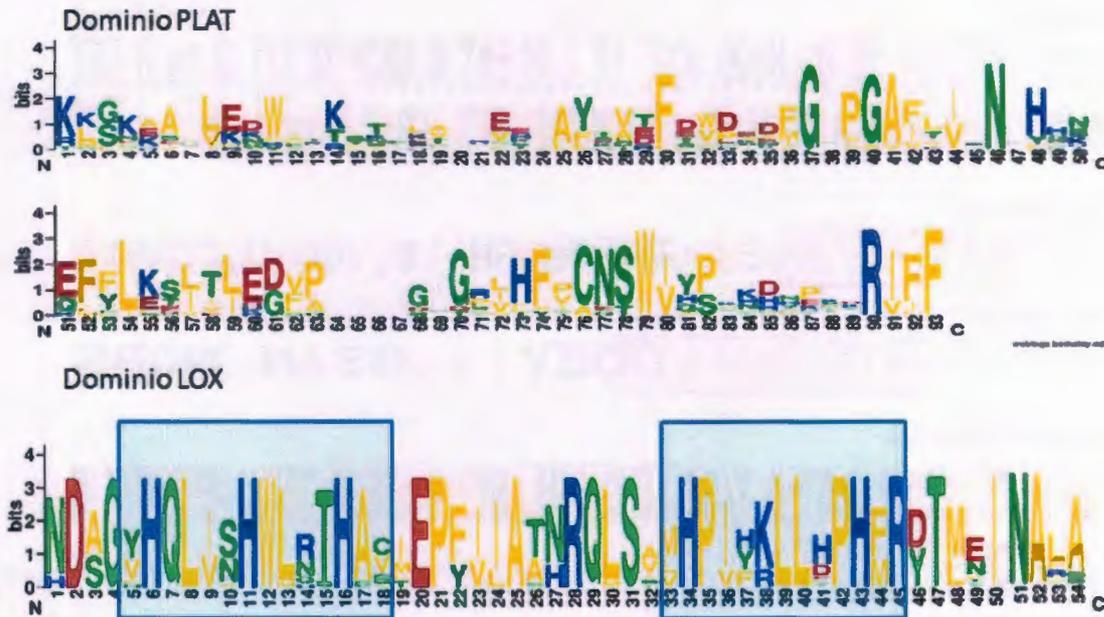


Figura 19. Frecuencias de aminoácidos en los dominios de las CpLOXs de de *A. thaliana* y *C. papaya*. Los aminoácidos resaltados en los cuadros azules son los característicos del dominio LOX.

Se llevó a cabo el análisis de los dominios de las CpPLDs y las CpLOXs putativas empleando las herramientas Pfam 27.0 de Sanger y el analizador de Prosite. En la Figura 20 se muestra los resultados de los análisis de ambas CpPLDs y de las CpLOXs (compartido por las ocho CpLOXs putativas). Como puede observarse, los resultados de ambos servidores son iguales, indicando que las predicciones de los genes putativos CpPLDs y CpLOXs posiblemente posean los respectivos dominios.

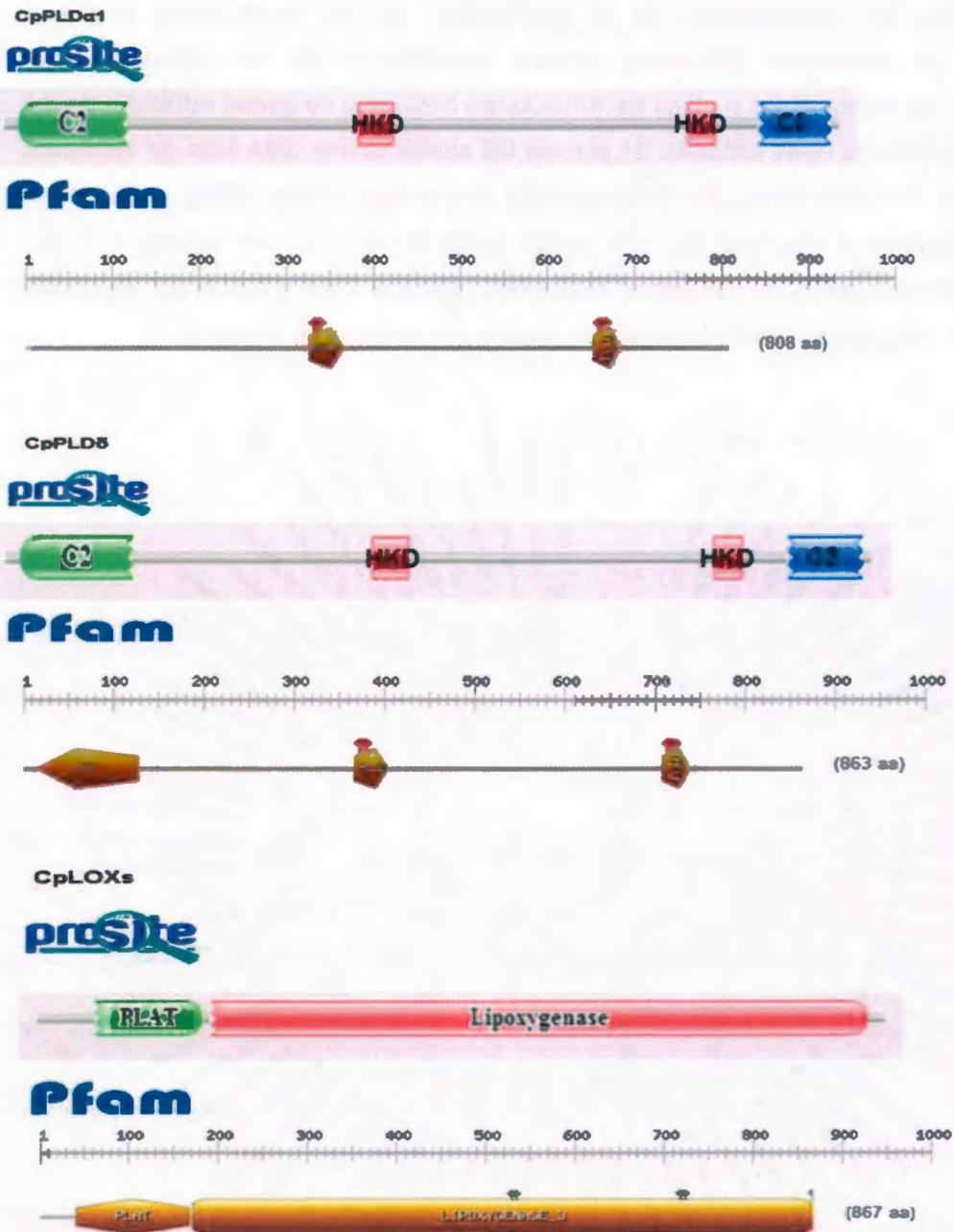


Figura 20. Análisis de dominios de la CpPLD α 1, CpPLD δ y las CpLOXs (común en las ocho CpLOXs putativas).

Como método de corroboración de la clasificación de las predicciones proteicas diseñadas, se elaboraron diferentes árboles filogenéticos de las secuencias de aminoácidos de genes PLDs y LOXs de *Arabidopsis thaliana* y de genes ortólogos de las AtPLDs y AtLOXs de otras especies de plantas las cuales fueron obtenidas de las bases de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, USA) mediante un análisis empleando el algoritmo BLASTp, con la matriz BLOSUM62 (ver Figuras 21 y 22). Se emplearon dos métodos diferentes: Maximum Likelihood Tree y Construct Neighbor-Joining Tree. En ambas metodologías se obtuvieron resultados muy similares.

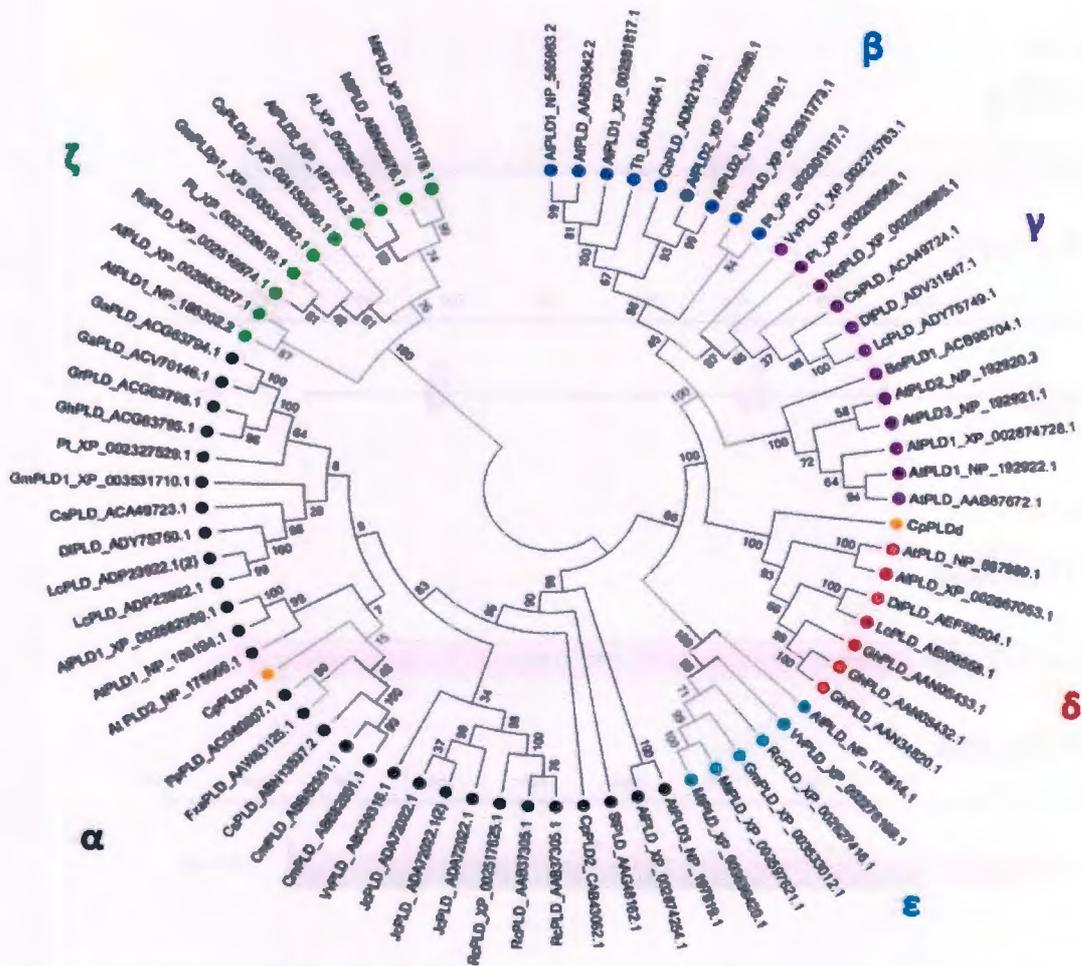


Figura 21. Árbol filogenético de secuencias de aminoácidos de PLDs conocidas en plantas y de predicciones en *C. papaya*. Nomenclatura: círculos negros: proteínas ortólogas a AtPLD α ; círculos azules: proteínas ortólogas a AtPLD β ; círculos morados: proteínas ortólogas a AtPLD γ ; círculos

rojos: proteínas ortólogas a AtPLD δ ; círculos añiles: proteínas ortólogas a AtPLD ϵ ; círculos verdes: proteínas ortólogas a AtPLD ζ ; círculos naranjas: predicciones de PLDs en *C. papaya*. Datos: método: Maximum Likelihood Tree; modelo: JTT; prueba de filogenia: Bootstrap (1000 replicaciones).

El análisis filogenético de las secuencias de aminoácidos de LOXs indica la formación de dos grupos de genes LOXs: los genes ortólogos a AtLOX1 y AtLOX5 (pertenecientes a las LOXs del tipo 1) y genes ortólogos a AtLOX2, 3, 4 y 6 (pertenecientes a las LOXs del tipo 2). Este comportamiento concuerda con el observado por Bannenberg *et al.*, 2009.

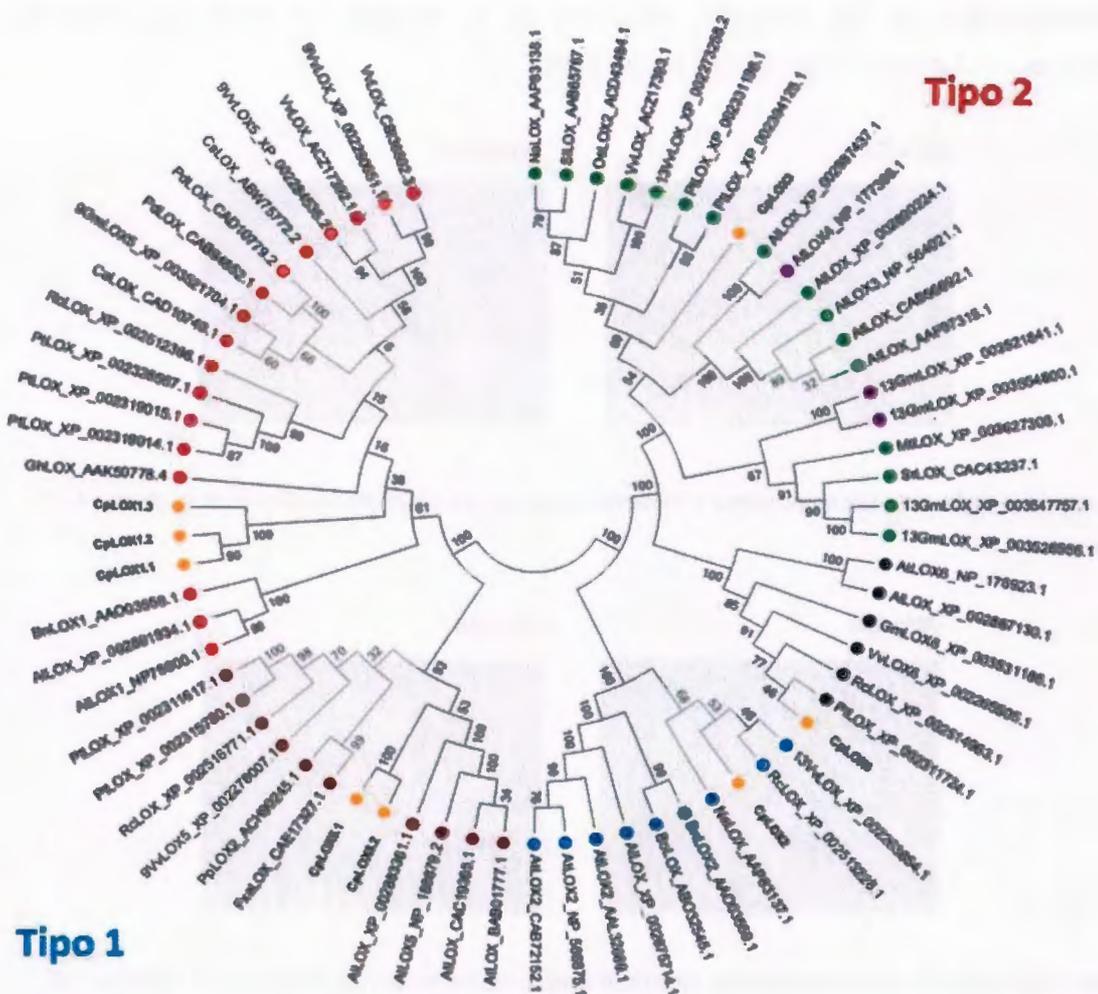


Figura 22. Árbol filogenético de secuencias de aminoácidos de LOXs conocidas en plantas y de predicciones en *C. papaya*. Nomenclatura: círculos rojos: proteínas ortólogas a AtLOX1; círculos

azules: proteínas ortólogas a AtLOX2; círculos verdes: proteínas ortólogas a AtLOX3; círculos morados: proteínas ortólogas a AtLOX4; círculos cafés: proteínas ortólogas a AtLOX5; círculos negros: proteínas ortólogas a AtLOX6; círculos naranjas: predicciones de LOXs en *C. papaya*. Datos: método: Maximum Likelihood Tree; modelo: JTT; prueba de filogenia: Bootstrap (1000 repeticiones).

Adicionalmente también se realizaron árboles filogenéticos de PLDs y LOXs (utilizando los mismos datos) empleando el método de Neighbor Joining (ver Anexos 1 y 2).

Se realizó un análisis comparativo, empleando al servidor Phyre2, de las estructuras tridimensionales de las proteínas conocidas en *A. thaliana* así como las proteínas putativas en *C. papaya* (ver Figuras 23, 24 y 25).

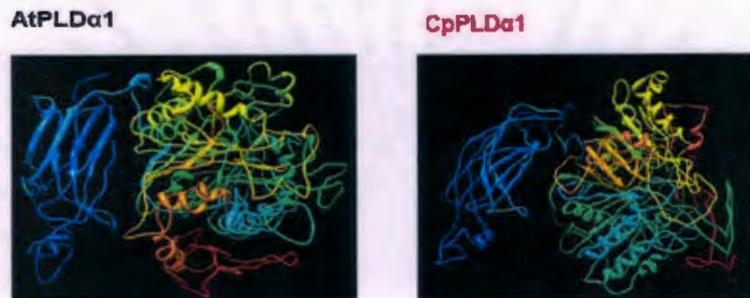


Figura 23. Análisis de las estructuras tridimensionales de las proteínas PLD α 1s de *A. thaliana* y *C. papaya*.

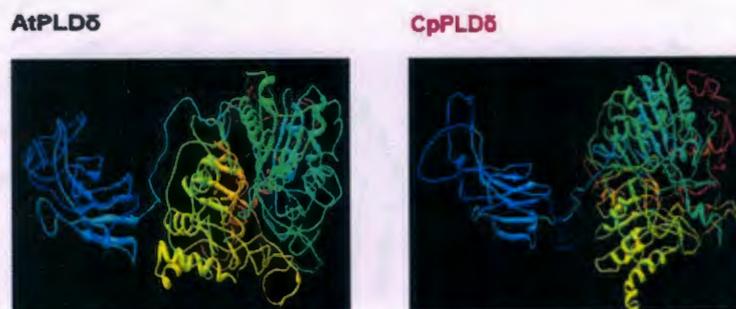


Figura 24. Análisis de las estructuras tridimensionales de las proteínas PLD δ s de *A. thaliana* y *C. papaya*.

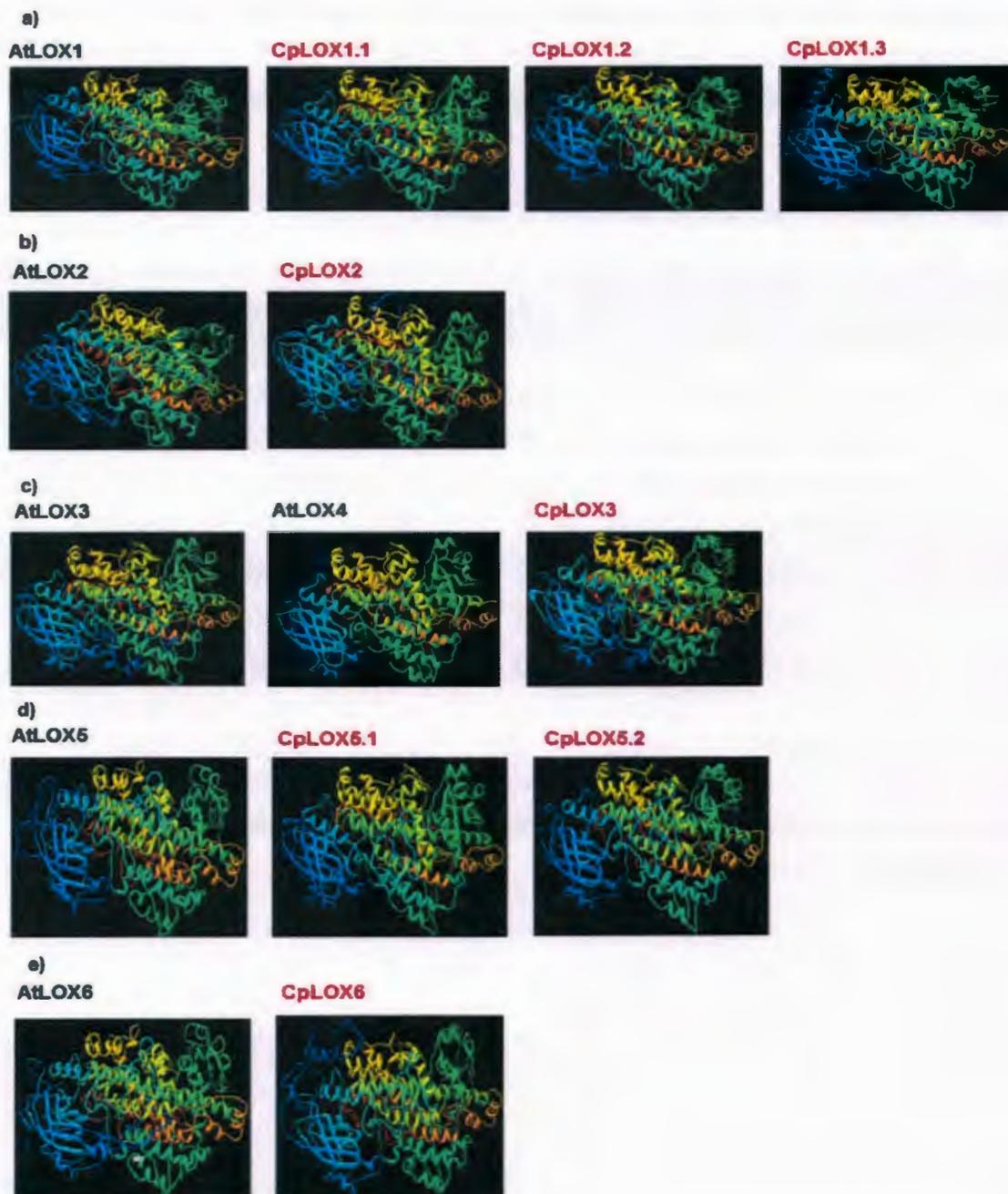


Figura 25. Análisis de las estructuras tridimensionales de las proteínas LOXs de *A. thaliana* y *C. papaya* (a: AtLOX1 y CpLOX1s; b: AtLOX2 y CpLOX2; c: AtLOX3, AtLOX4 y CpLOX3; d: AtLOX5 y CpLOX5; e: AtLOX6 y CpLOX6).

Una vez realizados los análisis anteriores, se procedió a realizar el diseño de primers específicos para los genes *CpPLDs* y *CpLOXs* putativos (ver Cuadro 7). Este se realizó empleando las secuencias nucleotídicas de las predicciones mediante el programa Olygo Analyzer 3.1 de IDT.

Cuadro 7. Pares de primers para genes LOX de *C. papaya* (*CpLOXs*).

Nombre	Forward	Tm	Reverse	Tm
CpLOX1.1	ATGTTGAGGCATTTAAAAGAAG	50	TATTGAGACACTGTTTGAAT	49
CpLOX1.2	ATGTCGACGCAAACAACA	53	AATTGAGATACTATTTGGAATCCCT	52
CpLOX1.3	ATGATGAAGCACGTAATAG	47	GATCGAGATACTATTTGGAAT	47
CpLOX2	ATGGCCTACCGTGTGG	55	AATGGAGATGCTATTAGGAACCTCCTT	56
CpLOX3	ATGGCGCTGGCTAAAGAAA	55	TATCGACACACTGTTTGGGAC	55
CpLOX5.1	ATGGATGAGACCATCATCG	52	AATTGAGATACTATTAGGAATCCCT	52
CpLOX5.2	ATGGATGAGACGATCATC	48	AATTGAGATACTATTAGGAATTCC	48
CpLOX6	ATGTATGCCATCAAGCC	50	GATAGAGATGCTATTGGGTATT	49
CpPLD α 1	ATGGCGCATTATTTGATG	48.3	AGTTGTTAATATTGGAGGGA	48.2
CpPLD δ	ATGGCTGAAGATAACTCCG	51.8	AGTACTGAGAGCATCAGGAA	52.6

Una vez realizados los análisis *in silico*, se procedió a realizar la selección y el tratamiento de daño mecánico de frutos de *C. papaya*.

2.4 DISCUSIÓN

Actualmente existen varias investigaciones acerca de las funciones de las PLDs y las LOXs en los mecanismos de señalización de respuesta de los tejidos de plantas sometidos a estrés por daño mecánico, especialmente hojas. Generalmente los tejidos presentan un incremento de la expresión de los genes que codifican para las PLDs y las LOXs así como de la actividad enzimática de estas (Wang *et al.*, 2000; Zien *et al.*, 2001; Bell, Creelman y Mullet 1995; Chauvin *et al.*, 2012). Sin embargo, las proteínas y genes que conforman estos mecanismos aún son desconocidas en los distintos tejidos de *C. papaya* así como la existencia y participación de las PLDs y LOXs en estos mecanismos. El hecho de que *C. papaya* y *A. thaliana* pertenezcan al orden de las brassicales permite la caracterización funcional de distintos genes en papaya a partir de genes previamente caracterizados en *Arabidopsis* y viceversa (Yang *et al.*, 2004; Lyons *et al.*, 2008). La consulta de investigaciones previas fue empleada como criterio de selección de las CpPLDs y CpLOXs putativas que podrían participar en los mecanismos de señalización de respuesta en frutos de *C. papaya* en diferentes estados de maduración sometidos a estrés por daño mecánico. Por tanto, se seleccionaron los genes AtPLD α 1, AtPLD δ y los seis tipos de AtLOXs como genes de referencia (Wang *et al.*, 2000; Zien *et al.*, 2001; Bell, Creelman y Mullet 1995; Chauvin *et al.*, 2012).

Como se mencionó anteriormente, los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de las predicciones de CpPLDs y CpLOXs presentaron elevados grados de similitud e identidad con respecto a sus genes/proteínas ortólogas en *A. thaliana*. Además, los análisis de dominios indicaron que las predicciones de CpPLDs y CpLOXs poseen los dominios y los motivos característicos de estos: los dominios C2, HKDs y C terminal, en el caso de la CpPLD α 1 y la CpPLD δ (Orth *et al.*, 2010; Hong *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2006), y los dominios PLAT y LOX, en el caso de todas las CpLOXs (Rapp *et al.*, 2009; Umate, 2011).

Los análisis filogenéticos realizados empleando distintos modelos indican que las predicciones realizadas en *C. papaya* (CpPLD α 1, CpPLD δ y las distintas CpLOXs) se ubicaron en los sub-grupos correspondientes, lo que permite predecir su posible actividad enzimática. El análisis tridimensional de las proteínas conocidas en *A. thaliana* (AtPLD α 1,

AtPLD δ y las distintas AtLOXs) indica que estas presentan estructuras muy similares a las predicciones realizadas en *C. papaya* (CpPLD α 1, CpPLD δ y las distintas CpLOXs). Se observó la presencia y disposición espacial común de los dominios característicos de cada tipo de proteína.

Una vez recabada la evidencia anterior (los elevados grados de similitud e identidad entre las predicciones y sus ortólogos en *A. thaliana*, la presencia de los dominios y motivos característicos en las predicciones y el elevado parecido entre las estructuras tridimensionales de las predicciones con sus ortólogos en *A. thaliana*) se diseñaron los primers específicos de las predicciones de genes CpPLDs y CpLOXs.

2.5 CONCLUSIÓN

Los análisis *in silico* de las predicciones de genes y proteínas de los tipos fosfolipasa D (CpPLD α 1 y CpPLD δ) y lipoxigenasa (8 CpLOXs) en *C. papaya* obtenidas indicaron que estas poseen todos los rasgos generales característicos (dominios, estructura, etc.) de las proteínas PLDs y LOXs, respectivamente. Los análisis filogenéticos, en los cuales se emplearon las secuencias de aminoácidos de las CpPLDs y CpLOXs putativas y de proteínas ortólogas funcionales conocidas en otras especies de plantas, señalan que las predicciones de las diferentes proteínas CpPLDs y CpLOXs también poseen características específicas de los diferentes tipos de PLDs y LOXs conocidos, respectivamente. Sin embargo, la existencia de los genes codificantes, su expresión diferencial y la funcionalidad de cada proteína CpPLD o CpLOX con respecto al mecanismo de respuesta a daño mecánico en frutos de *C. papaya* cultivar Maradol con distintas etapas de maduración aún debe ser corroborado.

2.6 REFERENCIAS

- Bannenberg, G., Martínez, M., Hamberg, Mats y Castresana, C. (2009). Diversity of the enzymatic activity in the lipoxygenase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Lipids*, 44, 85-95.
- Bell, E., Crellman, R. y Mullet, J. (1995). A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92(19), 8675-8679.
- Chauvin, A., Caldelari, D., Wolfender, J. y Farmer, E. (2012). Four 13-lipoxygenases contribute to rapid jasmonate synthesis in wounded *Arabidopsis thaliana* leaves: a role for lipoxygenase 6 in responses to long-distance wound signals. *New Phytologist*, 197, 566-575.
- Creelman, R., Tierney, M. y Mullet, J. (1992). Jasmonic Acid/Methyl Jasmonate Accumulate in Wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89(11), 4938-4941.
- Guo, B., Xu, G., Cao, Y., Holbrook, K. y Lynch, R. (2006). Identification and characterization of phospholipase D and its association with drought susceptibilities in peanut (*Arachis hypogaea*). *Planta*, 223(3), 12-20.
- Hong, Y., Zhang, W. y Wang, X. (2010). Phospholipase D and phosphatidic acid signaling in plant response drought and salinity. *Plant Cell Env.*, 33, 627-635.
- Lyons, E., Pedersen, B., Kane, J. y Feeling, M. (2008). The value of nonmodel genomes and an example using snymap with COGE to dissect the hexaploidy that predates the rosids. *Top Plant Biol*, 1(3-4), 181-190.
- Muller, W. (2009). *Bioquímica: fundamentos para la medicina y ciencias de la vida*. Reverte, Barcelona. 333-334 pp.
- Oliva, R. y Vidal, J. (2006). *Genoma humano: nuevos avances en investigación, diagnóstico y tratamiento*. Edicions Universitat Barcelona, Barcelona. 53 p.

Orth, E., Brandao, T., Souza, B., Pliego, J., Vaz, B., Eberlin, M., Kirby, A. y Nome, F. (2010). Intramolecular catalysis of phosphodiester hydrolysis by two imidazoles. *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 8513-8523.

Pierce, B. (2010). *Genética: un enfoque conceptual*. 3ª edición. Ed. Médica Panamericana. 723 p.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Strecher, G., Nei, M. y Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28(10), 2731-2739.

Voet, D. y Voet, J. (2006). *Bioquímica*. 3ª edición. Ed. Médica Panamericana, Argentina. 200 p.

Rapp, J., Xu, S., Sharp, A., Griffith, W., Kim, Y. y Funk, M. (2009). EPR spectroscopy and electrospray ionization mass spectrometry reveal distinctive features of the iron site in leukocyte 12-lipoxygenase. *Arch Biochem Biophys*, 490(1), 50-56.

Steczko J., Donoho G.P., Clemens J.C., Dixon J.E. y Axelrod B. (1992). Conserved histidine residues in soybean lipoxygenase: functional consequences of their replacement. *Biochemistry*, 31, 4053-4057.

Umate, P. (2011). Genome-wide analysis of lipoxygenase gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Signaling & Behavior*, 6(3), 335-338.

Voet, D., Voet, J. y Pratt, C. (2007). *Fundamentos de bioquímica. La vida a nivel molecular*. 2ª edición. Ed. Médica Panamericana. 122 p.

Wang, X. (2000). Multiple forms of PLD in plant: the gene family catalytic and regulatory properties, and cellular functions. *Progress in Lipid Research*, 39(2), 109-149.

Yang, S., Kim, S. y Kim, W. (2004). Perturbation of NgTRF1 expression induces apoptosis-like cell death in tobacco BY-2 cells and implicates NgTRF1 in the control of telomere length and stability. *Plant Cell*, 16 (12), 3370-3385.

Zien, C., Wang, C., Wang, X. y Welti, R. (2001). In vivo substrates and the contribution of the common phospholipase D, PLDalpha, to wound induced metabolism of lipids in *Arabidopsis*. *Biochim Biophys Acta*, 1530(2-3), 236-248.

CAPÍTULO III. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LOS GENES *PLDs* Y *LOXs* EN FRUTOS DE *C. papaya* SOMETIDOS A DAÑO MECÁNICO

3.1 INTRODUCCIÓN

La mayoría de las diferentes células especializadas en los organismos multicelulares son capaces de alterar sus patrones de expresión génica en respuesta a señales extracelulares respondiendo a menudo de una manera distinta a la misma señal extracelular. Estos patrones de expresión génica le dan a cada célula sus características distintivas (Alberts *et al.*, 2006).

La capacidad de amplificación exponencial de mínimas cantidades de material genético hace de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) una herramienta clave para la búsqueda de la expresión diferencial de genes empleando muestras de ADNc. Este último se sintetiza a partir de pequeñas cantidades de ARNm generado por el mecanismo de respuesta a un estrés externo en el tejido de estudio (Zavala, 2005).

Durante el proceso de maduración de los frutos se presentan cambios físico-químicos que modifican el color, sabor y textura de los frutos. Algunos de estos cambios son: pérdida de clorofila, síntesis de nuevos pigmentos, degradación del almidón y ácidos orgánicos en azúcares, hidrólisis de pectinas, pérdida de la rigidez celular, ablandamiento de los tejidos, aumento considerable de la síntesis de etileno y emisión de CO₂ (Aranceta *et al.*, 2006; Purves, 2009). En frutos climatéricos el etileno estimula la expresión de diversos genes durante el proceso autocatalítico de la producción de etileno y el incremento de la respiración (Agustí, 2010).

Al ser un fruto climatérico, es probable que durante la maduración de los frutos de *C. papaya* el patrón de expresión de un mismo gen pueda variar de acuerdo al estado de maduración. Por tanto, en este estudio se llevó a cabo el análisis de la expresión diferencial de los genes *CpPLDs* y *CpLOXs* en frutos de *C. papaya* sometidos a estrés por daño mecánico en diferentes etapas de maduración para verificar si existe alguna variación de la expresión de estos genes.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron dos lotes de frutos de papaya cultivar Maradol de distintas etapas de maduración: frutos verdes (inmaduros) y frutos naranjas (maduros). Los frutos fueron comprados en la central de abastos llamada "La Casa del Pueblo" de la ciudad de Mérida, Yucatán. Previamente se le indico al proveedor que los frutos solicitados debieron haber sido cosechados 1 día antes de la venta y que no se les aplicará ningún conservador o alguna sustancia que pudiera afectar la velocidad de maduración de los frutos. Una vez en laboratorio, se lavaron y desinfectaron todos los frutos empleado una solución de hipoclorito de sodio al 2% y se seleccionaron aquellos frutos que no presentaran laceraciones o características visuales que indicaran la infección de hongos. Como criterio de selección de muestras se empleó la metodología colorimétrica desarrollada por Santamaría *et al.* (2009). Se realizaron mediciones en los frutos empleando un colorímetro Minolta CR-200 calibrado en la escala de Cielab (Valero, 2011) la cual consiste en tres parámetros:

L*: luminosidad (valores cercanos a 0 indican mayor intensidad del color negro y valores cercanos a 100 indican mayor intensidad del color blanco).

a*: posición entre rojo y verde (valores negativos indican mayor intensidad del color verde y valores positivos indican mayor intensidad del color rojo).

b*: posición entre amarillo y azul (b*, valores negativos indican mayor intensidad del color azul y valores positivos indican mayor intensidad del color amarillo).

Se seleccionaron al menos nueve frutos de ambas etapas los cuales presentaron lecturas que estuvieran incluidas en los intervalos de los parámetros de las etapas correspondientes para frutos verdes (L*: 43-48, a*: -18 - -19, b*: 30-37.5) y para frutos naranjas (L*: 56-58, a*: 6-15, b*: 49-52). Se realizaron mediciones por triplicado en el cáliz, ápice y zona media de los lados opuestos de cada fruto. Una vez que se obtuvieron todas las lecturas de las secciones de cada fruto se realizó un promedio representativo de cada fruto. Los frutos que presentaron lecturas de color incluidas en los parámetros de su etapa correspondiente fueron agrupados en dos lotes: uno de frutos inmaduros y otros de frutos maduros.

A ambos lotes de frutos se les aplicaron dos distintos tratamientos de daño mecánico: uno que consistió en cortes profundos y continuos en toda la superficie del fruto y el otro se realizó aplicando leves goles en toda la superficie del fruto.

Una vez aplicado el tratamiento se procedió de inmediato a realizar la extracción de ARN total de 250 mg de tejido de cáscara de cada fruto empleando la metodología del reactivo Trizol de Invitrogen (Xue-Yong *et al.*, 2012). Se realizó la verificación de la calidad del ARN total observando la presencia de las bandas de las unidades ribosomales 28S y 18S. Posteriormente se procedió a realizar la síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir de 1 µg de ARN total empleando el kit Smart™ cDNA Library Construction marca Clontech. Se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1% de para verificar la calidad del ADNc de las muestras y también se midieron sus concentraciones.

Posteriormente se realizó la estandarización del gen 18S ribosomal (de aproximadamente 100 pb) el cual sirvió como control para normalizar las cantidades de ADNc necesario para observar el patrón de expresión diferencial. Una vez realizada la estandarización del ADNc se llevaron a cabo PCRs semicuantitativas empleando los primers diseñados para las CpPLDs y CpLOXs. También se verificó el patrón de expresión del gen *CpNAC02* (gen ortólogo a un *AtNAC* involucrado en diferentes condiciones de estrés (Lu *et al.*, 2007)) del cual se tienen antecedentes de aumentar su expresión en diferentes tejidos de *C. papaya* ante distintos tipos de estrés abiótico.

Las PCRs semicuantitativas de los genes CpPLDs y CpLOXs fueron realizadas empleando la técnica de Touch-Down (debido a la baja especificidad que presentaban los primers en condiciones de PCR estándar) de acuerdo al siguiente procedimiento:

Cuadro 8. Condiciones de PCR empleadas.

Etapa	Número de ciclos	Condiciones
Desnaturalización inicial	1	94 °C por 5 min
Aumento de la especificidad de los primers	10	94°C por 30 segundos 5 °C por encima de la T _m de los primers (con una disminución gradual de 0.5 °C por ciclo) por 30 segundos 72°C por 2 minutos
Síntesis de amplicones	30	94°C por 30 segundos 5 °C por debajo de la T _m de los primers por 30 segundos 72°C por 2 minutos
Elongación de amplicones incompletos	1	72°C por 10 minutos
Finalización de la reacción	1	4 °C

La técnica de PCR con touchdown es empleada cuando es necesario mejorar la especificidad de la reacción. Por ejemplo, la técnica de PCR con touchdown es empleada para poder amplificar marcadores moleculares en plantas de pistache (*Pistacia vera L*) que permiten diferenciar los sexos de las plantas (Yakubov *et al.*, 2005). Esta técnica también se ha empleado para distinguir distintas variedades de White Kwao Krua (*Pueraria candollei Grah. var. mirifica*) (Bunmanop *et al.*, 2011) y de maíz (Oliveira *et al.*, 2010) por medio de la amplificación de marcadores moleculares.

Aquellos genes que respondieron a los tratamientos de daño mecánico fueron aislados y ligados al vector de clonación pGEM T-Easy de Promega. Una vez realizada la ligación con el vector, la construcción fué introducida en células competentes de la marca Promega. Las células se cultivaron en placas de medio LB (bactotripton: 1g/L, extracto de levadura: 0.5 g/L, NaCl: 1g/L y ampicilina 100 mg/L). Se aislaron clonas positivas (colonias blancas) y estas fueron cultivadas en medios líquido selectivo LB. Se verificó la presencia de los genes insertados por medio de PCRs de 1 µL de cada medio. Una vez que se realizó la verificación de las clonas positivas a estas se les extrajeron los plásmidos con los genes de interés para su posterior secuenciaron empleando los servicios del Cinvestav Unidad Irapuato. Una vez obtenidas las secuencias de los extremos terminales de los genes positivos se realizaron alineamientos entre estas y las secuencias nucleotídicas de las predicciones de estos genes en *C. papaya*.

Para medir el efecto fisiológico producido por los tratamientos de daño mecánico en los frutos, se realizaron dos diferentes pruebas bioquímicas: determinación del contenido de H_2O_2 y determinación del grado de peroxidación lipídica. Ambas mediciones son consideradas como indicadores del grado de estrés oxidativo producido por daño mecánico en distintos tejidos de plantas (Bailey *et al.*, 1996; Low y Merida, 1996; Desikan *et al.*, 2001; Hernández *et al.*, 2001). Las pruebas bioquímicas de los frutos de papaya se realizaron por triplicado en cáscaras de frutos inmaduros y maduros de papaya sometidas a daño mecánico por corte y golpe. Cada metodología se realizó tal como se indica a continuación:

Determinación del índice de peroxidación lipídica.- Se maceró 0.12 g de cáscara de papaya con 1 mL de TCA al 0.1%. El macerado se centrifugó a 10000 x g por 20 minutos a 4 °C. Se tomaron 0.5 mL del sobrenadante y se adicionaron a 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.5% en ácido tricloroacético (TCA) al 20% en tubos con tapa. Se incubó la muestra a 95°C por 30 minutos y se enfrió en un baño de hielo. Las muestras se centrifugaron a 12000 x g por 5 minutos y se realizó la lectura de absorbancia de la muestra a 532 nm y 600 nm. La absorbancia a 600 nm se restó de la absorbancia a 532 nm y la concentración del complejo malondialdehído-ácido tiobarbitúrico (MDA-TBA) se calculó por medio de la ley de Lambert-Beer empleando el coeficiente de extinción molar del complejo MDA-TBA ($155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Los resultados se reportaron en unidades de nmoles del complejo MDA-TBA por gramo de peso fresco de cáscara (Modificado de Heath y Parker, 1968; Velikova *et al.*, 2000).

Para la determinación del contenido de H_2O_2 .- Se maceró 1.2 g de cáscara de papaya con nitrógeno líquido y posteriormente el macerado se diluyó con 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 0.1%. El homogenado se centrifugó a 12000 rpm por 20 minutos. Se tomaron 0.3 mL del sobrenadante y se añadieron a 0.3 mL de buffer de fosfato de potasio 10 mM (pH 7) y 0.6 mL de KI 1 M. Posteriormente se midió la absorbancia de la solución a 390 nm empleando como blanco TCA al 0.1%. El contenido de H_2O_2 se cuantificó empleando una curva de estándares de H_2O_2 elaborados a partir de una solución comercial de peróxido de hidrógeno al 3% p/v. Para calcular con exactitud la concentración de la solución comercial de peróxido de hidrógeno se tomaron 500 μL de una dilución 1/1000 de peróxido de hidrógeno comercial y se mezclaron con 500 μL de TCA al 0.2%. Se tomaron 0.3 mL de la solución anterior y se añadieron a 0.3 mL de buffer de fosfato de potasio 10

mM (pH 7) y 0.6 mL de KI 1 M. Posteriormente se midió la absorbancia a 390 nm y utilizando el coeficiente de extinción molar del H₂O₂ a esa longitud de onda (0.28 μM⁻¹ x cm⁻¹). Se determinó la concentración de la muestra original considerando las diluciones realizadas. Los resultados se reportaron en unidades de μmoles de H₂O₂ por gramo de peso fresco de cáscara (Modificado de Sergiev *et al.*, 1997; Velikova *et al.*, 2000).

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas se realizó por medio del programa Statgraphics desarrollado por StatPoint Technologies. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) simple y el método de diferencia mínima significativa (LSD) para revisar si existían diferencias significativas entre los tratamientos aplicados a los frutos de papaya.

3.3 RESULTADOS

Se seleccionaron frutos inmaduros y maduros los cuales no presentaban laceraciones a simple vista. Se realizaron mediciones colorimétricas de cada fruto y posteriormente se obtuvieron los valores promedio de los parámetros L^* , a^* y b^* de cada fruto (ver Cuadro 9).

Cuadro 9. Valores promedio de los parámetros colorimétricos cuantificados en los frutos maduros (A) e inmaduros (B) de *C. papaya*. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

A				B			
Parámetro	Tratamiento			Parámetro	Tratamiento		
	Control	Corte	Golpe		Control	Corte	Golpe
L^*	54.31	56.34	57.88	L^*	45.43	42.70	44.04
a^*	15.32	14.32	16.03	a^*	-14.04	-10.16	-11.90
b^*	46.68	48.89	51.45	b^*	30.94	29.53	32.53

Posteriormente se realizaron los tratamientos de daño mecánico por corte y golpe en los frutos seleccionados (ver Figura 26).

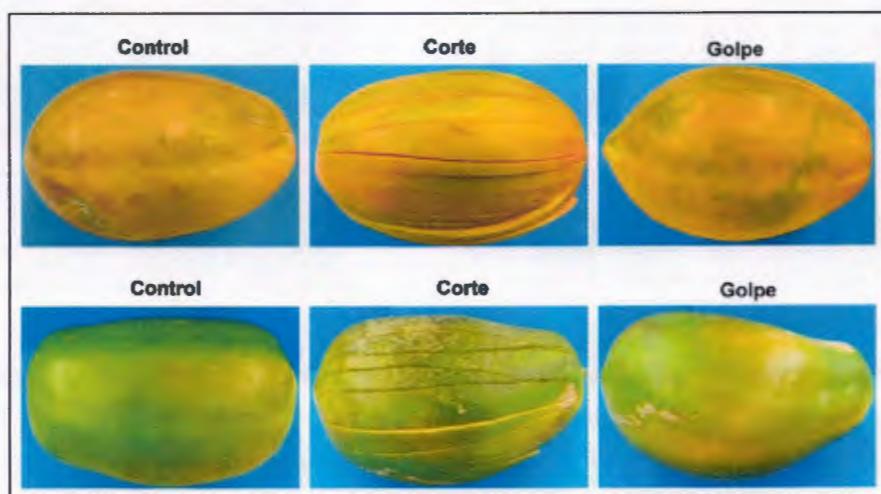


Figura 26. Frutos maduros e inmaduros de *C. papaya* sometidos al tratamiento de daño mecánico (corte y golpe).

Posteriormente se realizó la extracción de ARN total (Xue-Yong *et al.*, 2012) y la síntesis de ADNc empleando el kit SmartTM cDNA Library Construction marca Clontech (ver Figuras 27a y 27b). Una vez obtenidos las muestras de ADNcs se llevó a cabo la normalización de las muestras con el gen de la unidad 18S ribosomal de *C. papaya*. Posteriormente se llevaron a cabo PCRs semicuantitativas de los genes *CpNac02*, *CpPLDs* y *CpLOXs* empleando los volúmenes de muestras de ADNc normalizados anteriormente. En la Figura 28 se muestran los perfiles de expresión de los genes analizados. Puede observarse que los genes *CpLox3* y *CpPLD α 1* presentaron expresión diferencial ante el daño mecánico aplicado.

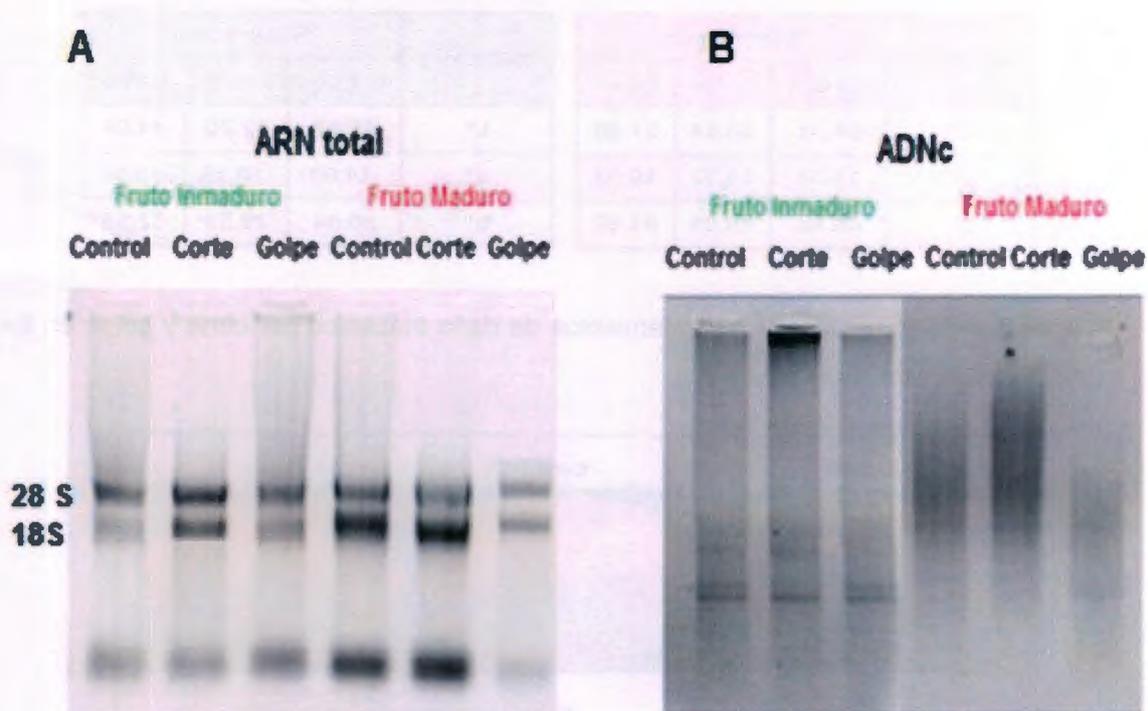


Figura 27. ARN total extraído de los frutos de papaya sometidos a daño mecánico (A) y ADNc sintetizado a partir de las muestras de ARN total (B).

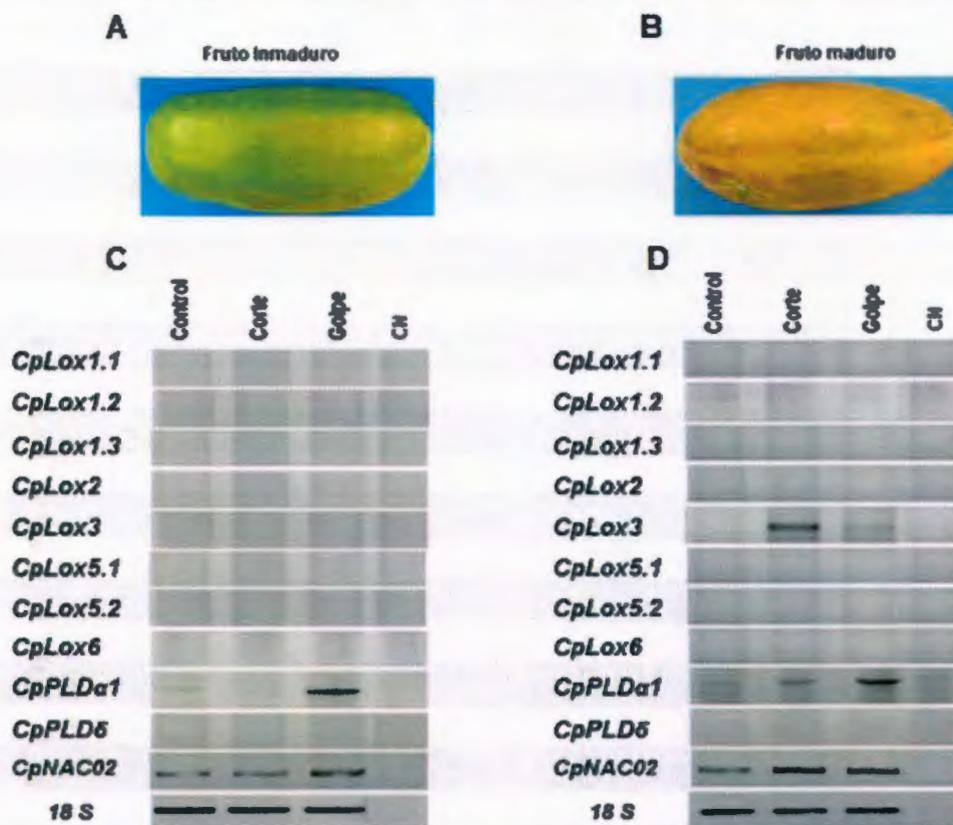


Figura 28. Expresión diferencial de los genes *CpPLDs* y *CpLOXs* en frutos de papaya sometidos a daño mecánico. A) fruto inmaduro de papaya, B) fruto maduro de papaya, C y D) expresión diferencial de los genes *CpPLDs* y *CpLOXs*.

Una vez identificados los genes que presentaron expresión diferencial ante el daño mecánico aplicado en los frutos (la *CpPLDα1* y la *CpLOX3*), se procedió a realizar su aislamiento, amplificación y posterior secuenciación. Una vez obtenidas las secuencias nucleotídicas se realizaron alineamientos de estas secuencias con las predicciones obtenidas previamente para observar el grado de similitud entre las secuencias (ver Figuras 29 y 30). Posteriormente las secuencias nucleotídicas obtenidas de ambos genes fueron traducidas empleando la herramienta Translate tool de ExPasy con las cuales se realizaron alineamientos de las secuencias de aminoácidos de las predicciones anteriores y de las secuencias de aminoácidos obtenidas (ver Figuras 31 y 32).

CpPLDa1P 1 ATGGCGCATTATTTGATGCATGGCACTTTACATGCCACGGTGTATGAGGTCGATAAACTA
CpPLDa1S 1 ATGGCGCATTATTTGATGCATGGCACTTTACATGCCACGGTGTATGAGGTCGATAAACTA

CpPLDa1P 61 CATTCCGGTGGCATATCAGGCTTCTTTGGCAAGATCCTGGCAAATGTTGAGGGAACAATT
CpPLDa1S 61 CATTCCGGTGGCATATCAGGCTTCTTTGGCAAGATCCTGGCAAATGTTGAGGGAACAATT

CpPLDa1P 121 GGTATTGGCAAAGGAGTAACCCAGCTCTATGCTACCATTGATCTAGAAAGGGCTAGAGTT
CpPLDa1S 121 GGTATTGGCAAAGGAGTAACCCAGCTCTATGCTACCATTGATCTAGAAAGGGCTAGAGTT

CpPLDa1P 181 GGAAGGACCAGAATAATAAAGATGAACCCAATAATCCTAAATGGTATGAATCATTTTCAT
CpPLDa1S 181 GGAAGGACCAGAATAATAAAGATGAACCCAATAATCCTAAATGGTATGAATCATTTTCAT

CpPLDa1P 241 ATCTACTGTGCCCATATGGCTTCCAATGTTGTATTCACTGTTAAAGATGACAATCCTATT
CpPLDa1S 241 ATCTACTGTGCCCATATGGCTTCCAATGTTGTATTCACTGTTAAAGATGACAATCCTATT

CpPLDa1P 301 GGAGCCACTTTAATTGGAAGAGCATATGTACCTGTTGAAGAAGTATCGTGGTGATCAA
CpPLDa1S 301 GGAGCCACTTTAATTGGAAGAGCATATGTACCTGTTGAAGAAGTATCGTGGTGATCAA

CpPLDa1P 361 GTGGATAGGTGGGTTGAAATCTTGGATGAAGACAAAAACCCATTGAGGGAGATTCCAAG
CpPLDa1S 361 GTGGATAGGTGGGTTGAAATCTTGGATGAAGACAAAAACCCATTGAGGGAGATTCCAAG

CpPLDa1P 421 ATCCATGTGAAGCTTCAATTTTTGATGTAAAAAAGACAGTAATTGGAATATGGGTATC
CpPLDa1S 421 ATCCATGTGAAGCTTCAATTTTTGATGTAAAAAAGACAGTAATTGGAATATGGGTATC

CpPLDa1P 481 AAGGGTGTAGGTATCTTGGTGTGCCTTACACGTTCTACTCACAGAGACGAGGATGTAGA
CpPLDa1S 481 AAGGGTGTAGGTATCTTGGTGTGCCTTACACGTTCTACTCACAGAGACGAGGATGTAGA

CpPLDa1P 541 GTTTCTTTATACCAAGATGCTCATGTTCCGGACGGCTTCATTCCCTAAAATTCCTTAGCA
CpPLDa1S 541 GTTTCTTTATACCAAGATGCTCATGTTCCGGACGGCTTCATTCCCTAAAATTCCTTAGCA

CpPLDa1P 601 GGAGGAAGTATTATGAGCCTCATAGATGCTGGGAAGATGTTTTGATGCAATCACCAAT
CpPLDa1S 601 GGAGGAAGTATTATGAGCCTCATAGATGCTGGGAAGATGTTTTGATGCAATCACCAAT

CpPLDa1P 661 GCGAGACACCTGATCTACATTACTGGCTGGTCAGTTTATACTGAAATCACTTTGATACGT
CpPLDa1S 661 GCGAGACACCTGATCTACATTACTGGCTGGTCAGTTTATACTGAAATCACTTTGATACGT

CpPLDa1P 721 GACTCAAGGAGGCCAAAGCCAGGAGGAGATGTTACTCTTGGTGAGCTACTTAAGCAGAAG
CpPLDa1S 721 GACTCAAGGAGGCCAAAGCCAGGAGGAGATGTTACTCTTGGTGAGCTACTTAAGCAGAAG

CpPLDa1P 781 GCTAGTGAAGGTGTTAAGGTTCTCATGCTTGTTTGGGATGACAGAACCTCTGTGGTTTA
CpPLDa1S 781 GCTAGTGAAGGTGTTAAGGTTCTCATGCTTGTTTGGGATGACAGAACCTCTGTGGTTTA

CpPLDa1P 841 CTGAAAAAGGATGGACTCATGGCTACGCATGATGAAGAACTGCAAACACTTCCAAGAT
CpPLDa1S 841 CTGAAAAAGGATGGACTCATGGCTACGCATGATGAAGAACTGCAAACACTTCCAAGAT

CpPLDa1P 901 ACTGATGTTCACTGTGTCTCTATGCCCGGTAATCCTGATGATGGGGGGAGCTTCGTTCAA
CpPLDa1S 901 ACTGATGTTCACTGTGTCTCTATGCCCGGTAATCCTGATGATGGGGGGAGCTTCGTTCAA

CpPLDa1P 961 GGCTTACAAATCTCTACCATGTTCACTCATACCAGAAGATTGTGGTGGTTCGATGGTGAG
CpPLDa1S 961 GGCTTACAAATCTCTACCATGTTCACTCATACCAGAAGATTGTGGTGGTTCGATGGTGAG

CpPLDa1P 1021 ATGCCTAGTGGGGAATCCCAGATGAGGAGAATTGTTAGTTTTGTTGGGGGCATTGATCTT
CpPLDa1S 1021 ATGCCTAGTGGGGAATCCCAGATGAGGAGAATTGTTAGTTTTGTTGGGGGCATTGATCTT

CpPLDa1P 1081 TGTGATGGTAGATATGATACCCCTTCCATTCTCTATT CAGGACATTGGATACTGCACAC
CpPLDa1S 1081 TGTGATGGTAGATATGATACCCCTTCCATTCTCTATT CAGGACATTGGATACTGCACAC

CpPLDa1P 1141 CACGATGATTTCCATCAGCCAAACTTTGCAGGTAGTTCTATCACAAAAGGTGGCCCCAGG
CpPLDa1S 1141 CATGATGATTTCCATCAGCCAAACTTTGCAGGTAGTTCTATCACAAAAGGTGGCCCCAGG

CpPLDa1P 1201 GAACCTTGGCATGATATCCATTCTCGATTGGAAGGTCCCCTTGCCTGGGATGTGCTGTTT
CpPLDa1S 1201 GAACCTTGGCATGATATCCATTCTCGATTGGAAGGTCCCCTTGCCTGGGATGTGCTGTTT

CpPLDa1P 1261 AATTTTGAGCAAAGATGGAGACAACAAGGTGGGAAGGATGTTCTGGTTAATCTGAGAGAG
CpPLDa1S 1261 AATTTTGAGCAAAGATGGAGACAACAAGGTGGGAAGGATGTTCTGGTTAATCTGAGAGAG

CpPLDa1P 1321 CTGATAATATTATTATTTCCCCCATCTCCTGTTATGTTTCCAGATGATCATGAGACATGG
CpPLDa1S 1321 CTGATAATATTATTATTTCCCCCATCTCCTGTTATGTTTCCAGATGATCATGAGACATGG

CpPLDa1P 1381 AATGTCCAGTTGTTTAGATCCATTGATGGTGGTGCTGCTTTTGGTTTTCTGAGACACCC
CpPLDa1S 1381 AATGTCCAGTTGTTTAGATCCATTGATGGTGGTGCTGCTTTTGGTTTTCTGAGACACCC

CpPLDa1P 1441 GAAGAGGCTGCCAGAGCTGGGCTTGTAAAGTGGGAAGGATAATATCATTGATCGAAGCATT
CpPLDa1S 1441 GAAGAGGCTGCCAGAGCTGGGCTTGTAAAGTGGGAAGGATAATATCATTGATCGAAGCATT

CpPLDa1P 1501 CAGGATGCTTATATTAATGCTATTTCGAAGAGCAAAAAATTTTATATATATGAAAAATCAG
CpPLDa1S 1501 CAGGATGCTTATATTAATGCTATTTCGAAGAGCAAAAAATTTTATATATATGAAAAATCAG

CpPLDa1P 1561 TATTTCTCGGAAGCTCTTTTACTGGAGTTCTGATGATATCAAGCGTGAGGATATTAAT
CpPLDa1S 1560 TATTTCTCGGAAGCTCTTTTACTGGAGTTCTGATGATATCAAGCGTGAGGATATTAAT

CpPLDa1P 1621 GCTTTACATCTTATACCAAAGGAGCTTTCACACTCAAGATTGTTAGTAAGATTGAACGTGGG
CpPLDa1S 1620 GCTTTACATCTTATACCAAAGGAGCTTTCACACTCAAGATTGTTAGTAAGATTGAACGTGGG

CpPLDa1P 1681 GAGAGATTCACCTGTTTATGTTGTTGTTTCCTATGTGGCCAGAAGGGGTACCGGAGAGTGCA
CpPLDa1S 1680 GAGAGATTCACCTGTTTATGTTGTTGTTTCCTATGTGGCCAGAAGGGGTACCGGAGAGTGCA

CpPLDa1P 1741 TCTGTT CAGGCAATATTAGATTGGCAGAGAAGGACAATGGAAATGATGTATAAAGACATC
CpPLDa1S 1740 TCTGTT CAGGCAATATTAGATTGGCAGAGAAGGACAATGGAAATGATGTATAAAGACATC

CpPLDa1P 1801 ATTCAAGCTCTGAGAGCTAAAGACCGTGAAGAGGATCCTAGAAACTATTTGACTTTTTTC
CpPLDa1S 1800 ATTCAAGCTCTGAGAGCTAAAGACCGTGAAGAGGATCCTAGAAACTATTTGACTTTTTTC

CpPLDa1P 1861 TGCCTTGGAAACC GGGAAGTGAAGAAATCTGGAGAATATGAACCTTCAGAGAGACCAGAG
CpPLDa1S 1860 TGCCTTGGAAACC GGGAAGTGAAGAAATCTGGAGAATATGAACCTTCAGAGAGACCAGAG

CpPLDa1P 1921 GATGACTCCGATTATATTAGAGCAACAAGAAGCCCGTCGTTTCATGATTTATGTTTCATACC
CpPLDa1S 1920 GATGACTCCGATTATATTAGAGCAACAAGAAGCCCGTCGTTTCATGATTTATGTTTCATACC

CpPLDa1P 1981 AAGATGATGATTGTTGATGATGAATACATCATAGTTGGATCTGCCAACATCAATCAGCGA
CpPLDa1S 1980 AAGATGATGATTGTTGATGATGAATACATCATAGTTGGATCTGCCAACATCAATCAGCGA

CpPLDa1P 2041 TCAATGGATGGT GCCAGGGACTCAGAGATAGCTATGGGGCTTACCAACCATACCATTG
CpPLDa1S 2040 TCAATGGATGGT GCCAGGGACTCAGAGATAGCTATGGGGCTTACCAACCATACCATTG

CpPLDa1P 2161 CACCTTGGAAATGCTCGATGACACCTTCCTTGAGCCAGAAAACATAGAGTGTGTCCAGAAG
CpPLDa1S 2160 CACCTTGGGATGCTCGATGACACCTTCCTTGAGCCAGAAAACATAGAGTGTGTCCAGAAG

CpPLDa1P 2221 GTGAACCGAGTTGCTGGCAAATATTGGGATCTTTACGCGAGTGAGTACTTGAACATGAC
CpPLDa1S 2220 GTGAACCGAGTTGCTGGCAAATATTGGGATCTTTACGCGAGTGAGTACTTGAACATGAC

CpPLDa1P 2281 TTGCCTGGCCACTTGCTTCGCTACCCAATTGGTGTTTCTAGTGAAGGAGATGTTACAGAG
CpPLDa1S 2280 TTGCCTGGCCACTTGCTTCGCTACCCAATTGGTGTTTCTAGTGAAGGAGATGTTACAGAG

CpPLDa1P 2341 CTGCCGGGAACAGAATTCTTCCCCGACACTAAGGCTCGTGTTCTTGGTGCAAATCGGAT
CpPLDa1S 2340 CTGCCGGGAACAGAATTCTTCCCCGACACTAAGGCTCGTGTTCTTGGTGCAAATCGGAT

CpPLDa1P 2401 TACCTCCCTCCAATATTAACAACCTAA
CpPLDa1S 2400 TACCTCCCTCCAATATTAACAACCT---

Figura 29. Corroboración de las secuencias nucleotídicas de la predicción del gen *CpPLDa1* (CpPLDa1p) y del gen aislado secuenciado (CpPLDa1s).

CpLOX3p	1	ATGGCGCTGGCTAAAGAAATGATGGGTTAT TCTATGATAGAGAGATCACCATGGTTGGCA
CpLOX3s	1	ATGGCGCTGGCTAAAGAAATGATGGGTTAT TCTATGATAGAGAGATCACCATGGTTGGCA
CpLOX3p	61	TCATCGAAGAAACTCAGGTTGAAGTACAGAGATAATAGTTTGCCACAGAGGAAAACCCAG
CpLOX3s	61	TCATCGAAGAAACTCAGGTTGAAGTACAGAGATAATAGTTTGCCACAGAGGAAAACCCAG
CpLOX3p	121	CTCCGGATTAACCCGGGTT CAGTTTTTTTTGGAACACAGGAGGACGAATCCTGTCTGGTGGT
CpLOX3s	121	CTCCGGATTAACCCGGGTT CAGTTTTTTTTGGAACACAGGAGGACGAATCCTGTCTGGTGGT
CpLOX3p	181	GCAGCTTTAAGTGAAGATTTGATCAAGTCGATTGGTAGTAGTAACAGCAGTAGCGGCAGG
CpLOX3s	181	GCAGCTTTAAGTGAAGATTTGATCAAGTCGATTGGTAGTAGTAACAGCAGTAGCGGCAGG
CpLOX3p	241	GAGAATGAAAATAAGGCAGTGAAGTTC AAGGTGAGAGCTGTTATGACTGTTAGGAACAAA
CpLOX3s	241	GAGAATGAAAATAAGGCAGTGAAGTTC AAGGTGAGAGCTGTTATGACTGTTAGGAACAAA
CpLOX3p	301	AGTAAACAGGATCTTAAAGACACCATTGTC AAAACATTTGGATGCTTTCTCTGAAAAAATT
CpLOX3s	301	AGTAAACAGGATCTTAAAGACACCATTGTC AAAACATTTGGATGCTTTCTCTGAAAAAATT
CpLOX3p	361	GGGAGAAATGTGGTGTGGAACTTATCAGCAGCACTGAAATTGACCCAAGAACCAAAGAG
CpLOX3s	361	GGGAGAAATGTGGTGTGGAACTTATCAGCAGCACTGAAATTGACCCAAGAACCAAAGAG
CpLOX3p	421	GCAAAGAAGAGCAATCAGGCTGTAATCAAGGAT TGGTACAAGAAATCAAATGTGAAAGCT
CpLOX3s	421	GCAAAGAAGAGCAATCAGGCTGTAATCAAGGAT TGGTACAAGAAATCAAATGTGAAAGCT
CpLOX3p	481	GAGAGAGTTCATTACACAACCTGAGTTATTAGTGGATTCTAACTTTGGGGAAGCAGGAGCA
CpLOX3s	481	GAGAGAGTTCATTACACAACCTGAGTTATTAGTGGATTCTAACTTTGGGGAAGCAGGAGCA
CpLOX3p	541	ATTACAGTCATCAACAAGCATCAGAATGAGTTC TTTCTGGAAAGTATCAACATTGAAGGA
CpLOX3s	541	ATTACAGTCATCAACAAGCATCAGAATGAGTTC TTTCTGGAAAGTATCAACATTGAAGGA
CpLOX3p	601	TTTGCTTCTGGTCCACTCCATT TCCCCTGCAACTCTTGGGTTCAACCAGTCAAGCACCAT
CpLOX3s	601	TTTGCTTCTGGTCCACTCCATT TCCCCTGCAACTCTTGGGTTCAACCAGTCAAGCACCAT
CpLOX3p	661	TCATCCCCTAGAATTTTCTTCTCTAACAAGCCATATTTGCCAAGTGACACACCTGTTGGA
CpLOX3s	661	TCATCCCCTAGAATTTTCTTCTCTAACAAGCCATATTTGCCAAGTGACACACCTGTTGGA
CpLOX3p	721	CTGAAAGCATTAAAGAGAGAAAGA AACTAAAGGATCTGAGAGGTGATGGGAAAGGAGTTAGA
CpLOX3s	714	CTGAAAGCATTAAAGAGAGAAAGA AACTAAAGGATCTGAGAGGTGATGGGAAAGGAGTTAGA
CpLOX3p	781	AATTTATCAGACCGGGTTTACGACTTTGATGTGTATAATGATCTGGGAAATCCAGACAAG
CpLOX3s	774	AATTTATCAGACCGGGTTTACGACTTTGATGTGTATAATGATCTGGGAAATCCAGACAAG
CpLOX3p	841	GGTTCTGATTTTGGCTCGCCCTGTTCTTGGCCGCAAATTC CCTACCCAAGACGGTGTCTGT
CpLOX3s	834	GGTTCTGATTTTGGCTCGCCCTGTTCTTGGCCGCAAATTC CCTACCCAAGACGGTGTCTGT
CpLOX3p	901	ACTGGCCGTCCCCCTACTGATACAGATATGCATGTGGAGAGCCGGGTGGAGAAGCCATTG
CpLOX3s	894	ACTGGCCGTCCCCCTACTGATACAGATATGCATGTGGAGAGCCGGGTGGAGAAGCCATTG
CpLOX3p	961	CCGGTGACGTGCCAAGAGATGAACAATTTGAGGAGAGTAAACAAGATACTTTCTCTGCT
CpLOX3s	954	CCGGTGACGTGCCAAGAGATGAACAATTTGAGGAGAGTAAACAAGATACTTTCTCTGCT
CpLOX3p	1021	GGGAGGTTGAAGGCGGTACTACACAACCTTGATACCATCGTTGAAGGCCACCATTCTGCT
CpLOX3s	1014	GGGAGGTTGAAGGCGGTACTACACAACCTTGATACCATCGTTGAAGGCCACCATTCTGCT

CpLOX3p 1081 GATAATCATGATTTTAAAGCCTCTCCGACATTGATAATCTTTACAGAGAAGGTCTTCTT
 CpLOX3s 1074 GATAATCATGATTTTAAAGCCTCTCCGACATTGATAATCTTTACAGAGAAGGTCTTCTT

CpLOX3p 1141 CTCAAGATAGGTTTACAGGATGAACTCATCAAGAAACTACCATTGCCTACTGTTGTTAAC
 CpLOX3s 1134 CTCAAGATAGGTTTACAGGATGAACTCATCAAGAAACTACCATTGCCTACTGTTGTTAAC

CpLOX3p 1201 ACTATTCAAGAATCCAGCCAGAGATTACTCAAATATAATACACCCAAGATTGTTTCAAAG
 CpLOX3s 1194 ACTATTCAAGAATCCAGCCAGAGATTACTCAAATATAATACACCCAAGATTGTTTCAAAG

CpLOX3p 1261 GACAAGTTTGCTTGGTTGCGGGATGATGAATTTGCACGGCAGACTATGGCAGGGATAAAT
 CpLOX3s 1254 GACAAGTTTGCTTGGTTGCGGGATGATGAATTTGCACGGCAGACTATGGCAGGGATAAAT

CpLOX3p 1321 CCAGTCAGCATTGAGAGGCTTAGGGTTTTCCCCCAGTTAGCAATCTTGACCCTCAAATC
 CpLOX3s 1314 CCAGTCAGCATTGAGAGGCTTAGGGTTTTCCCCCAGTTAGCAATCTTGACCCTCAAATC

CpLOX3p 1381 TACGGTTCACAACCATCCGCCCTTCAAGAACATCACATCGCTCCTCATCTCCATTGCATG
 CpLOX3s 1374 TACGGTTCACAACCATCCGCCCTTCAAGAACATCACATCGCTCCTCATCTCCATTGCATG

CpLOX3p 1441 ACCGTACAACAGGCTTTGGAGGAGAAAAAGCTATACATAATGGATTACCATGACGTATAC
 CpLOX3s 1434 ACCGTACAACAGGCTTTGGAGGAGAAAAAGCTATACATAATGGATTACCATGACGTATAC

CpLOX3p 1501 TTACCATTTCTAGATCGGATTAATGCCTTGGACGGCCGAAAGCCTATGCCACTCGGACC
 CpLOX3s 1494 TTACCATTTCTAGATCGGATTAATGCCTTGGACGGCCGAAAGCCTATGCCACTCGGACC

CpLOX3p 1561 ATTTTCTTCTTGACTCCTCAAGGCTGTCTCAAGCCTATAGCCATTGAGCTTAGCCTCCCG
 CpLOX3s 1554 ATTTTCTTCTTGACTCCTCAAGGCTGTCTCAAGCCTATAGCCATTGAGCTTAGCCTCCCG

CpLOX3p 1621 CACACCGGACCAACTTCTCGGCAGAAGCGCGTTGTCACGCCGCCCGTAGACGCCACTAGC
 CpLOX3s 1614 CACACCGGACCAACTTCTCGGCAGAAGCGCGTTGTCACGCCGCCCGTAGACGCCACTAGC

CpLOX3p 1681 AATTGGGTTTGGCAACTCGCCAAAGCTCATGTCTGTGCCAACGACGCTGGTGTCCACCAG
 CpLOX3s 1674 AATTGGGTTTGGCAACTCGCCAAAGCTCATGTCTGTGCCAACGACGCTGGTGTCCACCAG

CpLOX3p 1741 TTGGTCAACCATTGGCTACGTACACATGCTAGCATGGAGCCATTTATCTTGGCGGCTCAT
 CpLOX3s 1734 TTGGTCAACCATTGGCTACGTACACATGCTAGCATGGAGCCATTTATCTTGGCGGCTCAT

CpLOX3p 1801 AGGCAAATGAGTGCCATGCACCAATTTTAAAGCTTCTTGATCCACATATGAGGTATACA
 CpLOX3s 1794 AGGCAAATGAGTGCCATGCACCAATTTTAAAGCTTCTTGATCCACATATGAGGTATACA

CpLOX3p 1861 TTAGAGATCAATGCGCTGGCTAGACAAAACCTAATCAACGCAGATGGTGTTCATTGAGTCC
 CpLOX3s 1854 TTAGAGATCAATGCGCTGGCTAGACAAAACCTAATCAACGCAGATGGTGTTCATTGAGTCC

CpLOX3p 1921 TGCTTTACCCCCGGCCGCTACTGCATGGAAATGAGCGCCGCCGCTATAGAAACCATTGG
 CpLOX3s 1914 TGCTTTACCCCCGGCCGCTACTGCATGGAAATGAGCGCCGCCGCTATAGAAACCATTGG

CpLOX3p 1981 CGTTTTGACATGGAAGGCCTCCCCGCCGATCTCATCCGCAGAGGCATGGCTGAACCTGAC
 CpLOX3s 1974 CGTTTTGACATGGAAGGCCTCCCCGCCGATCTCATCCGCAGAGGCATGGCTGAACCTGAC

CpLOX3p 2041 CCAACACAACCACATGGGTTAAAGCTCTTGATTGAAGATTACCCATATGCGGCTGATGGG
 CpLOX3s 2034 CCAACACAACCACATGGGTTAAAGCTCTTGATTGAAGATTACCCATATGCGGCTGATGGG

CpLOX3p 2101 TTATTGATTTGGTCAGCAATTGAGAAGCTGGGTGCGGAACCTACGTGAACCATTACTACCCA
 CpLOX3s 2094 TTATTGATTTGGTCAGCAATTGAGAAGCTGGGTGCGGAACCTACGTGAACCATTACTACCCA

CpLOX3p	2161	AACTCCACATTAATCTGCAACGACAGAGAGCTCCAAGCCTGGTACTCAGAGTCCATCAAC
CpLOX3s	2154	AACTCCACTTTAATCTGCAACGACAGAGAGCTCCAAGCCTGGTACTCAGAGTCCATCAAC
CpLOX3p	2221	GTCGGCCACGCCGACCTCCGTGAGGCAAACCTGGTGGCCCAAATTAGACAACGCCGATGAC
CpLOX3s	2214	GTCGGCCACGCCGACCTCCGTGAGGCAAACCTGGTGGCCCAAATTAGACAACGCCGATGAC
CpLOX3p	2281	TTAATCTCCATCCTCACCACCATCATCTGGCTCGCTTCCGCCAACATGCCGCCCTTAAT
CpLOX3s	2274	TTAATCTCCATCCTCACCACCATCATCTGGCTCGCTTCCGCCAACATGCCGCCCTTAAT
CpLOX3p	2341	TTCCGGACAATATCCTTATGGTGGGTACGTCCCAAATCGCCACCCCTAATGAGAAGACTC
CpLOX3s	2334	TTCCGGACAATATCCTTATGGTGGGTACGTCCCAAATCGCCACCCCTAATGAGAAGACTC
CpLOX3p	2401	ATCCCAGAAGAAAATGACCCAGAGTATGCTAATTTTCTTGCTGACCCACAAAAGTATTTT
CpLOX3s	2394	ATCCCAGAAGAAAATGACCCAGAGTATGCTAATTTTCTTGCTGACCCACAAAAGTATTTT
CpLOX3p	2461	CTCTCCGCATTGCCAAGTTTGCTTCAAGCTACAAAATTTATGGCTGTGGTGGACACCTTG
CpLOX3s	2454	CTCTCCGCATTGCCAAGTTTGCTTCAAGCTACAAAATTTATGGCTGTGGTGGACACCTTG
CpLOX3p	2521	TCGACCCACTCGCCGGACGAGGAGTACTTGGGGGAACGACAGCAGCCGTCGATTTGGTCC
CpLOX3s	2514	CCGACCCACTCGCCGGACGAGGAGTACTTGGGGGAACGACAGCAGCCGTCGATTTGGTCC
CpLOX3p	2581	GGTGATGCAGAGATTATAGAAGCGTTTTATGGGTTTTTCAGCCGAGATTATAAGGATAGAA
CpLOX3s	2574	GGTGATGCAGAGATTATAGAAGCGTTTTATGGGTTTTTCAGCCGAGATTATAAGGATAGAA
CpLOX3p	2641	AAGGAGATTGAGAAGAGGAACCAGGATCCTAGCCTTAAGAATCGTTGTGGAGCTGGAGTT
CpLOX3s	2634	AAGGAGATTGAGAAGAGGAACCAGGATCCTAGCCTTAAGAATCGTTGTGGAGCTGGAGTT
CpLOX3p	2701	TTGCCATATGAGCTTCTAGCGCCTAGTTCAGAACCTGGAGTAACTTGCAGAGGAGTCCCA
CpLOX3s	2694	TTGCCATATGAGCTTCTAGCGCCTAGTTCAGAACCTGGAGTAACTTGCAGAGGAGTCCCA
CpLOX3p	2761	AACAGTGTGTGCGATATGA
CpLOX3s	2754	AACAGTGTGTGCGATA---

Figura 30. Corroboración de las secuencias nucleotídicas de la predicción del gen *CpLOX3* (*CpLOX3p*) y del gen aislado (*CpLOX3s*).

CpPLD α 1p	1	MAHYLMHGTLHATVVEVDKLSGGISGFFGKILANVEGTIGIGKGVTTQLYATIDLERARV
CpPLD α 1s	1	MAHYLMHGTLHATVVEVDKLSGGISGFFGKILANVEGTIGIGKGVTTQLYATIDLERARV
		G
CpPLD α 1p	61	GRTRIIKDEPNNPKWYESFHIYCAHMASNVVFTVDDNPIGATLIGRAYVPVEELMRGDQ
CpPLD α 1s	61	GRTRIIKDEPNNPKWYESFHIYCAHMASNVVFTVDDNPIGATLIGRAYVPVEELMRGDQ
CpPLD α 1p	121	VDRWVEILDEDKNPIEGDSKILVVKLQFFDVKKDSNWNMGIKGARYLGVPYTFYSQRRGCR
CpPLD α 1s	121	VDRWVEILDEDKNPIEGDSKILVVKLQFFDVKKDSNWNMGIKGARYLGVPYTFYSQRRGCR
CpPLD α 1p	181	VSLYQDAHVDPDGFIPKIPLAGGKYYEPHRCWEDVFDAITNARHLIYITGWSVYTEITLIR
CpPLD α 1s	181	VSLYQDAHVDPDGFIPKIPLAGGKYYEPHRCWEDVFDAITNARHLIYITGWSVYTEITLIR
CpPLD α 1p	241	DSRRPKPGGDVTLGELLKQKASEGVKVLMLVWDDRTSVGLLKKDGLMATHDEETANYFQN
CpPLD α 1s	241	DSRRPKPGGDVTLGELLKQKASEGVKVLMLVWDDRTSVGLLKKDGLMATHDEETANYFQN
		HKD
CpPLD α 1p	301	TDVHCVLCPRNPDDGGSFVQGLQISTMFTHQIVVVGEMPSGESQMRRIVSFVGGIDL
CpPLD α 1s	301	TDVHCVLCPRNPDDGGSFVQGLQISTMFTHQIVVVGEMPSGESQMRRIVSFVGGIDL
CpPLD α 1p	361	CDGRYDTPFHSLFRTLDTAHHDDFHQPNFAGSSITKGGPREPWHDIHSRLEGPVAVDVFLE
CpPLD α 1s	361	CDGRYDTPFHSLFRTLDTAHHDDFHQPNFAGSSITKGGPREPWHDIHSRLEGPVAVDVFLE
CpPLD α 1p	421	NFEQRWRQGGKDVLVNLRDLNIIIPSPVMFPDDRRETWNVQLFRSIDGGAAFGFPETP
CpPLD α 1s	421	NFEQRWRQGGKDVLVNLRDLNIIIPSPVMFPDDRRETWNVQLFRSIDGGAAFGFPETP
CpPLD α 1p	481	EAAARAGLVSGKDNIIDRSIQDAYINAIIRRAKNFIYIENQYFLGSSFDWSSDDIKREDIN
CpPLD α 1s	481	EAAARAGLVSGKDNIIDRSIQDAYINAIIRRAKNFIYIENQYFLGSSFDWSSDDIKREDIN
CpPLD α 1p	541	ALHLIPKELSLKIVSKIERGERFTVYVVVPMWPEGVPESASVQAILDWQRRTMEMMYKDI
CpPLD α 1s	541	ALHLIPKELSLKIVSKIERGERFTVYVVVPMWPEGVPESASVQAILDWQRRTMEMMYKDI
CpPLD α 1p	601	IQALRAKDREEDPRNYLTFECLGNREVKKSGEYEPSEPERPEDSDYIRAQEARRFMIYVT
CpPLD α 1s	601	IQALRAKDREEDPRNYLTFECLGNREVKKSGEYEPSEPERPEDSDYIRAQEARRFMIYVT
		HKD
CpPLD α 1p	661	MMIVDEYIIVGSANINQRSMDGARDSEIAMGAYQPYHLTINQPARGQIHGFRMALWYE
CpPLD α 1s	661	MMIVDEYIIVGSANINQRSMDGARDSEIAMGAYQPYHLTINQPARGQIHGFRMALWYE
		PLD
CpPLD α 1p	721	HLGMLDDTFLEPENIECVQKVNVRVAGKYWDLYASELLEHDLPGHLLRYPIGVSSEGDVTE
CpPLD α 1s	721	HLGMLDDTFLEPENIECVQKVNVRVAGKYWDLYASELLEHDLPGHLLRYPIGVSSEGDVTE
CpPLD α 1p	781	LPGTEFTRKARVLGAKSDYLPPILT
CpPLD α 1s	781	LPGTEFTRKARVLGAKSDYLPPILT

Figura 31. Corroboración de las secuencias de aminoácidos de la predicción del gen *CpPLD α 1* (*CpPLD α 1p*) y del gen aislado secuenciado (*CpPLD α 1s*).

CpLOX3s	1	MALAKEMMGYSMIERSPWLASKKLRLKYRDNLSLPQRKTQLRINPGSVFLEHRRTPV
CpLOX3p	1	MALAKEMMGYSMIERSPWLASKKLRLKYRDNLSLPQRKTQLRINPGSVFLEHRRTPV
CpLOX3s	61	AALSEDLIKSIGSSNSSSSGRENEKAVKFKVRAVMTVRNKSQDLKDTIVKHLDAFSEKI
CpLOX3p	61	AALSEDLIKSIGSSNSSSSGRENEKAVKFKVRAVMTVRNKSQDLKDTIVKHLDAFSEKI
		PLAT
CpLOX3s	121	GRNVVLELISSTEIDPRTKEAKKSNQAVIKDWYKKS NVKAERVHYTTELLVDSNFGEAGA
CpLOX3p	121	GRNVVLELISSTEIDPRTKEAKKSNQAVIKDWYKKS NVKAERVHYTTELLVDSNFGEAGA
		PLAT
CpLOX3s	181	ITVINKHQNEFFLESINIEGFASGPLHFFPCNSWVQPVKHHSSPRIFFSNKPYLP
CpLOX3p	181	ITVINKHQNEFFLESINIEGFASGPLHFFPCNSWVQPVKHHSSPRIFFSNKPYLP
		LOX
CpLOX3s	241	LKALREKELKDLRGDGKGVNLSDRVYDFDVYNDLGNPKGSDFA R PVLGRQIPYPRCR
CpLOX3p	241	LKALREKELKDLRGDGKGVNLSDRVYDFDVYNDLGNPKGSDFA R PVLGRQIPYPRCR
		LOX
CpLOX3s	301	TGRPPTDTDMHVESRVEKPLPVYVPRDEQFEESKQDTFSAGRLKAVLHNLIPSLKATISA
CpLOX3p	301	TGRPPTDTDMHVESRVEKPLPVYVPRDEQFEESKQDTFSAGRLKAVLHNLIPSLKATISA
		LOX
CpLOX3s	361	DNHDFNASDIDNLYREGLLLKIGLQDELIKKLPPTVVNTIQESSQRLLKYNTPKIVSK
CpLOX3p	361	DNHDFNASDIDNLYREGLLLKIGLQDELIKKLPPTVVNTIQESSQRLLKYNTPKIVSK
		LOX
CpLOX3s	421	DKFAWLRDDEFARQTMAGINPVSIERLRVFPVSNLDPQIYGSQPSALQEHHIAPHLHCM
CpLOX3p	421	DKFAWLRDDEFARQTMAGINPVSIERLRVFPVSNLDPQIYGSQPSALQEHHIAPHLHCM
		LOX
CpLOX3s	481	TVQQALEEKKLYIMDYHDVYLPFLDRINALDGRKAYATRTIFFLTPQGCKPIAIELSLP
CpLOX3p	481	TVQQALEEKKLYIMDYHDVYLPFLDRINALDGRKAYATRTIFFLTPQGCKPIAIELSLP
		LOX
CpLOX3s	541	HTGPTSRQKRVTTPVDATSNWVWQLAKAHVCANDAGV QLVN WLRT ASMEPFILAAH
CpLOX3p	541	HTGPTSRQKRVTTPVDATSNWVWQLAKAHVCANDAGV QLVN WLRT ASMEPFILAAH
		LOX
CpLOX3s	601	RQMSAM PIFKLLDP MRYTLEINALARQNLINADGVIESCFTPGRYCMEMSAAAYRNHW
CpLOX3p	601	RQMSAM PIFKLLDP MRYTLEINALARQNLINADGVIESCFTPGRYCMEMSAAAYRNHW
		LOX
CpLOX3s	661	RFDMEGLPADLIRRGMAEPDPTQPHGLKLLIEDYPYAADGLLIWSAIENWVGTYVNHYP
CpLOX3p	661	RFDMEGLPADLIRRGMAEPDPTQPHGLKLLIEDYPYAADGLLIWSAIENWVGTYVNHYP
		LOX
CpLOX3s	721	NSTLICNDRELQAWYSESINVGHADLREANWPKLDNADDLISILTTIIWLASAQHAALN
CpLOX3p	721	NSTLICNDRELQAWYSESINVGHADLREANWPKLDNADDLISILTTIIWLASAQHAALN
		LOX
CpLOX3s	781	FGQYPYGGYVPNRPPLMRRLIPEENDPEYANFLADPQKYFLSALPSLLQATKFMVVDTL
CpLOX3p	781	FGQYPYGGYVPNRPPLMRRLIPEENDPEYANFLADPQKYFLSALPSLLQATKFMVVDTL
		LOX
CpLOX3s	841	PTHSPDEEYLGERQQPSIWSGDAEIIIEAFYGFSAEIIIRIEKEIEKRNQDPSLKNRCCAGV
CpLOX3p	841	PTHSPDEEYLGERQQPSIWSGDAEIIIEAFYGFSAEIIIRIEKEIEKRNQDPSLKNRCCAGV
CpLOX3s	901	LPYELLAPSSKPGVTCRGVPNSVSI
CpLOX3p	901	LPYELLAPSSKPGVTCRGVPNSVSI

Figura 32. Corroboración de las secuencias de aminoácidos de la predicción del gen *CpLOX3* (CpLOX3p) y del gen aislado (CpLOX3s).

Adicionalmente se realizaron dos alineamientos de secuencias de aminoácidos: uno de la traducción de la *CpPLDα1* secuenciada con una PLD presente en frutos de pepino

(CsPLD α 1), ortóloga al AtPLD α 1, y otro de la traducción de la CpLOX3 secuenciada con una LOX presente en frutos de pepino (CsLOX1), ortóloga a la AtLOX1. Se reportó que ambas proteínas del pepino aumentan su expresión y actividad ante estrés por daño mecánico en frutos de pepino (Zhao *et al.*, 2010) (ver Figuras 33 y 34).

CsPLD α 1	1	MEGTSIHGTLHATIIYEIDRLHTGGSSNVFMSLRQNFEEAVGIGKQTKLYATIDLERARV
CpPLD α 1	1	MAHYLMHGTLHATVYEVDKLSGGISGFFGKILANVEGTIGIGKGVTKLYATIDLERARV
CsPLD α 1	61	GRTRILESDPSNPKWNEFHIYCAHKASNVIFTVKDDNPIGATLIGRAYVPVEDIVDGE
CpPLD α 1	61	GRTRIKDEENNPKWYESFHIYCAHMASNVVFTVKDDNPIGATLIGRAYVPEELMRGDQ
CsPLD α 1	121	VDRWVPIILDENQNPIEEEESKIHVKLQYFSVTKDRNWGRGIRSRKTFGPVPTYYSQRQCK
CpPLD α 1	121	VDRWVEILDEDKNPIEGDSKILVKLQFFEDVKKDSNWNMGIKARYLGVPTYFYSQRRCR
CsPLD α 1	181	VSLYQDAHVPDNFIPKIPLAGGKNYAPARCWEDIFDAIKNAKHMIIYITGWSVYTEIALVR
CpPLD α 1	181	VSLYQDAHVPDGFIPKIPLAGGTYEAPARCWEDVFDATNARHMIYITGWSVYTEITLIR
CsPLD α 1	241	DSRRPKPGGDTMLGELLKNAKASEGVVLMVLVWDDRTSVGLLKKDGLVATHDEETERYFQD
CpPLD α 1	241	DSRRPKPGGDVTLGELLKNAKASEGVVLMVLVWDDRTSVGLLKKDGLMATHDEETANYFQD
CsPLD α 1	301	TDVHCVLCPRNPDDGGSIVQDLQISTMFTTHQKIVVVDSPMENGSDKRRIVSFVGGIDL
CpPLD α 1	301	TDVHCVLCPRNPDDGGSFVQGLQISTMFTTHQKIVVVDGEMPSGESQMRIVSFVGGIDL
CsPLD α 1	361	CDGRYDTPFHSLFRTLDTAHHDDFHQPNETCASITKGGPREPWHDIHSRLEGPLAWDVL
CpPLD α 1	361	CDGRYDTPFHSLFRTLDTAHHDDFHQPNETGASITKGGPREPWHDIHSRLEGPLAWDVL
CsPLD α 1	421	NFEQRWKKQGGKDVLLQLRDLDEIIVPPSPVMYPDDHDTWNVQLFRSIDGGAAFGFPET
CpPLD α 1	421	NFEQRWRQGGKDVLVNLRDLNIIIVPPSPVMFPDDRDTWNVQLFRSIDGGVAFGFPET
CsPLD α 1	481	EAAARAGLVSGKDNIIDRSIQDAYINAIIRRAKNFIYIENQYFLGSCFGWSPDNIKPEDIG
CpPLD α 1	481	EAAARAGLVSGKDNIIDRSIQDAYINAIIRRAKNFIYIENQYFLGSEFDWSSDDIKREDIN
CsPLD α 1	541	ALHCIPRELSLKIVSKIKA GERFTVYVVVPMWPEGLPESGSVQAILDWQKRTLEMMYKDV
CpPLD α 1	541	ALHCIPRELSLKIVSKIERGERFTVYVVVPMWPEGVPEASVQAILDWQRRTMEMMYKDI
CsPLD α 1	601	IEALRDQGI EEDPRNYLTFECLGNREVKRSGEYEPSEAPEEDSDYLRAQQARRFMIYVHT
CpPLD α 1	601	IQALRAKDR EEDPRNYLTFECLGNREVKRSGEYEPSERPEDSDYLRAQQARRFMIYVHT
CsPLD α 1	661	KMMIVDDEYIIVGSANINQRSMDGARDSEIAMGAYQPYHLSAHEPARGQVHGFRMALWYE
CpPLD α 1	661	KMMIVDDEYIIVGSANINQRSMDGARDSEIAMGAYQPYHLTINQARGQIHGFRMALWYE
CsPLD α 1	721	HLGMLDSTFLRPESEECVAKVNRVADKYWDMYSSSESLERDLPGHLLRYPIGITSEGEVTE
CpPLD α 1	721	HLGMLDSTFLEPENIECVQKVNRAKYWDLYASELLEEDLPGHLLRYPIGVSSEGEVTE
CsPLD α 1	781	LPGTECFPDTKARILGTKSDYLPPILT
CpPLD α 1	781	LPGTECFPDTKARVLGAKSDYLPPILT

Figura 33. Comparación de las secuencias de aminoácidos de CpPLD α 1 con CsPLD α 1.

CsLOX	1	MFGIGKNIIEGALNTTGDLAGS-----VINAGGNILDR-----
CpLOX3	1	-MALAKEMMGYSMIERSPWLA SSKKLR LKYRDNSLPQRKTQLRINPGSVFL HRRTNPVV
CsLOX	34	-----VSSLGGN-----KIKGKVIILMRSNVLDFTEFHSNLLDNFTL
CpLOX3	60	VAALSEDLIKSLIGSSNSSSGRENENKAVKFKVRAVMTVRNKSQDLKDTIVKHLDAFSEK
CsLOX	71	LGGGVSFQLISATHTS-NDSRGKVGNKAYLERWLTSSIPPLFAGESVFQINFQWDENFGFP
CpLOX3	120	IGRNVVLELISSTEIDPRTKEAKKSNOAVIKDWYK-KSNVKAERVHYTTELLVDSNFGEA
CsLOX	130	GAFIKNGHTSEFFLKSLTLDDVPGYGRVHFD CNSWVY PSGRYKDRIFFANHVYLPST
CpLOX3	179	GAITVINRHQNEFFLESINIEGFAS-GPLHFP CNSWVQ PVKHSSPRIFFSNKPYLPSDT
CsLOX	190	PNPLRKYREELWNLRGDGTGERKEWDRIYDYVDYNDIADPDVGD--HRPILGGTTEYPY
CpLOX3	238	PVGLKALREKELKDLRGDGKGVRLNSDRVYDFDYNDLGNPDKGSDFVRPVLG--RQIPY
CsLOX	248	PRRCRTGRPRSRRDHNYESRLSPIMSLDIYVPRDEMFGHLMKSD ELGYTLKALSISIKPG
CpLOX3	296	PRRCRTGRPPTD DMHVESRVE --KPLPVYVPRDEQFEESKQDTFSAGRLKAVLHNLIPS
CsLOX	308	LQSIFDVT PNEFDNFKEVDNLFERGFPIPFNAFKT LTEDLTFELFKALVRNDGERFLKFP
CpLOX3	354	LKATISADN EDENASSDIDNLYREGLL LKIGLQDELIKKLP STVVNTIQESSQRL LKYN
CsLOX	368	TPEVVKDNKIGWSTDEEFAREMLAGPNPLLIRLEAFPPTSKLDPNVYGNQNSTITEEHI
CpLOX3	414	TPKIVSKDKFAWLRDDEFARQTMAGINPVSIERLRVFPVSNLDPQIYGSQPSALQEHHI
CsLOX	428	KHGLDGLTVDEAMKQNRLYIVDFHDALMPYLIRLNATS-TKTYATRTLLLEKDDGTLKPL
CpLOX3	474	APHLCMTVQCALEEKKLYIMDYHDVYLPFLDRINALDGRKAYATRTIFFLTPQGCLKPI
CsLOX	487	VIEIALPHPQCDQLGAISKLYFPAENGVQKSIWQLAKAVTVNDVGYHQLISHWLH THAV
CpLOX3	534	AIELS LPHTG --PTRSQKRVVTPPVDATSNWVWQLAKAEVCANDAGVHQLVNH WLH THAS
CsLOX	547	LEPFVIATHRQLSVLHPHKL LVPHYKDTMFINASARQVLINANGLIETHYPSKYSMEL
CpLOX3	592	MEPFILAAHRQMSAMHPIFKLLDPHMRYTLEINALARQNLINADGVLES CFTPGRYCMEM
CsLOX	607	SSILYK-DWTFDPQALPNNLMKRGLAVEDSSAPHGLRLLINDYPLAVDGLDIWSA IKTWV
CpLOX3	652	SAAAYRNHWREDMEGLPADLIRRGMAEPDPTOPHGLRLLIEDYPMAADGLLIWSA IENWV
CsLOX	666	QDYCCLYYKDDNAVQND FELQSWN ELREKGHADKKEFPWWPKMQLSELIESCTTIWI
CpLOX3	712	GTVYVNHYPNSTLICND RELQAWYSE SINVGHADLREANWWPKLDNADDLISILTTIIWL
CsLOX	726	ASALHAAVNFGQYPYGGYILNRPTTSRRFMPEVGTAEYKELESNPEKAF LRTICSELQAL
CpLOX3	772	ASAGHAANFGQYPYGGYVPNRPPLMRRLIPEENDPEYANFLADPQKY FLSALPSLLQAT
CsLOX	786	VSISIIHLSK HASDEVYLGQR -ASIDWTSKIALAEAFKPKGNLFEVENRIMER NKEVN
CpLOX3	832	KFMAVVDTLPTHSPDEEYLG ERQQPSI WSGDAEIEAEYCFSAEII RIEKEIEKRNQDPS
CsLOX	845	LKNRSGPVNLPYTL LVSSNEGLTGRGIPNSIS I
CpLOX3	892	LKNRCGAGVLPYELLAPSSKPGVTCRGVPNSVSI

Figura 34. Comparación de las secuencias de aminoácidos de CpLOX3 con CsLOX1.

Actualmente los genes *CpPLDα1* y *CpPLOX3* se encuentran almacenados de tres formas: en células transformadas de *E. coli* conservadas en glicerol al 20%, en células

transformadas de *E. coli* en cajas de medio LB con ampicilina refrigeradas a 4°C y en soluciones de plásmidos pGEM T-Easy.

En base a los resultados anteriores y a información previa de mecanismos de respuestas a diferentes tipos de estrés (entre ellos daño mecánico en diferentes tejidos de plantas) se realizó una propuesta del mecanismo de señalización de respuesta al daño mecánico ocasionado en frutos maduros de *C. papaya* (ver Figura 35).

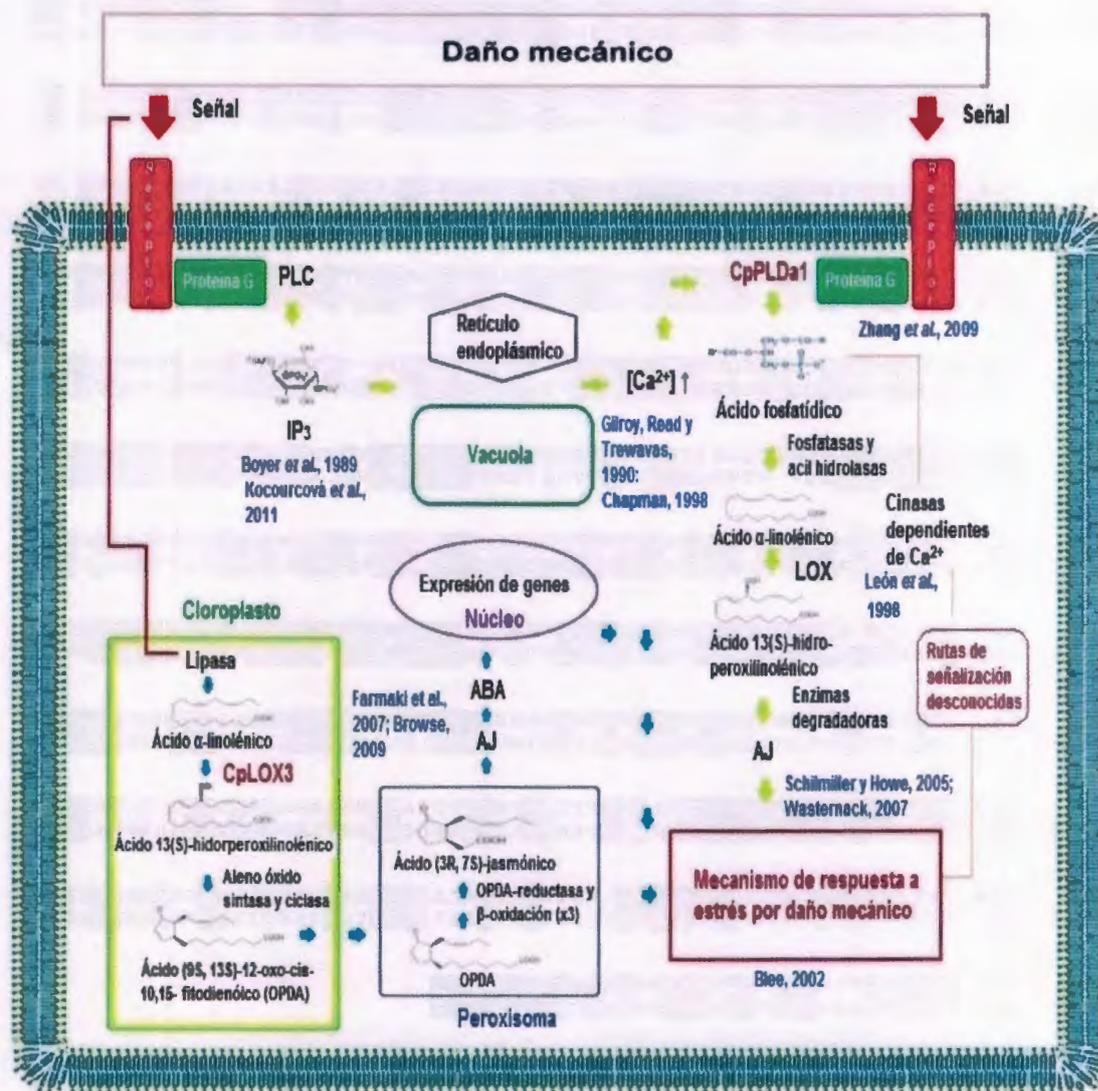


Figura 35. Propuesta de mecanismo de acción de la respuesta del fruto de *C. papaya* a estrés por daño mecánico. Nota: en la figura se indican las referencias de cada paso del mecanismo.

Posteriormente se llevaron a cabo pruebas bioquímicas en frutos de *C. papaya* con los cuales se evaluó parte de los mecanismos moleculares de respuesta de los frutos ante el estrés por daño mecánico (ver Figuras 36 y 37).

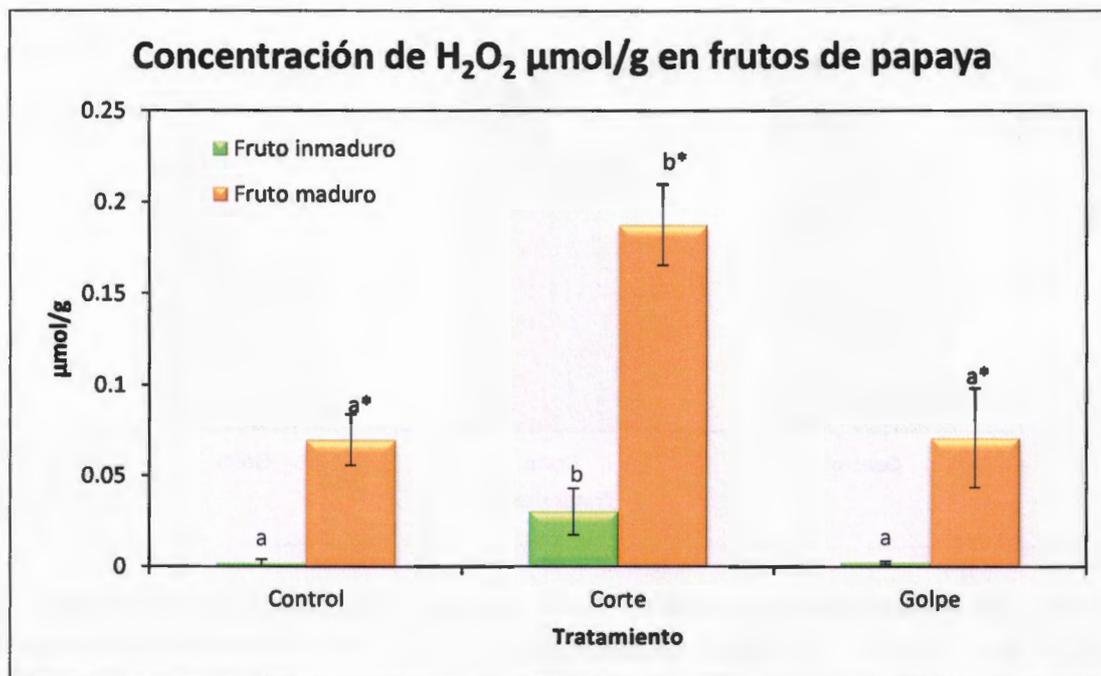


Figura 36. Concentración de peróxido de hidrogeno en cáscaras de frutos de papaya sometidos a estrés por daño mecánico. Los gráficos se construyeron con una ANOVA simple a partir de las medias y desviaciones estándar de las mediciones de cada tratamiento ($P < 0,05$). Letras distintas en cada tratamiento indican diferencia estadística de acuerdo al método LSD (diferencia mínima significativa).

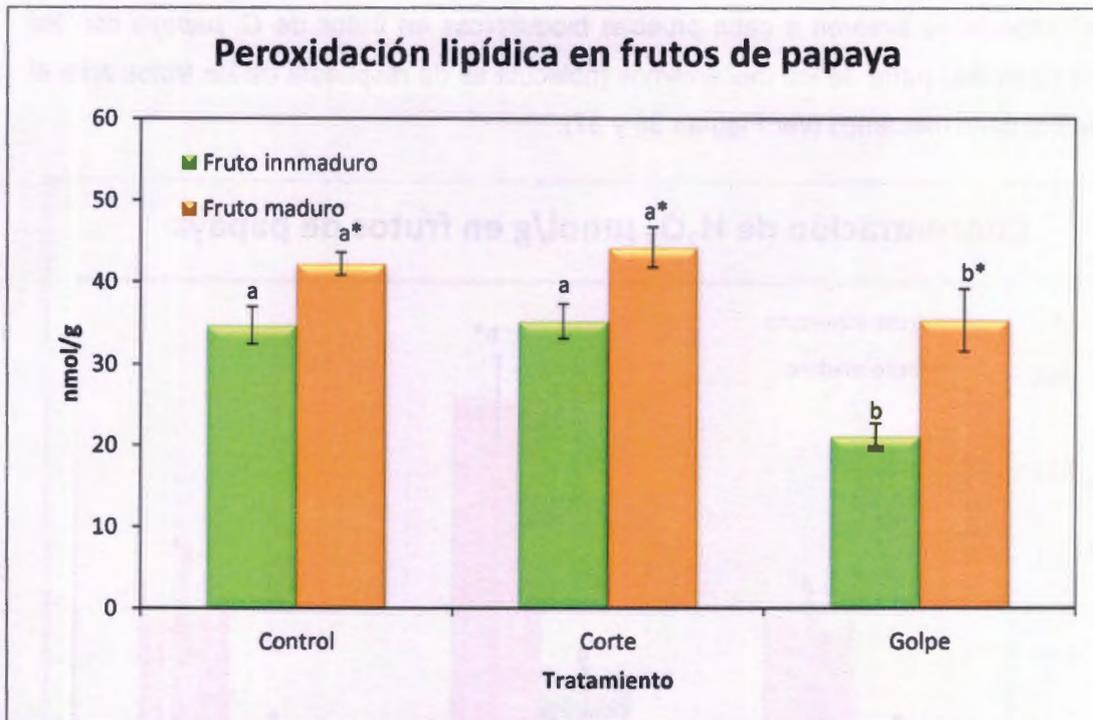


Figura 37. Concentración del complejo MDA-TBA en cáscaras de frutos de papaya sometidos a estrés por daño mecánico. Los gráficos se construyeron con una ANOVA simple a partir de las medias y desviaciones estándar de las mediciones de cada tratamiento ($P < 0,05$). Letras distintas en cada tratamiento indican diferencia estadística de acuerdo al método LSD (diferencia mínima significativa).

3.4 DISCUSIÓN

Comúnmente la determinación del grado de maduración de los frutos se realiza de manera visual. Una mejor alternativa para la verificación del grado de maduración consiste en la medición de parámetros colorimétricos; el cual nos permite determinar una relación directa entre el grado de maduración de los frutos (respiración y firmeza) con el color de estos. En base a lo anterior, se empleó la metodología de Santamaría *et al.* (2009) para la selección de frutos en una misma etapa de maduración.

Debido a que el daño mecánico en frutos puede deberse a distintas circunstancias, tales como golpes y lesiones, para simular estas condiciones los tratamientos de daño mecánico consistieron en cortes profundos y leves golpes en toda la superficie de los frutos.

Los perfiles de expresión de los genes *CpPLDs* y *CpLOXs* en los frutos sometidos a daño mecánico indicaron el aumento de la expresión de los genes *CpPLD α 1* (en frutos maduros e inmaduros sometidos a estrés por golpe) y *CpLOX3* (en frutos maduros sometidos a estrés por corte). Las secuencias nucleotídicas y proteicas de ambos genes secuenciados coinciden casi completamente con las predicciones realizadas previamente mediante el empleo de servidores bioinformáticos, indicando que el previo análisis *in silico* se realizó de manera adecuada.

Estudios previos determinaron la presencia de una proteína del tipo PLD aislada del látex de frutos de *C. papaya*, sin embargo, su actividad fisiológica e interacción en el látex aún es desconocida (Abdelkafi *et al.*, 2012). El fruto de papaya es rico en papaína y al comparar las secuencias nucleotídica y de aminoácidos de la PLD aislada en el látex de *C. papaya* con la secuencia nucleotídica de la *CpPLD α 1* obtenida en este estudio y su traducción estas presentaron coincidencias casi totales, respectivamente (ver Anexos 3 y 4). Por tanto, es muy factible que la *CpPLD α 1* caracterizada en este estudio y la PLD presente en el látex sean la misma proteína y que la *CpPLD α 1* desempeñe un papel importante en el sistema de respuesta del fruto de papaya ante el daño mecánico externo.

El aumento de la expresión del gen *CpLOX3* solo se presentó en frutos maduros sometidos a daños mecánicos por lo que se deduce que la expresión de los genes *LOXs* puede variar con respecto a la etapa de maduración de los frutos. Estudios previos en

hojas de tomate y papa sometidas a daño mecánico por corte o compresión indicaron el aumento de la expresión de las lipoxigenasas LOXD y LOXH3, respectivamente (Heitz *et al.*, 1997; Farmaki *et al.*, 2007). Ambas lipoxigenasas son ortólogas a la AtLOX3 y a la CpLOX3 obtenida en este estudio, por lo que es posible que estas posean actividades enzimáticas similares.

Al comparar las secuencias de aminoácidos de la CpPLD α 1 y la CpLOX3 obtenidas en este estudio con la PLD y la LOX analizadas en frutos de pepino sometidos a daño mecánico (Zhao *et al.*, 2010) se observó un alto grado de identidad (alrededor de un 80%) entre ambas PLDs; sin embargo el grado de identidad de las LOXs de ambos frutos fue mucho menor (alrededor de un 40%). La CpPLD α 1 y la PLD de pepino son ortólogas a la AtPLD α 1 mientras que la CpLOX3 y la LOX de pepino son ortólogas a los genes AtLOX3 y AtLOX1, respectivamente. Las proteínas generadas a partir de los genes AtLOX3 y AtLOX1 difieren tanto en tipo como en ubicación espacial en la célula vegetal (la AtLOX3 se ubica en las membranas de los cloroplastos mientras que la AtLOX1 se ubica en el citoplasma o en la membrana celular (TAIR, 2012)). Por tanto, es factible que la CpPLD α 1 realice una función similar a la PLD de pepino y que ambas se ubiquen en la misma región celular (membrana celular (TAIR, 2012)) mientras que las CpLOX3 y la LOX de pepino realicen funciones similares pero en distintas ubicaciones.

Las pruebas bioquímicas realizadas en frutos de papaya sometidos a estrés por daño mecánico en conjunto con los resultados de la expresión diferencial de genes entre ambos estados de maduración generaron diversos resultados importantes:

Ambas pruebas bioquímicas presentaron un aumento significativo de las lecturas obtenidas de los distintos tratamientos de daño mecánico de los frutos maduros de papaya respecto a los obtenidos de los frutos inmaduros de papaya. Este comportamiento coincide con los reportados en estudios previos del estrés oxidativo durante el proceso de maduración de diversos tipos de frutos en los cuales se presentan incrementos de la concentración de H₂O₂ y el índice de peroxidación lipídica en los tejidos de los frutos conforme se lleva a cabo el proceso de maduración (Lin *et al.*, 1988; Wang y Jiao, 2001; Jimenez *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2011).

Se presentó un aumento significativo de la expresión del gen CpLOX3 el cual coincide con un aumento significativo del contenido de H₂O₂ tanto en frutos maduros como inmaduros.

Estudios previos indican un incremento de la producción de H_2O_2 en tejidos de plantas, especialmente en hojas, sometidos a daño mecánico (Orozco-Cárdenas y Rian, 1999; Chandru *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2004), comportamiento que coincide con los resultados obtenidos en esta investigación. En investigaciones anteriores se ha corroborado que parte de los radicales hidroperóxidos de ácidos grasos generados por las LOXs poseen efectos citotóxicos (Koshiishi *et al.*, 2006). Es posible que la oxidación de los tejidos dañados expuestos al ambiente en conjunto con la presencia de los radicales hidroperóxidos de ácidos grasos generados por las LOXs aceleren el ritmo de generación de especies reactivas de oxígeno como el H_2O_2 que puede participar en el mecanismo de respuesta del fruto al estrés por daño mecánico ocasionado por el corte del tejido (Sevanian, 1988).

Se presentó un aumento significativo de la expresión del gen *CpPLD α 1* el cual coincide con una disminución significativa del índice de peroxidación lipídica tanto en frutos maduros como inmaduros. En el caso de la *CpPLD α 1*, estudios previos indican un incremento de la expresión y actividad de las *PLD α 1s* en tejidos de plantas, especialmente hojas, sometidos a daño mecánico (Ryu y Wang, 1998; Wang *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2010). Sin embargo, no existen estudios previos acerca del índice de peroxidación lipídica en frutos de papaya cultivar Maradol. Se ha observado que durante el proceso de maduración de frutos de papaya de la variedad Solo (en el cual se reportaron índices de peroxidación lipídica similares a los reportados en este estudio) se presenta un leve incremento del índice de peroxidación lipídica en tejidos de cáscara y pulpa así como una disminución de la actividad de enzimas antioxidantes. En base a estos resultados se concluyó que la peroxidación lipídica en un proceso necesario para la maduración de los frutos (Resende *et al.*, 2012). Otro estudio reciente en frutos de papaya de la variedad Solo sometidos a daño mecánico indicó que no se presentó un aumento significativo en el índice de peroxidación lipídica en tejido de mesocarpio (pulpa) (Oliveira *et al.*, 2011). En base a la información anterior, se puede deducir que es factible que la disminución del índice de peroxidación lipídica en cáscaras de frutos de papaya cultivar Maradol maduros e inmaduros sometidos a estrés por daño mecánico por golpe conforme parte de un sistema de respuesta del fruto ante el estrés por daño mecánico. Probablemente la señal generada en la cáscara del fruto inicie un sistema de señalización que evite la peroxidación lipídica en los tejidos internos del fruto para evitar el deterioro de las semillas del fruto.

3.5 CONCLUSIÓN

En este estudio se llevó a cabo la caracterización de nuevos genes de frutos de *C. papaya* de respuesta a distintos tipos de daño mecánico. Los resultados obtenidos señalan la participación de la CpPLD α 1 y la CpLOX3 en el mecanismo de respuesta a daño mecánico en los frutos, aparentemente por rutas independientes. La mayoría de estos resultados concuerdan con los reportados previamente en estudios de la participación de las PLDs y LOXs en tejidos de plantas sometidos a daño mecánico. Es necesario señalar que existen pocos estudios acerca de los efectos del estrés por daño mecánico en frutos, especialmente tropicales. Esta investigación es una de las primeras evidencias de los mecanismos de respuesta ante daño mecánicos en frutos de *C. papaya* en diferentes etapas de maduración. Los resultados obtenidos proporcionan una base para estudios futuros para conocer el metabolismo de los frutos de *C. papaya* cultivar Maradol.

3.6 REFERENCIAS

Abdelkafi, S., Abousalham, A., Fendri, I., Ogata, H., Barouh, N., Fouquet, B., Scheirlinckx, F., Villeneuve, P. y Carrere, F. (2012). Identification of a new phospholipase D in *Carica papaya* latex. *Gene*, 499, 234-249.

Agustí, M. (2010). *Fruticultura*. Mundi-Prensa, Madrid. 164 p.

Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. (2006). *Introducción a la biología celular*. 2a edición. Editorial Panamericana. 268 p.

Aracenta, J., Serra, L., Pérez, C. y Ortega, R. (2006). *Frutas, verduras y salud*. Elsevier España. 8 p.

Bailey, C., Srinivasan, J. y Mcgeachin, R. (1996). The effect of ethoxyquin on tissue peroxidation and immune status of single comb white leghorn cockerels. *Poultry Science*, 75(9), 1109-1112.

Boyer, J., Hepler, R. y Harden, T. (1989). Hormone and growth factor receptor-mediated regulation of phospholipase C activity. *Trends Pharmacol Sci*, 10(9), 360-364.

Browse, J. (2009). Jasmonates Passes Muster: A receptor and targets for defense hormone. *Annu. Rev. Plant. Biol.*, 60, 183-205.

Bunmanop S., Sakuanrungsirikul S. y Manakasem, Y. (2011). White Kwao Krua variety classification by botanical characteristics and ISSR-touchdown PCR technique. *Genetika*, 47(7), 927-36.

Chandru, H., Kim, E., Kuk, Y., Cho, K. y Han, O. (2003). Kinetics of wound-induced activation of antioxidative enzymes in *Oryza Sativa*: differential activation at different growth stages. *Plant Science*, 164(6), 935-941.

Chang, C., Ball, L., Fryer, M., Baker, N., Karpinski, S. y Mullineaux, P. (2004). Induction of ascorbate peroxidase 2 expression in wounded *Arabidopsis* leaves does not involve known wound-signalling pathways but is associated with changes in photosynthesis. *Plant Journal*, 38(3), 499-511.

- Chapman, K. (1998). Phospholipase activity during plant growth and development and in response to environmental stress. *Trends in Plant Sci*, 3(11), 419-426.
- Desikan, R., Soheila, A., Mackerness, H., Hancock, J. y Neill, S. (2001). Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol.*, 127(1), 159-172.
- Farmaki, T., Santamarín, M., Jiménez, P., Paneque, M., Sanz, C., Vancanneyt, G., León, J. y Sánchez, J. (2007). Differential distribution of the lipoxygenase pathway enzymes within potato chloroplasts. *Journal of Experimental Botany*, 58(3), 555-568.
- Gilroy, S., Read, N. y Trewavas, A. (1990). Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol triphosphate initiates stomatal closure. *Nature*, 346(6286), 769-771.
- Heath, R. y Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. i. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 125(1), 189-98.
- Heitz, T., Bergey, D. y Ryan, C. (1997). A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Physiol*, 114(3), 1085-1093.
- Hernández, J., Ferrer M., Jiménez, A., Ros Barceló, A. y Sevilla, F. (2001). Antioxidant system and O_2^-/H_2O_2 production in the apoplast of pea leaves. its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiol.*, 127(3), 817-831.
- Jimenez, A., Creissen, G., Kular, B., Firmin, J., Robinson, S., Vethoeyen, M. y Mullineaux, P. (2002). Changes in oxidatve process and components of the antioxidant system during tomato ripening. *Planta*, 214(4), 751-8.
- Kocourkova, D., Krc ěkova, Z. Pejchar, P., Veselkova, S.Valentova, O., Wimalasekera, R., Scherer, G. y Jan Martinec, J. (2011). The phosphatidylcholine-hydrolysing phospholipase C NPC4 plays a role in response of *Arabidopsis* roots to salt stress. *Journal of Experimental Botany*, 62(11), 3753-3763.
- Koshiishi, I., Tsuchida, K., Takajo, T. y Komatsu, M. (2006). Radical scavenger can scavenge lipid allyl radicals complexed with lipoxygenase at lower oxygen Content. *Biochem J.*, 395, 303-309.

León, J., Rojo, E., Titarenko, E. y Sánchez-Serrano, J. (1998). Jasmonic acid-dependent and -independent wound signal transduction pathways are differentially regulated by Ca²⁺/calmodulin in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet*, 258, 412-419.

Low, P. y Merida, J. (1996). The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. *Physiol. Plant.*, 96(3), 533-542.

Lin, Z., Li, S. y Zhang, D. (1988). The changes of oxidation and peroxidation in postharvest litchi fruit. *Acta Botanica Sinica*, 30(4). 383-387.

Lu, P., Chen, N., An, R., Su, Z., Qi, B., Ren, F., Chen, J. y Wang, X. (2007). A novel drought-inducible gene, ATAF1, encodes a NAC family protein that negatively regulates the expression. *Plant Mol Biol*, 63(2), 289-305.

Oliveira, E., Amaral Junior, A., Gonçalves, L., Pena, G., Freitas Júnior, S., Ribeiro, R. y Pereira, M. (2010). Optimizing the efficiency of the touchdown technique for detecting inter-simple sequence repeat markers in corn (*Zea mays*). *Genet. Mol. Res.*, 9(2), 835-42.

Oliveira, J., Bressan-Smith, R., Campostrini, E., Da Cunha, M., Costa, E., Torres, A., Coutinho, K., Gomes, M. y Pierre A. (2011). Papaya pulp gelling: is it premature ripening or problems of water accumulation in the apoplast?. *Rev. Bras. Frutic.*, 32(4), 961-969.

Orozco-Cárdenas M. y Ryan C. (1999). hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 96(11), 6553-6557.

Purves, W. (2009). *Vida/Life: La ciencia de la biología molecular/the science of biology*. Ed. Médica Panamericana. 810 p.

Resende, E., Martins, P., Antunes de Azevedo, R., Jacomino, A. y Bron, I. (2012). *Braz. J. Oxidative processes during 'golden' papaya fruit ripening. Plant Physiol.*, 24(2): 85-94.

Ryu, S. y Wang, X. (1996). Activation of phospholipase D and the possible mechanism of activation in wound-induced lipid hydrolysis in castor bean leaves. *Biochim Biophys Acta*, 1393(1), 243-250.

- Santamaría, F., Sauri, E., Espadas, F., Díaz, R., Larqué, A. y Santamaría, J. (2009). Postharvest ripening and maturity indices for maradol papaya. *Interciencia*, 34(8), 583-588.
- Schilmiller A. y Howe, G. (2005). Systemic signaling in the wound response. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(4), 369-377.
- Sergiev, I., Alexieva, V. y Karanov, E. (1997). Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants, *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.*, 51(3), 121-124.
- Sevanian, A. (1988). Lipid peroxidation. American Oil Chemists' Society, USA. 207 p.
- Valero, A. (2011). Principios de color y holopintura. Editorial Club Universitario, San Vicente. 147 p.
- Velikova, V., Yordanov, I. y Edreva, A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant system in acid rain treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci.*, 151(1), 59-66.
- Wang, C., Zien, C., Afithile, M., Welti, R., Hildebrand, D. y Wang, X. (2000). Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 12(11), 2237-46.
- Wang, S. y Jiao, H. (2001). Changes in oxygen-scavenging systems and membrane lipid peroxidation during maturation and ripening in blackberry. *J. Agric. Food Chem.*, 49(3), 1612-1619.
- Wasternack, C. (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany*, 100(4), 681-697.
- Xue-Yong, Y., Wei-Jie, J. y Hong-Jun, Y. (2012). The expression profiling of the lipoxygenase (lox) family genes during fruit development, abiotic stress and hormonal treatments in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 2481-2500.

Yakubov, B., Barazani, O. y Golan-Goldhirsh, A. (2005). Combination of SCAR Primers and Touchdown-PCR for sex identification in *Pistacia vera* L.. *Scientia Horticulturae*, 103(4), 473-478.

Zavala, J. (2005). Manual de técnicas básicas de biología molecular, Volumen 7. UADY, Mérida. 117 p.

Zhao, Y., Qian, C., Chen, J., Peng, Y. y Mao, L. (2010). Responses of phospholipase D and lipoxygenase to mechanical wounding in postharvest cucumber fruits. *J Zhejiang Univ Sci B*, 11(6), 443-450.

Zhang, Y., Zhu, H., Zhang, Q., Li, M., Yan, M., Wang, R., Wang, L., Welti, R., Zhang, W. y Wang, X. (2009) Phospholipase Da1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21(8), 2357-2377.

CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN FINAL

4.1 DISCUSIÓN GENERAL

Todos los productos agrícolas comercializados internacionalmente son susceptibles a las distintas condiciones ambientales que pueden ocasionar su degradación acelerada. Los avances en el campo de la biología molecular y la genética de plantas permiten la comprensión de cómo se generan las respuestas a las condiciones de estrés, empleando principalmente técnicas genómicas, proteómicas y metabolómicas. Desde hace mucho tiempo *A. thaliana* ha sido empleada como una planta modelo para elucidar mecanismos de respuesta ante distintos tipos de estrés. Estas respuestas se encargan del mantenimiento de la homeostasis metabólica por medio de la degradación o síntesis de compuestos con funciones protectoras (Hirt y Shinozaki, 2004).

La bioinformática consiste en una intersección entre la biotecnología y las ciencias de la computación que permite la comprensión de los datos biológicos a nivel biomolecular. La bioinformática ha sido empleada como una herramienta clave para la elucidación de nuevos genes y proteínas a partir de secuencias conocidas en organismos de genoma conocido (Voet y Voet, 2006).

En base a que existen evidencias previas de la participación de las fosfolipasas D y lipoxigenasas en las rutas de respuesta a diferentes tipos de estrés en plantas modelo, en este trabajo se llevó a cabo el análisis *in silico* de genes de fosfolipasas D y lipoxigenasas del genoma de *C. papaya* por dos razones muy importantes: la primera, corroborar su existencia en los frutos de papaya en diferentes etapas de maduración y, la segunda, analizar sus patrones de expresión cuando los frutos son sometidos a daño mecánico.

De los posibles candidatos de genes que codifican para CpPLDs y CpLOXs solo dos pudieron ser identificados y también estos genes fueron los únicos que presentaron expresión diferencial en los frutos de ambos estados de maduración sometidos al daño mecánico: los genes *CpPLD α 1* y *CpLOX3*. Es factible que los demás genes participen en rutas de señalización de respuesta a otros tipos de estrés en el fruto y otros tejidos de la planta de papaya. Por ejemplo, existen evidencias que el gen *AtPLD δ* aumenta su expresión en hojas de plantas de *A. thaliana* ante el estrés por bajas temperaturas y por déficit hídrico por lo que es factible que el gen *CpPLD δ* pueda tener un comportamiento

similar en las hojas de *C. papaya* (Li *et al.*, 2004; Uraji *et al.*, 2012). Otros estudios indican que los genes *AtLOX2*, *AtLOX3*, *AtLOX4* y *AtLOX6* participan en el sistema de respuesta de hojas sometidas a daño mecánicos (Chauvin *et al.*, 2012) por lo que es factible que los genes *CpLOX2*, *CpLOX3*, *CpLOX4* y *CpLOX6* (los cuales son LOXs del tipo 2) puedan tener un comportamiento similar en las hojas de *C. papaya*. Los genes *AtLOX1.1*, *AtLOX1.2*, *AtLOX1.3*, *AtLOX5.1* y *AtLOX5.2*, los cuales todos son LOXs del tipo 1, probablemente también puedan participar en rutas de señalización de respuesta a otros tipos de estrés en el fruto y en otros tejidos de la planta de papaya (Melan *et al.*, 1993; Vellosillo *et al.*, 2007). Es posible que estas rutas de señalización se lleven a cabo en el citoplasma (TAIR, 2012).

Comúnmente los estudios acerca de los efectos de diferentes tipos de estrés en los tejidos de frutas se realizan mediante la medición de ciertos compuestos, como el JA, MeJA, ABA, PA, H₂O₂ y NO (Wang y Jiao, 2001; Oliveira *et al.*, 2011; Arreola *et al.*, 2012, Resende *et al.*, 2012). En contraste, pocas investigaciones llevan a cabo análisis sobre la expresión de genes de los frutos ante condiciones de estrés posiblemente debido a la dificultad, comparada con otros tejidos, de la extracción del material genético de los tejidos del fruto (Heitz *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2011; Xue-Yong *et al.*, 2012). En este estudio se llevaron a cabo pruebas bioquímicas y análisis de expresión de genes de *CpPLDs* y *CpLOXs* para poder elucidar y analizar el funcionamiento del sistema de respuesta a estrés por daño mecánico en frutos de papaya.

Los genes que codifican para las enzimas *CpPLDα1* y *CpLOX3* en frutos de *C. papaya* presentaron una expresión diferencial ante los tratamientos de daño mecánico así como variaciones en las mediciones del índice de peroxidación lipídica y la concentración de H₂O₂. Estas variaciones de expresión probablemente forman parte de un sistema de defensa que asegure el apropiado desarrollo de los embriones evitando la degradación de los tejidos dañados o también como un mecanismo que permita prolongar el tiempo de vida de los frutos para que estos sean consumidos y permitan la dispersión de las semillas (Raven *et al.*, 1992).

Como se mencionó anteriormente ambos genes presentaron comportamientos similares a los observados previamente en otras plantas; sin embargo, a la fecha existen muy pocas investigaciones acerca del papel que realizan las *PLDs* y las *LOXs* en los sistemas de respuesta a estrés en frutos. Por tanto, los resultados generados en esta investigación

permitirán proporcionar una noción de los posibles mecanismos de respuesta que presentan los frutos de *C. papaya* al ser sometidos a un daño mecánico y a largo plazo mediante técnicas de ADN recombinante facilitar la generación de frutos más tolerantes a este tipo de estrés favoreciendo la disminución de las pérdidas de este producto.

4.2 CONCLUSIONES GENERALES

En esta investigación se cumplieron los siguientes objetivos:

1. Se identificaron mediante análisis *in silico* las posibles secuencias homologas a genes *PLDs* y de *LOXs* en el genoma de *C. papaya*: dos fosfolipasas D (CpPLD α 1 y CpPLD δ) y ocho lipoxigenasas (AtLOX1.1, 1.2, 1.3, 2, 3, 5.1, 5.2 y 6).
2. Se elaboró un procedimiento para el análisis de la expresión diferencial de estos genes en frutos de *C. papaya* de diferentes etapas de maduración.
3. Se desarrollaron metodologías para la determinación del grado de peroxidación lipídica y la concentración de peróxido de hidrógeno en tejidos de cáscara de frutos de papaya sometidos a daño mecánico.
4. Se demostró la existencia de los genes CpPLD α 1 y la CpLOX3 en frutos maduros e inmaduros de papaya y de forma adicional se aportaron evidencias moleculares y bioquímicas que sostienen su participación en los mecanismos de respuesta a daño mecánico en frutos de *C. papaya* de diferentes etapas de maduración.

4.3 PERSPECTIVAS

A pesar que en este trabajo se demostró que los genes analizados presentan una expresión diferencial ante el daño mecánico en el fruto de *C. papaya* aún no se ha logrado demostrar su funcionalidad en este órgano. Por tanto se pretende determinar la funcionalidad de la CpPLD α 1 y la CpLOX3 en plantas transgénicas de *N. tabacum* y tomate con sobre-expresión y silenciamiento de los genes que codifican para estas. Una vez obtenidas las plantas transformadas se evaluará, por medio de pruebas bioquímicas y análisis de expresión diferencial, la respuesta al estrés ocasionado por daño mecánico en los frutos y hojas de las plantas de tomate transgénicas así como en hojas de plantas de

N. tabacum transgénicas. Simultáneamente se analizarán las posibles variaciones en los fenotipos de las plantas transgénicas generadas.

Adicionalmente, se planea realizar la determinación celular de estas proteínas en la célula vegetal por medio de técnicas de tinción para verificar la ubicación real de estas proteínas.

También se pretende verificar la existencia y participación de las CpPLDs y las CpLOXs en los mecanismos de respuesta a estrés de otros tejidos de papaya.

4.4 REFERENCIAS

- Arreola, A., Castro, E., Reyes de la Cruz, H., Beltrán, E. y García, E. (2012). Estrés oxidativo y contenido de lípidos en frutos de aguacate en respuesta a herida e infección por *Colletotrichum gloeosporoides*. *Biológicas*, 14(1), 1-7.
- Chauvin, A., Caldelari, D., Wolfender, J. y Farmer, E. (2012). Four 13-lipoxygenases contribute to rapid jasmonate synthesis in wounded *Arabidopsis thaliana* leaves: a role for lipoxygenase 6 in responses to long-distance wound signals. *New Phytologist*, 197, 566-575.
- Hirt, H. y Shinozaki, K. (2004). *Plant responses to abiotic stress*. Springer, New York. 7 p.
- Heitz, T., Bergey, D. y Ryan, C. (1997). A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Physiol*, 114(3), 1085-1093.
- Li, W., Li, M., Zhang, W., Welti, R. y Wang, X. (2004). The plasma membrane-bound phospholipase D delta enhances freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Nature Biotechnology*, 22(4), 427-33.
- Melan, M., Dong, X., Endara, M., Davis, K., Ausubel, F. y Peterman T. (1993). An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. *Plant Physiol*, 101(2), 441-50.
- Oliveira, J., Bressan-Smith, R., Campostrini, E., Da Cunha, M., Costa, E., Torres, A., Coutinho, K., Gomes, M. y Pierre A. (2011). Papaya pulp gelling: is it premature ripening or problems of water accumulation in the apoplast?. *Rev. Bras. Frutic.*, 32(4), 961-969.
- Raven, P., Evert, R. y Eichhorn, S. (1992). *Biología de las plantas*. Vol. 2. Reverte, Barcelona. 285-486 pp.
- Resende, E., Martins, P., Antunes de Azevedo, R., Jacomino, A. y Bron, I. (2012). Oxidative processes during 'golden' papaya fruit ripening. *Plant Physiol.*, 24(2): 85-94.
- The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR), 2012. TAIR Gene Search Results. Disponible en: http://www.arabidopsis.org/servlets/Search?type=general&search_action=detail&method=
-

1&show_obsolete=F&name=lipoxygenase&sub_type=gene&SEARCH_EXACT=4&SEARCH_CONTAINS=1

[Acceso 20 agosto 2012]

Uraji, M., Katagiri, T., Okuma, E., Ye, W., Anowar, M.m Masuda, C., Miura, A., Nakamura, Y., Mori, I., Shinozaki, K. y Murata, Y. (2012). Cooperative function of PLDd and PLDa1 in abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 159, 450-460.

Vellosillo, T., Martínez, M., López, M., Vicente, J., Cascón, T., Dolan, L., Hamberg, M. y Casresana, C. (2007). Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *Plant Cell*, 19(3), 831-46.

Voet, D. y Voet, J. (2006). *Bioquímica*. 3ª edición. Ed, Médica Panamericana, Argentina. 200 p.

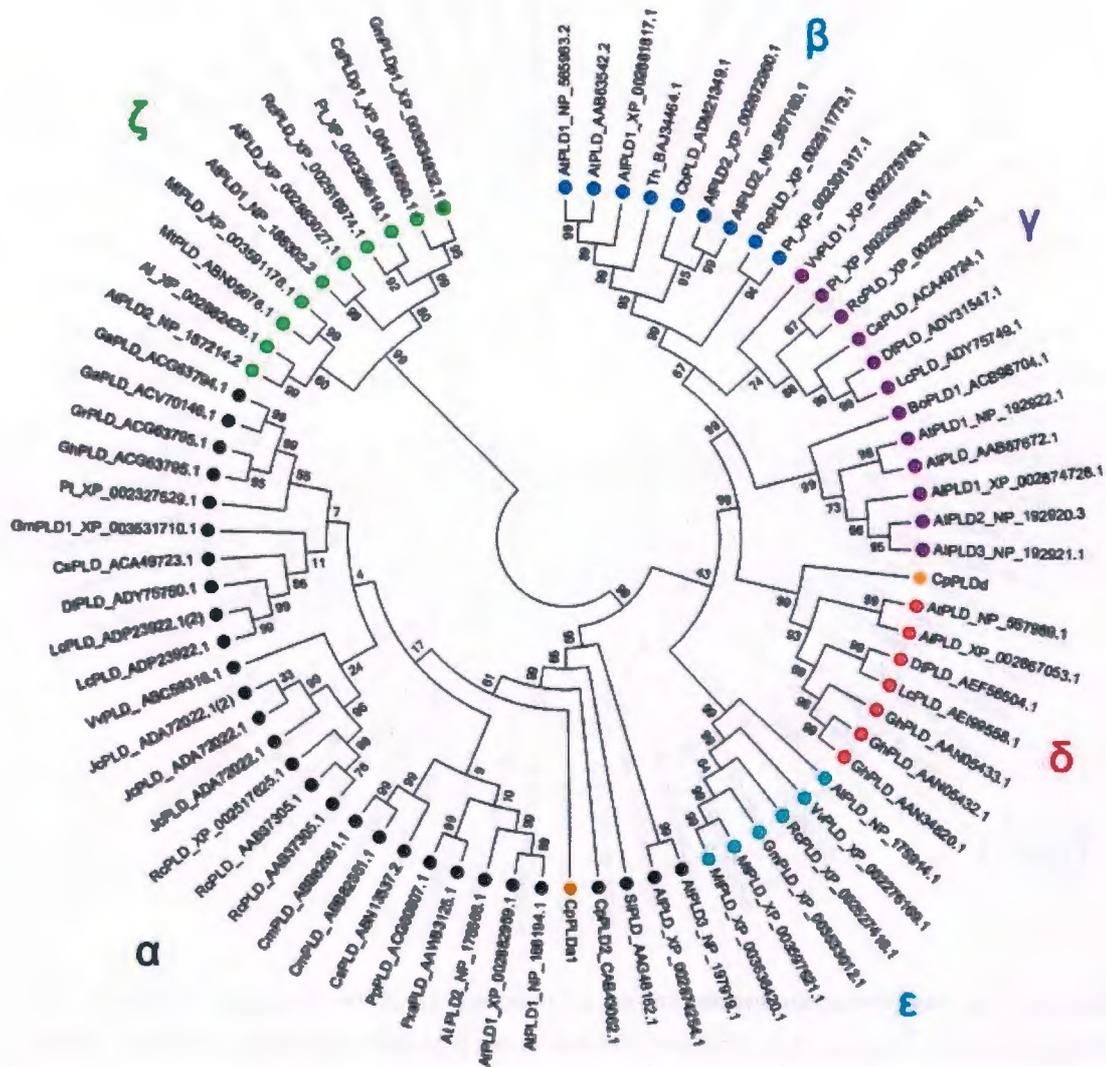
Wang, S. y Jiao, H. (2001). Changes in oxygen-scavenging systems and membrane lipid peroxidation during maturation and ripening in blackberry. *J. Agric. Food Chem.*, 49(3), 1612-1619.

Xue-Yong, Y., Wei-Jie, J. y Hong-Jun, Y. (2012). The expression profiling of the lipoxygenase (LOX) family genes during fruit development, abiotic stress and hormonal treatments in cucumber (*Cucumis sativus L.*). *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 2481-2500.

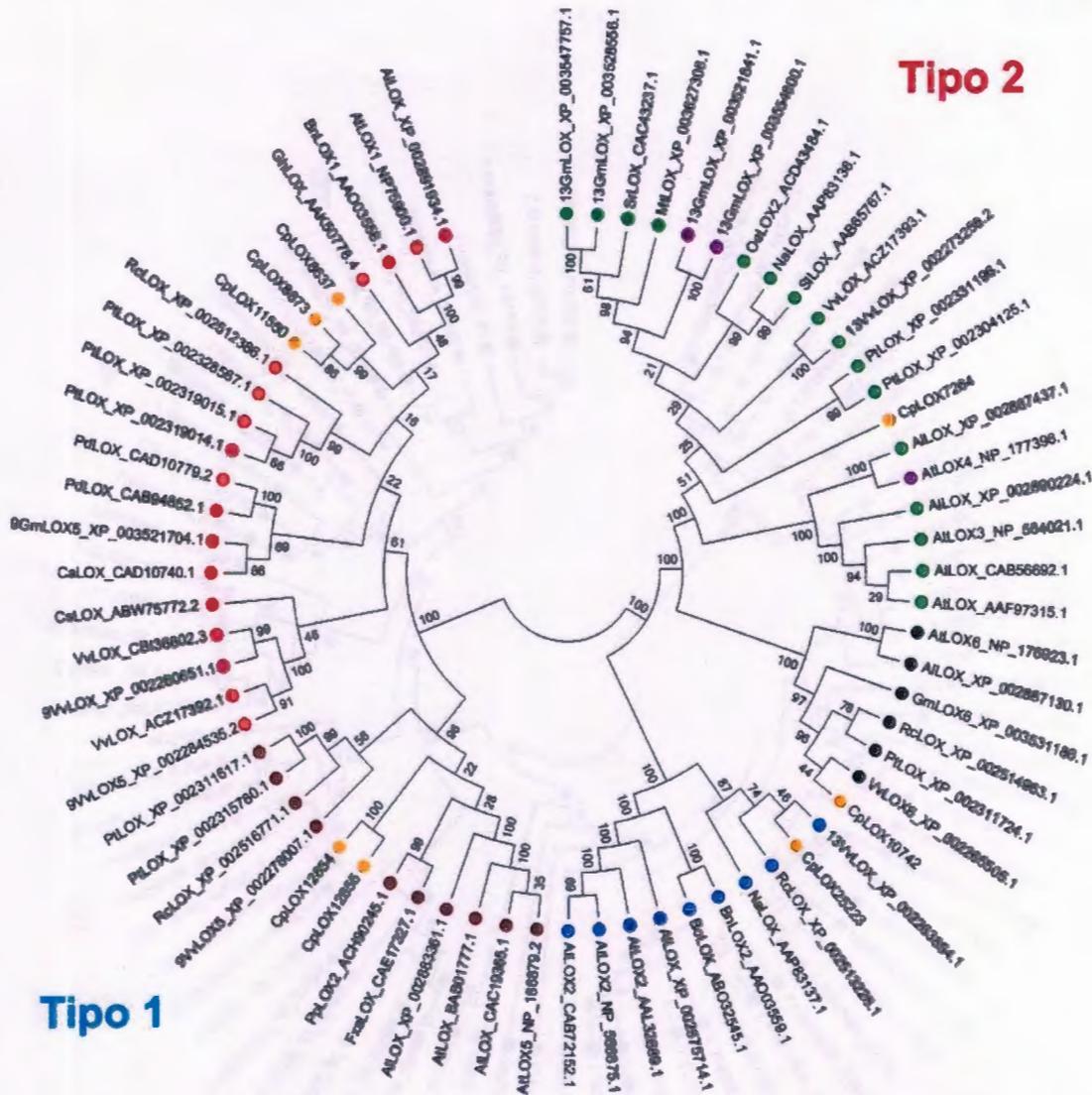
Zhang, B., Chen, K., Bowen, J., Allan, A., Espley, R., Karunairetnam S. y Ferguson, I. (2006). Differential expression within the lox gene family in ripening kiwifruit. *Journal of Experimental Botany*, 57(14), 3825-3836.

Zhang, B., Xi, W., Wei, W., Shen, J., Ferguson, I. y Chen, K. (2011). Changes in aroma-related volatiles and gene expression during low temperature storage and subsequent shelf-life of peach fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 60 (2011), 7-16.

ANEXOS



Anexo 1. Árbol filogenético de secuencias de aminoácidos de PLDs conocidas en plantas y de predicciones en *C. papaya*. Nomenclatura: círculos negros: proteínas ortólogas a AtPLD α ; círculos azules: proteínas ortólogas a AtPLD β ; círculos morados: proteínas ortólogas a AtPLD γ ; círculos rojos: proteínas ortólogas a AtPLD δ ; círculos añiles: proteínas ortólogas a AtPLD ϵ ; círculos verdes: proteínas ortólogas a AtPLD ζ ; círculos naranjas: predicciones de PLDs en *C. papaya*. Datos: método: Neighbor Joining Tree; modelo: JTT; prueba de filogenia: Bootstrap (1000 replications).



Anexo 2. Árbol filogenético de secuencias de aminoácidos de LOXs conocidas en plantas y de predicciones en *C. papaya*. Nomenclatura: círculos rojos: proteínas ortólogas a AtLOX1; círculos azules: proteínas ortólogas a AtLOX2; círculos verdes: proteínas ortólogas a AtLOX3; círculos morados: proteínas ortólogas a AtLOX4; círculos café: proteínas ortólogas a AtLOX5; círculos negros: proteínas ortólogas a AtLOX6; círculos naranjas: predicciones de LOXs en *C. papaya*. Datos: método: Neighbor Joining Tree; modelo: JTT; prueba de filogenia: Bootstrap (1000 replicaciones).

CpPLD _{al}	1	ATGGCGCATTATTTGATGCATGGCACTTTACATGCCACGGTGTATGAGGTCGATAAACTA
CpPLD _{latex}	1	ATGGCGCATTATTTGATGCATGGCACTTTACATGCCACGGTGTATGAGGTCGATAAACTA
CpPLD _{al}	61	CATTCCGGTGGCATATCAGGCTTCTTTGGCAAGATCCTGGCAAATGTTGAGGGAACAATT
CpPLD _{latex}	61	CATTCCGGTGGCATATCAGGCTTCTTTGGCAAGATCCTGGCAAATGTTGAGGGAACAATT
CpPLD _{al}	121	GGTATTGGCAAAGGAGTAACCCAGCTCTATGCTACCATTGATCTAGAAAGGGCTAGAGTT
CpPLD _{latex}	121	GGTATTGGCAAAGGAGTAACCCAGCTCTATGCTACCATTGATCTAGAAAGGGCTAGAGTT
CpPLD _{al}	181	GGAAGGACCAGAATAATAAAAGATGAACCCAATAATCCTAAATGGTATGAATCATTTTCA
CpPLD _{latex}	181	GGAAGGACCAGAATAATAAAAGATGAACCCAATAATCCTAAATGGTATGAATCATTTTCA
CpPLD _{al}	241	ATCTACTGTGCCCATATGGCTTCCAATGTTGTATTACCGTTAAAGATGACAATCCTATT
CpPLD _{latex}	241	ATCTACTGTGCCCATATGGCTTCCAATGTTGTATTACCGTTAAAGATGACAATCCTATT
CpPLD _{al}	301	GGAGCCACTTTAATTGGAAGAGCATATGTACCTGTTGAAGAAGTATCGTGGTGATCAA
CpPLD _{latex}	301	GGAGCCACTTTAATTGGAAGAGCATATGTACCTGTTGAAGAAGTATCGTGGTGATCAA
CpPLD _{al}	361	GTGGATAGGTGGGTTGAAATCTTGGATGAAGACAAAAACCCATTGAGGGAGATTCCAAG
CpPLD _{latex}	361	GTGGATAGGTGGGTTGAAATCTTGGATGAAGACAAAAACCCATTGAGGGAGATTCCAAG
CpPLD _{al}	421	ATCCCTGTGAAGCTTCAATTTTTTGTATGTAAAAAAGACAGTAATTGGAATATGGGTATC
CpPLD _{latex}	421	ATCCCTGTGAAGCTTCAATTTTTTGTATGTAAAAAAGACAGTAATTGGAATATGGGTATC
CpPLD _{al}	481	AAGGGTGCTAGGTATCTTGGTGTGCCTTACACGTTCTACTCACAGAGACGAGGATGTAGA
CpPLD _{latex}	481	AAGGGTGCTAGGTATCTTGGTGTGCCTTACACGTTCTACTCACAGAGACGAGGATGTAGA
CpPLD _{al}	541	GTTTCTTTATACCAAGATGCTCATGTTCCGGACGGCTTCATTCCATAAAATTCCTTTAGCA
CpPLD _{latex}	541	GTTTCTTTATACCAAGATGCTCATGTTCCGGACGGCTTCATTCCATAAAATTCCTTTAGCA
CpPLD _{al}	601	GGAGGAACGTATTATGAGCCTCATAGATGCTGGGAAGATGTTTTGTATGCAATCACCAAT
CpPLD _{latex}	601	GGAGGAACGTATTATGAGCCTCATAGATGCTGGGAAGATGTTTTGTATGCAATCACCAAT
CpPLD _{al}	661	GCGAGACACCTGATCTACATTACTGGCTGGTCAGTTTATACTGAAATCACTTTGATACGT
CpPLD _{latex}	661	GCGAGACACCTGATCTACATTACTGGCTGGTCAGTTTATACTGAAATCACTTTGATACGT
CpPLD _{al}	721	GACTCAAGGAGGCCAAAGCCAGGAGGAGATGTTACTCTTGGTGAGCTACTTAAGCAGAAG
CpPLD _{latex}	721	GACTCAAGGAGGCCAAAGCCAGGAGGAGATGTTACTCTTGGTGAGCTACTTAAGCAGAAG
CpPLD _{al}	781	GCTAGTGAAGGTGTTAAGGTTCTCATGCTTCTTTGGGATGACAGAACCTCTGTTGGTTTA
CpPLD _{latex}	781	GCTAGTGAAGGTGTTAAGGTTCTCATGCTTCTTTGGGATGACAGAACCTCTGTTGGTTTA
CpPLD _{al}	841	CTGAAAAAGGATGGACTCATGGCTACGCATGATGAAGAAACTGCAAACACTTCCAATAAT
CpPLD _{latex}	841	CTGAAAAAGGATGGACTCATGGCTACGCATGATGAAGAAACTGCAAACACTTCCAATAAT
CpPLD _{al}	901	ACTGATGTTCACTGTGTCTATGCCCGTAATCCTGATGATGGGGGGAGCTTCGTTCAA
CpPLD _{latex}	901	ACTGATGTTCACTGTGTCTATGCCCGTAATCCTGATGATGGGGGGAGCTTCGTTCAA
CpPLD _{al}	961	GGCTTACAAATCTCTACCATGTTCACTCATCACCAGAAGATTGTGGTGGTCGATGGTGAG
CpPLD _{latex}	961	GGCTTACAAATCTCTACCATGTTCACTCATCACCAGAAGATTGTGGTGGTCGATGGTGAG
CpPLD _{al}	1021	ATGCC TAGTGGGGAATCCAGATGAGGAGAATTGTTAGTTTTGTTGGGGGCATTGATCTT
CpPLD _{latex}	1021	ATGCC TAGTGGGGAATCCAGATGAGGAGAATTGTTAGTTTTGTTGGGGGCATTGATCTT

CpPLDa1 1081 TGTGATGGTAGATATGATACCCCTTCCATTCTCTATTTCAGGACATTGGATACTGCACAC
 CpPLDlatex 1081 TGTGATGGTAGATATGATACCCCTTCCATTCTCTATTTCAGGACATTGGATACTGCACAC

CpPLDa1 1141 CATGATGATTTCCATCAGCCAACTTTGCAGGTAGTTCTATCACAAAAGGGGGCCCCAGG
 CpPLDlatex 1141 CACGATGATTTCCATCAGCCAACTTTGCAGGTAGTTCTATCACAAAAGGTGGCCCCAGG

CpPLDa1 1201 GAACCTTGGCATGATATCCATTCTCGATTGGAAGGTCCCGTTGCCTGGGATGTGCTGTTT
 CpPLDlatex 1201 GAACCTTGGCATGATATCCATTCTCGATTGGAAGGTCCCGTTGCCTGGGATGTGCTGTTT

CpPLDa1 1261 AATTTTGAGCAAAGATGGAGACAACAAGGTGGGAAGGATGTTCTGGTTAATCTGAGAGAG
 CpPLDlatex 1261 AATTTTGAGCAAAGATGGAGACAACAAGGTGGGAAGGATGTTCTGGTTAATCTGAGAGAG

CpPLDa1 1321 CTTGATAATATTATTATTCCCCCATCTCCTGTTATGTTTCCAGATGATCGTGAGACATGG
 CpPLDlatex 1321 CTTGATAATATTATTATTCCCCCATCTCCTGTTATGTTTCCAGATGATCATGAGACATGG

CpPLDa1 1381 AATGTCCAGTTGTTTAGATCCATTGATGGCGGTCTGCTTTTGGTTTTCTGAGACACCC
 CpPLDlatex 1381 AATGTCCAGTTGTTTAGATCCATTGATGGTGGTCTGCTTTTGGTTTTCTGAGACACCC

CpPLDa1 1441 GAAGAGGCTGCCAGAGCTGGGCTTGTAAAGTGGGAAGGATAATATCATTGATCGAAGCATT
 CpPLDlatex 1441 GAAGAGGCTGCCAGAGCTGGGCTTGTAAAGTGGGAAGGATAATATCATTGATCGAAGCATT

CpPLDa1 1501 CAGGATGCTTATATTAATGCTATTTCGAAGAGCAAAAAATTTTATATATATTGAAAATCAG
 CpPLDlatex 1501 CAGGATGCTTATATTAATGCTATTTCGAAGAGCAAAAAATTTTATATATATTGAAAATCAG

CpPLDa1 1561 TATTTCTCGGAAGCTCTTTTGACTGGAGTTCGATGATATCAAGCGTGAGGATATTAAT
 CpPLDlatex 1561 TATTTCTCGGAAGCTCTTTTGACTGGAGTTCGATGATATCAAGCGTGAGGATATTAAT

CpPLDa1 1621 GCTTTACATCTTATACCAAAGGAGCTTTCACCTCAAGATTGTTAGTAAGATTGAACGTGGG
 CpPLDlatex 1621 GCTTTACATCTTATACCAAAGGAGCTTTCACCTCAAGATTGTTAGTAAGATTGAACGTGGG

CpPLDa1 1681 GAGAGATTCAGTGTATGTTGTTGTTTCTATGTGGCCAGAAGGGGTACCGGAGAGTGCA
 CpPLDlatex 1681 GAGAGATTCAGTGTATGTTGTTGTTTCTATGTGGCCAGAAGGGGTACCGGAGAGTGCA

CpPLDa1 1741 TCTGTTTCAGGCAATATTAGATTGGCAGAGAAGGACAATGGAAATGATGTATAAAGACATC
 CpPLDlatex 1741 TCTGTTTCAGGCAATATTAGATTGGCAGAGAAGGACAATGGAAATGATGTATAAAGACATC

CpPLDa1 1801 ATTCAGCTCTGAGAGCTAAAGACCGTGAAGAGGATCCTAGAACTATTTGACTTTTTTC
 CpPLDlatex 1801 ATTCAGCTCTGAGAGCTAAAGATCGTGAAGAGGATCCTAGAACTATTTGACTTTTTTC

CpPLDa1 1861 TGCCTTGAAACCGGGAAGTGAAGAAATCTGGAGAATATGAACCTTCAGAGAGACCAGAG
 CpPLDlatex 1861 TGCCTTGAAACCGGGAAGTGAAGAAATCTGGAGAATATGAACCTTCAGAGAGACCAGAG

CpPLDa1 1921 GATGACTCCGATTATATTAGAGCACAAGAAGCCCGTCGTTTCATGATTTATGTTTCATACC
 CpPLDlatex 1921 GATGACTCCGATTATATTAGAGCACAAGAAGCCCGTCGTTTCATGATTTATGTTTCATACC

CpPLDa1 1981 AAGATGATGATTGTTGATGATGAATACATCATAGTTGGATCTGCCAACATCAATCAGCGA
 CpPLDlatex 1981 AAGATGATGATTGTTGATGATGAATACATCATAGTTGGATCTGCCAACATCAATCAGCGA

CpPLDa1 2041 TCAATGGATGGTGCCAGGGACTCAGAGATAGCTATGGGGGCTTACCAACCATACCATTG
 CpPLDlatex 2041 TCAATGGATGGTGCCAGGGACTCAGAGATAGCTATGGGGGCTTACCAACCATACCATTG

CpPLDa1 2101 ACAATCAACCAGCCAGCACGGGGTCAAATTCATGGTTTTCGTATGGCATTGTGGTATGAG
 CpPLDlatex 2101 ACAATCAACCAGCCAGCACGGGGTCAAATTCATGGTTTTCGTATGGCATTGTGGTATGAG

CpPLDa1	2161	CACCTTGGC	ATGCTCGATGACACCTTCCTT	GAGCCAGAAAACATAGAGTGTGTCCAGAAG
CpPLDlatex	2161	CACCTTGGC	ATGCTCGATGACACCTTCCTT	GAGCCAGAAAACATAGAGTGTGTCCAGAAG
CpPLDa1	2221	GTGAACCGAGTTGCTGGCAAATATTGGGATCTTACGCGAGTGAGTTACTTGAACATGAC		
CpPLDlatex	2221	GTGAACCGAGTTGCTGGCAAATATTGGGATCTTACGCGAGTGAGTTACTTGAACATGAC		
CpPLDa1	2281	TTGCCTG	CCCACTTGCTTCGCTACCCAATTG	TGTTTCTAGTGAAGGAGATGTTACAGAG
CpPLDlatex	2281	TTGCCTG	CCCACTTGCTTCGCTACCCAATTG	TGTTTCTAGTGAAGGAGATGTTACAGAG
CpPLDa1	2341	CTGCCGGGAACAGAATTCTTCCCGACACTAAGGCTCGTGTTCTTGGTGCAAATCGGAT		
CpPLDlatex	2341	CTGCCGGGAACAGAATTCTTCCCGACACTAAGGCTCGTGTTCTTGGTGCAAATCGGAT		
CpPLDa1	2401	TACCTCCCTCCAATATTAACAACT		
CpPLDlatex	2401	TACCTCCCTCCAATATTAACAACT		

Anexo 3. Comparación de las secuencias nucleotídicas de la secuenciación del gen aislado *CpPLDa1* (*CpPLDa1*) y del gen aislado en látex de papaya (*CpPLDlatex*).

CpPLDa1	1	MAHYLMHGTLHATVVEVDKLSHGGISGFFGKILANVEGTIGIGKGVTLQYATIDLERARV
CpPLDlatex	1	MAHYLMHGTLHATVVEVDKLSHGGISGFFGKILANVEGTIGIGKGVTLQYATIDLERARV
CpPLDa1	61	GRTRIIKDEPNPKWYESFHIYCAHMASNVVFTVKDDNPIGATLIGRAYVPVEELMRGDQ
CpPLDlatex	61	GRTRIIKDEPNPKWYESFHIYCAHMASNVVFTVKDDNPIGATLIGRAYVPVEELMRGDQ
CpPLDa1	121	VDRWVEILDEDKNPIEGDSKILVVKLQFFDVKKDSNWNMGIKGARYLGPYTFYSQRRGCR
CpPLDlatex	121	VDRWVEILDEDKNPIEGDSKILVVKLQFFDVKKDSNWNMGIKGARYLGPYTFYSQRRGCR
CpPLDa1	181	VSLYQDAHVPDGFIPKIPLAGGTYEYEPHRCWEDVFDAITNARHLIYITGWSVYTEITLIR
CpPLDlatex	181	VSLYQDAHVPDGFIPKIPLAGGTYEYEPHRCWEDVFDAITNARHLIYITGWSVYTEITLIR
CpPLDa1	241	DSRRPKPGGDVTLGELLKQKASEGVKVLMLVWDDRTSVGLLKKDGLMATHDEETANYFQN
CpPLDlatex	241	DSRRPKPGGDVTLGELLKQKASEGVKVLMLVWDDRTSVGLLKKDGLMATHDEETANYFQN
CpPLDa1	301	TDVHCVLCPRNPDDGGSFVQGLQISTMFTTHQKIVVVDGEMPSGESQMRRIVSFVGGIDL
CpPLDlatex	301	TDVHCVLCPRNPDDGGSFVQGLQISTMFTTHQKIVVVDGEMPSGESQMRRIVSFVGGIDL
CpPLDa1	361	CDGRYDTPFHSLFRTLDTAHHDDFHQPNFAGSSITKGGPREPWHDIHSRLEGPVAWDVLF
CpPLDlatex	361	CDGRYDTPFHSLFRTLDTAHHDDFHQPNFAGSSITKGGPREPWHDIHSRLEGPVAWDVLF
CpPLDa1	421	NFEQRWRQGGKDVLVNLRDLNIIIPSPVMFPDDRETWNVQLFRSIDGGAAFGFPETP
CpPLDlatex	421	NFEQRWRQGGKDVLVNLRDLNIIIPSPVMFPDDRETWNVQLFRSIDGGAAFGFPETP
CpPLDa1	481	EEAARAGLVSGKDNIIIDRSIQDAYINAIIRRAKNFIYIENQYFLGSSFDWSSDDIKREDIN
CpPLDlatex	481	EEAARAGLVSGKDNIIIDRSIQDAYINAIIRRAKNFIYIENQYFLGSSFDWSSDDIKREDIN
CpPLDa1	541	ALHLIPKELSLKIVSKIERGERFTVYVVVPMWPEGVPESASVQAILDWQRRTMEMMYKDI
CpPLDlatex	541	ALHLIPKELSLKIVSKIERGERFTVYVVVPMWPEGVPESASVQAILDWQRRTMEMMYKDI
CpPLDa1	601	IQALRAKDREEDPRNYLTFEFLGNREVKKSGEYEPSERPEDDSYIRAQEARRFMIYVHT
CpPLDlatex	601	IQALRAKDREEDPRNYLTFEFLGNREVKKSGEYEPSERPEDDSYIRAQEARRFMIYVHT
CpPLDa1	661	KMMIVDDEYIIVGSANINQRSMDGARDSEIAMGAYQPYHLTINQPARGQIHGFRMALWYE
CpPLDlatex	661	KMMIVDDEYIIVGSANINQRSMDGARDSEIAMGAYQPYHLTINQPARGQIHGFRMALWYE
CpPLDa1	721	HLGMLDDTFLEPENIECVQKVN RVAGKYWDLYASELLEHDLPGHLLRYPIGVSSEGDVTE
CpPLDlatex	721	HLGMLDDTFLEPENIECVQKVN RVAGKYWDLYASELLEHDLPGHLLRYPIGVSSEGDVTE
CpPLDa1	781	LPGTEFFPDTKARVLGAKSDYLPPILTT
CpPLDlatex	781	LPGTEFFPDTKARVLGAKSDYLPPILTT

Anexo 4. Comparación de la predicción de secuencias de aminoácidos del gen aislado *CpPLDa1* (CpPLDa1) y del gen aislado en látex de papaya (CpPLDlatex).