

**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO.
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**



**ÁREA TEMÁTICA:
BIOTECNOLOGÍA PECUARIA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**CARACTERIZACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN bHLH EN
AGUACATE NATIVO MEXICANO (*Persea americana var. drymifolia*)**

**TESIS
QUE PRESENTA:
BIÓLOGO HUBER LEÓN CORONA. Correo electrónico:**

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

**DIRECTOR DE TESIS
D.C. RODOLFO LÓPEZ GÓMEZ. Correo electrónico;**

Morelia Michoacán; febrero 2018



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

DRA. LILIANA MÁRQUEZ BENAVIDES
COORDINADORA GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E

Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "Caracterización del factor de transcripción bHLH en aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var *drymifolia*)" presentado por el Biol. Huber León Corona con matrícula no. 0714356G, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestro en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

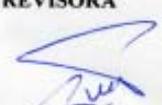
A T E N T A M E N T E

Morelia, Michoacán, a 23 de enero de 2018

MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA



Dr. Rodolfo López Gómez
Director de Tesis



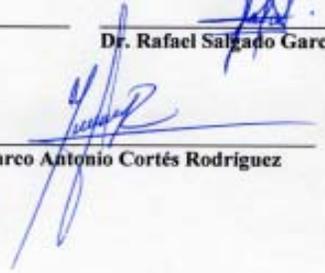
Dra. María Guadalupe Zavala Páramo



Dr. Joel Edmundo López Meza



Dr. Rafael Salvado Garciglia



Dr. Marco Antonio Cortés Rodríguez

DEDICATORIA

La presente tesis la dedico a mis padres que siempre estuvieron en los momentos buenos y malos que conlleva el estudio, los cuales me alentaron para seguir adelante.

AGRADECIMIENTO

Agradezco profundamente al Doctor Rodolfo López Gómez por darme la oportunidad de pertenecer a su laboratorio y por el apoyo recibido cuando le comenté que pretendía hacer la maestría, agradezco sus consejos que me dio al momento de estar llevando a cabo este proyecto, de igual manera agradezco a Luis María por sus consejos, su amistad y sobre todo la guía que me brindó en este proceso es algo por lo cual estaré muy agradecido contigo Luis.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio a los cuales a algunos los considero verdaderos amigos que me apoyaron en los momentos más difíciles y en los momentos buenos, así como sus pláticas que me distraían cuando el trabajo era mucho.

Agradezco a Fernando por esas pláticas interminables que seguido tenemos por sus consejos y por su amistad.

Agradezco a la mesa de sinodales por sus consejos para llevar a buen fin este proyecto, gracias por sus consejos, sus llamadas de atención y por su participación en este proyecto que de alguna u otra forma influyeron en mi formación, gracias por todo.

Así mismo agradezco a CONACYT y al programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas por aceptarme.

Finalmente agradezco a mi familia que siempre estuvo apoyándome en las buenas y las malas.

A todos ustedes mi más sincero respeto y agradecimiento.

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE CUADROS	II
RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
2.1. Factores de Transcripción	6
2.2. Familias de Factores de Transcripción.	7
2.2.1. Factores de transcripción bHLH	11
2.3. Filogenia de los factores bHLH	12
2.4. Caracterización de los factores bHLH	14
2.5. Funciones asociadas a los factores bHLH	15
2.5.1. Funciones asociadas a los factores bHLH en plantas	16
2.6. Génesis de la fisiología de semillas	18
3. Justificación	21
4. Hipótesis.....	22
5. Objetivo general	22
6. Objetivos particulares	22
7. Materiales y Métodos	23
7.1 Material biológico.	23
7.2 Ensamble de secuencias EST.	23

7.3	Análisis de secuencias tipo bHLH	23
7.4	Modelado 3D de la proteína bHLH.....	24
7.5	Diseño de oligonucleótidos	24
7.6	Extracción y preparación de RNA	25
7.7	Extracción DNA plasmídico.....	25
7.8	Cuantificación y resolución de ácidos nucleicos	26
7.9	Síntesis de cDNA.....	26
7.10	PCR de punto final para el gen bHLH.....	26
7.11	Ensayos de PCR Tiempo real.....	27
7.12	Ensayos de PCR semicuantitativo	27
8.	Resultados	28
8.1	Ensamble de secuencias ESTs.....	28
8.2.	Análisis de secuencias tipo bHLH	30
8.3.	Modelado 3D de la proteína del factor bHLH	34
8.4	Análisis de expresión del gen bHLH de aguacate por PCR Tiempo Real....	39
8.4.1	Extracción de RNA.....	39
8.4.2	Análisis de expresión del gen actina y bHLH	40
8.5.	Ensayo de expresión del gen bHLH de aguacate por PCR semicuantitativo	42
8.6.	Ensayo de expresión del gen bHLH en diferentes estructuras de la planta.	43
9.	Discusión.....	45
10.	Conclusiones.....	52
11.-	Perspectivas.....	53
12.	Literatura citada.....	54
Apéndice I.	61

Apéndice II	63
Mini prep lisis alcalina.	63
Apéndice III	65
Apéndice IV	66

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Motivo HLH.	8
Figura 2. Motivo dedos de zinc.	9
Figura 3. Cremallera de leucina.	10
Figura 4. Motivo bHLH.	11
Figura 5. ORF para el factor de transcripción bHLH de semilla de aguacate nativo mexicano.	30
Figura 6. Alineamiento de la secuencia se <i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i> con las secuencias con mayor cobertura e identidad.	31
Figura 7. Alineamiento de los motivos bHLH.	32
Figura 8. Alineamiento de la secuencia de <i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i> con la secuencia Zoupi de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	33
Figura 9. Modelos 3D de los motivos bHLH.	34
Figura 10. Modelos 3D de las proteínas con el programa bioinformático I-TASSER.)	36
Figura 11. Modelado tridimensional de proteínas bHLH.	38
Figura 12. Comparación de las cuatro proteínas, buscando regiones estructurales similares.	39
Figura 13. Expresión de actina (a) y bHLH (b).	41
Figura 14. Ensayo de expresión relativa del gen bHLH PCR-tiempo real.	42
Figura 15. Ensayo de expresión del gen bHLH por PCR semicuantitativo.	44
Figura 16. Ensayo de PCR punto final en las diferentes estructuras de la planta de aguacate nativo mexicano.	45
Figura 17. Blast local en la base de datos del transcriptoma de aguacate nativo mexicano.	50

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Porcentajes de identidad y similitud del gen bHLH de <i>P. americana</i> con secuencias identificadas	31
Cuadro 2. Predicción de características de las proteínas	37
Cuadro 3. Niveles de transcripción de bHLH encontrados en la base de datos del transcriptoma de aguacate nativo mexicano	51

RESUMEN

Las proteínas que contienen un dominio bHLH referido como proteínas bHLH, están involucradas en una gran variedad de procesos de regulación, como la neurogénesis, miogénesis, desarrollo del corazón en animales, control de la absorción de fosfato, la glucólisis en levadura, la modulación de las vías de metabolismo secundario, la diferenciación epidérmica y las respuestas al medio ambiente en las plantas. Las secuencias de bHLH constan de entre 50 – 60 aminoácidos con la siguiente distribución: 1) 10-15 aminoácidos en su mayor parte básicos (región base); 2) 40 aminoácidos que forman dos α hélices anfipáticas separadas por un loop de longitud variable (región hélice-loop-hélice o bHLH). En estudios de transcriptoma de aguacate se obtuvieron 123 lecturas (reads) de librerías de semilla de aguacate cuyo primer acercamiento a su descripción nos mostró una cercana relación con factores de transcripción tipo bHLH de *Arabidopsis thaliana*. En análisis bioinformáticos de secuencias de este tipo se confirmó que la secuencia correspondía a un factor de transcripción bHLH de secuencia única, al cual se le realizaron estudios de modelado 3D para inferir su relación con los ya descritos. Se realizaron estudios de expresión en el desarrollo de semilla de fruto de aguacate nativo mexicano por PCR semicuantitativo y qPCR tiempo real, mostrando una expresión constante a los 1 y 4 meses, y una disminución a los 8 meses. Asimismo, se observó que este factor parece ser específico de la semilla. Hasta donde sabemos este es el primer factor de transcripción tipo bHLH aislado y caracterizado de aguacate nativo mexicano.

Palabras clave: Factor de transcripción, bHLH, aguacate, regulación, transcripción.

ABSTRACT

Proteins containing a bHLH domain (referred to as bHLH proteins), are involved in a wide variety of regulatory processes, such as neurogenesis, myogenesis, animal heart development, phosphate uptake control, yeast glycolysis, Modulation of secondary metabolism pathways, epidermal differentiation and environmental responses in plants. The bHLH sequences consist 50-60 amino acids with the following distribution: 1) 10-15 amino acids, for the most part basic (base region); 2) 40 amino acids that form two α -amphipathic helices separated by a variable-length loop (helix-loop-helix region or bHLH). In studies avocado transcriptome, 123 reads in avocado seed libraries were obtained, whose first approach to their description showed a close relationship with bHLH type transcription factors of *Arabidopsis thaliana*. In bioinformatic analyzes of sequences of this type, the sequence was confirmed to correspond to a single-sequence bHLH transcription factor, to which 3D modeling studies were carried out to infer their relationship with those already described. Expression studies were performed on the development of avocado fruit seed by semi-quantitative PCR and real time qPCR, showing a constant expression on 1 and 4 months, and a decrease in 8. Also this factor only was detected its expression in seed no in another plant tissues suggesting seed organospecificity. Until we know this is the first report of a bHLH transcription factor in Mexican native avocado.

Key words: Transcription factor, bHLH, avocado, regulation, transcription.

1. Introducción

La investigación de los recursos animales y vegetales, en los últimos años ha logrado avances muy significativos, sobre todo desde que se han aplicado técnicas de biología molecular. La biotecnología se ha convertido en una poderosa herramienta de trabajo con múltiples y diversos campos de acción en la ciencia, y gracias a las técnicas moleculares, ha sido posibles descubrimientos de importantes y nuevas áreas de aplicación, tanto en las áreas alimentarias e industrial, la investigación biotecnológica ha generado alternativas valiosas para una producción sustentable (Finnegan y McElroy, 1994).

La biotecnología moderna está compuesta por una variedad de técnicas derivadas de la investigación en biología celular y molecular, las cuales pueden ser utilizadas en cualquier industria que utilice microorganismos o células vegetales y animales. Esta tecnología permite la transformación de diversas industrias como la agricultura, industrias basadas en el carbono, energía, productos químicos, farmacéuticos y manejo de residuos o desechos, debido a que la investigación en ciencias biológicas está efectuando avances vertiginosos y los resultados no solamente afectan una amplitud de sectores sino que también facilitan enlace entre ellos (Fári y Kralovánszky 2006).

Todos estos avances son debido a los estudios de los genes, los cuales son secuencias o segmentos de DNA (ácido desoxirribonucleico) necesario para la síntesis de ARN (Ácido Ribonucleico) funcional, como el ARNt (Transferencia) o el ARNr (Ribosomal) y más activamente el ARNm (mensajero), el cual lleva la tarea de codificar las proteínas (Lodish *et al.*, 2005). Todos los organismos poseen formas de

controlar cuándo y dónde se pueden transcribir sus genes, tal control génico depende de las proteínas de unión al DNA, denominadas factores de transcripción, los cuales se unen al DNA y actúan como interruptores, activando o reprimiendo la transcripción de genes específicos, estos factores de transcripción se dividen en 4 familias las cuales comprenden, dedos de zinc, cremalleras de leucina, motivos HLH y por último motivos bHLH, el cual es importante en este estudio.

El dominio básico bHLH es un motivo de aminoácidos altamente conservado que consta de 50-60 aminoácidos que forman dos segmentos, las proteínas que contienen un dominio bHLH están involucradas en una gran variedad de procesos de regulación, así como están implicadas en las respuestas al medio ambiente en plantas (Jones, 2004). De acuerdo con análisis filogenéticos existe una gran diversidad de más de 50 proteínas bHLH en un número de grupos distintos presentes en los genomas de animales y plantas (Atchley y Fitch 1997; Ledent y Vervoort 2001; Jones 2004). Los genomas de *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa* codifican un mayor número de estos factores de transcripción bHLH, que los identificados en animales (Buck y Atchley 2003; Heim *et al.*, 2003; Toledo-Ortiz *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006). En estudios de *Arabidopsis* por Kondou y colaboradores en 2008, observaron que un gen tipo bHLH, solo se expresa en silicuas, en ninguna otra estructura de la planta. Así en otro estudio realizado en uva por Nicolas y colaboradores (2013), observaron que un factor tipo bHLH, tiene una expresión en toda la planta, aunque es una expresión baja y la cual es muy abundante en el fruto y la cual su mayor expresión es en la parte del mesocarpo, la expresión en semilla es baja.

En un trabajo previo realizado por nuestro grupo de investigación sobre el transcriptoma de semilla de aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) de 4 meses de desarrollo, se obtuvieron lecturas muy abundantes que en un ensayo blast preliminar sugieren un mensajero que codifica para un factor de transcripción tipo bHLH. Debido a que se ha demostrado el papel central que tienen estos factores de transcripción en el desarrollo de la semilla de plantas, es de una gran importancia el estudio y descripción de este tipo de genes que pudiesen ser ortólogos a los ya descritos en otros modelos vegetales, lo cual ayudará a estudiar el desarrollo de la semillas y embrión del aguacate nativo mexicano, ya que hay evidencias que sugieren que este tipo de factores determinan por ejemplo el tamaño de la semilla.

2. Antecedentes

El aguacate es nativo de América, el árbol se originó en Mesoamérica, que es la región del centro de México y Guatemala (William, 1977). México es uno de los países con amplia diversidad de aguacates, esta gran variedad puede ser debida a las diferentes condiciones ambientales existentes en el territorio nacional y a la naturaleza que ha conferido al aguacate de mecanismos que maximizan el cruzamiento con otros tipos y, por lo tanto, incrementa la variabilidad genética ampliando la adaptación a un mayor número de ambientes (Bergh, 1992).

Los recursos genéticos del aguacate son una fuente única de genes que pueden utilizarse para el mejoramiento genético de cultivares, como portainjertos e interinjertos. Estos recursos han estado desapareciendo muy rápido durante las pasadas dos o tres décadas, debido a factores como el cambio de uso de suelo, sequías, enfermedades del suelo; todos estos factores dan como resultado la erosión genética, por lo que existe la necesidad urgente de rescatar los recursos genéticos que están en peligro de desaparecer y que puedan utilizarse en el futuro, antes que estos recursos se pierdan para siempre (Ben-Ya'acov *et al.*, 1992).

En la actualidad, los árboles de aguacate se forman por lo general de dos partes resultantes del injerto: la copa y la raíz, la copa tiene origen del cultivar injertado que normalmente posee una importancia comercial y que también forma parte del tronco, mientras que la raíz es parte del portainjerto y que por lo general también contribuye a la base del tronco; sin embargo, también existe la posibilidad de tener un tronco intermedio que proviene de un interinjerto entre el portainjerto y el cultivar (Brooks y Olmo, 1972).

En el caso de los portainjertos, se buscan atributos que confieran principalmente una buena adaptación del árbol y que finalmente resulte en una unidad productiva eficiente, por lo tanto, la elección del portainjerto es de gran importancia ya que puede resultar en el éxito o fracaso de una plantación debido principalmente a que este posee las características adaptativas de donde se realiza la plantación (Brokaw, 1977). Es por esta razón por la cual es importante el estudio del aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*) ya que en la actualidad en nuestro país se utiliza como portainjerto para la variedad Hass que es el cultivar más importante del país, por lo tanto, es importante el estudio genético del aguacate nativo mexicano ya que es un reservorio genético muy importante que le puede conferir resistencia a los cultivares.

Pero ¿cómo se expresan los genes o cuales son los reguladores que interfieren en la expresión de los mismos?

¿Cómo determina una célula cuál de sus miles de genes transcribe? Tal vez el concepto más importante, uno que se aplica a todas las especies en la Tierra, se basa en un grupo de proteínas conocidas como reguladores de la transcripción.

Estas proteínas reconocen secuencias específicas de ADN (normalmente 5-10 pares de nucleótidos de longitud) que a menudo se llaman secuencias reguladoras cis, porque deben estar en el mismo cromosoma.

Los reguladores de la transcripción se unen a estas secuencias que están dispersas a través de los genomas, y esta unión pone en marcha una serie de reacciones que en última instancia específica qué genes se han de transcribir y a qué ritmo. Aproximadamente el 10% de los genes codificadores de proteínas de la mayoría de

los organismos están dedicados a los reguladores de la transcripción, convirtiéndolos en una de las clases más grandes de proteínas en la célula (McKnight y Yamamoto, 1993).

En la mayoría de los casos, un determinado regulador de transcripción reconoce su propia secuencia cis-reguladora, que es diferente de los reconocidos por todos los otros reguladores en la célula. La transcripción de cada gen es, a su vez, controlada por su propia colección de secuencias cis-reguladoras. Estos típicamente se encuentran cerca del gen, a menudo en la región intergénica directamente río arriba del punto de inicio de la transcripción del gen. Aunque algunos genes están controlados por una única secuencia reguladora cis que es reconocida por un solo regulador de transcripción, la mayoría tiene arreglos complejos de secuencias reguladoras cis, cada una de las cuales es reconocida por un regulador de transcripción diferente. Por lo tanto, las posiciones, la identidad y la disposición de las secuencias cis-reguladoras -que son una parte importante de la información incrustada en el genoma- determinan en última instancia el tiempo y el lugar en que cada gen se transcribe (Watson *et al.*, 2013)

2.1. Factores de Transcripción

Un factor de transcripción es una proteína que reconoce secuencias específicas de DNA, controlando así la transcripción de la información genética. Las regiones de control de la transcripción de la mayoría de los genes contienen sitios de unión para múltiples factores de transcripción, la transcripción de dichos genes varía en función del conjunto de factores de transcripción que se expresan y se activan en cada tipo

de células en cada momento, esto implica que los factores de transcripción, reguladores de la expresión genética, deben estar, a su vez, estrictamente regulados (Calkhovén y Geert, 1996). La actividad de los factores de transcripción y en concreto su capacidad para reconocer el DNA con suficiente afinidad puede regularse por la interacción directa con ligandos como hormonas, metales (Cu, Zn, Cd) o aminoácidos (Thiele, 1992).

En muchos casos, la capacidad de los factores de transcripción para unirse a secuencias específicas de DNA depende de su interacción con otras proteínas, que pueden ser proteínas que se unen al DNA o proteínas accesorias que no se unen al DNA. Este control de los procesos de transcripción celular a través de la acción cooperativa de diferentes proteínas se conoce como regulación combinada de la transcripción, uno de los mecanismos de control combinatorio utilizados se basa en la homo o hetero dimerización entre diferentes factores de transcripción (Lamb *et al.*, 1991). Dicha dimerización permite asegurar buena afinidad al DNA y al mismo tiempo sirve para regular la selectividad de secuencias. Los factores de transcripción utilizan distintos motivos estructurales lo que permite clasificarlos en distintas familias (Pabo y Saber, 1992).

2.2. Familias de Factores de Transcripción.

Los factores de transcripción se clasifican en cuatro grupos de acuerdo a la presencia de motivos de amino ácidos conservados involucrados en la interacción con el ADN:

1.- Motivo Hélice-giro-hélice (HGH). La mayoría de las proteínas pertenecientes a esta familia se encuentran en organismos procariotas (Harrison y Aggarwal., 1990). Suelen interactuar con el DNA en forma de dímeros, en los que cada uno de los monómeros utiliza el motivo HGH para interactuar con el DNA, este motivo de unos 22 aminoácidos consiste en una hélice α un giro y una segunda hélice α , una de ellas denominada hélice de reconocimiento, la cual se inserta en el surco mayor del DNA y contiene la mayoría de los aminoácidos responsables de la especificidad de la unión. Las α hélices interactúan con las zonas expuestas de las bases en el surco mayor del DNA formando un ángulo de 120° y aunque una de ellas no se inserta en el surco, puede establecer contacto con los grupos fosfato, lo cual le permite aumentar la afinidad del reconocimiento (Fig.1). El motivo HGH aislado del resto de la proteína es incapaz de unirse al DNA, ya que necesita estar estabilizado por hélices adicionales para plegarse adecuadamente y llevar a cabo el reconocimiento (Khorasanizadeh y Rastinejad, 1999).

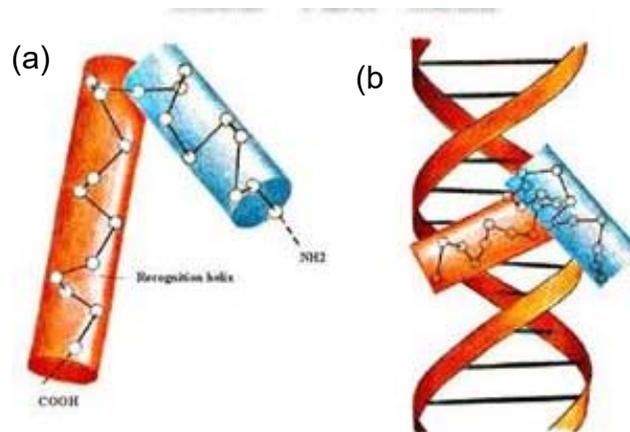


Figura 1. Modelo de la estructura tridimensional del motivo HLH (a) y de la interacción con el DNA. Tomada de Myers y Kornberg 2000

2.- Motivos Dedos de Zinc. Es uno de los motivos estructurales más frecuentes de las proteínas, que interaccionan con el DNA, sobre todo en eucariotas (Klug y Schwabe., 1995). Este motivo se caracteriza por contener un catión Zn^{2+} unido con cuatro residuos de Cys y/o His, dependiendo de la estequiometría del complejo de coordinación, se pueden distinguir dedos de zinc del tipo Zn-Cys₂ His₂ (Wolfe et al. 2000), Zn-Cys₄ y Zn₂-Cys₆ (Rastinejad et al., 1995). El átomo de Zn ejerce una función estructural que permite mantener empaquetada una hélice α que reconoce el surco mayor (hélice de reconocimiento) y una lámina β , de este modo se consigue la estabilización y correcta orientación de la hélice (Fig. 2). La mayor parte de estas proteínas contienen en su secuencia varios dedos de zinc unidos de forma covalente pues los motivos monoméricos por si solos presentan una afinidad muy baja (Papworth *et al.*, 2006).

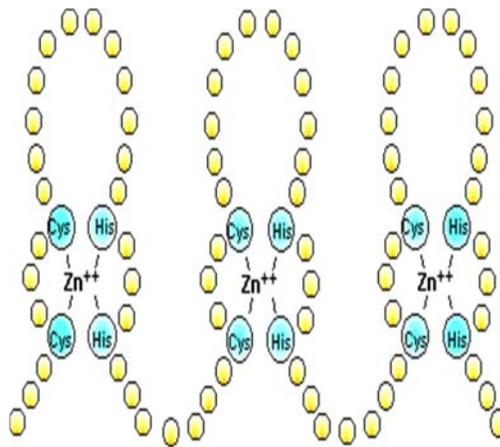


Figura 1. Modelo de la estructura de los motivos dedos de zinc. Tomada de Atlas de Genética y Citogenética en Oncología y Hematología 2017.

3.- Motivo Cremallera de Leucina. Es uno de los motivos de reconocimiento de DNA más sencillos, consiste en un homo o heterodímero no covalente de hélices α cuyas

unidades monoméricas constan de dos regiones bien diferenciadas (Fig.3) (Kerppola y Curran, 1991). La cremallera de leucina, compuesta por unos 30 aminoácidos y situada en el extremo C-terminal, es la encargada de la dimerización y se caracteriza por la repetición del residuo de leucina cada siete aminoácidos generando una cara hidrofóbica que posibilita la interacción entre dos cremalleras de cada monómero y la región básica, denominada así por la presencia de aminoácidos cargados positivamente. Esta región está situada en el extremo N-terminal y contiene unos 20 aminoácidos, se inserta en el surco mayor estableciendo contactos electrostáticos, hidrofóbicos y puentes de hidrógeno con las bases del DNA. Un aspecto relevante de las interacciones bZip-DNA es que en disolución y en ausencia del DNA diana la región básica carece de una estructura secundaria clara (Weiss *et al.*, 1990).

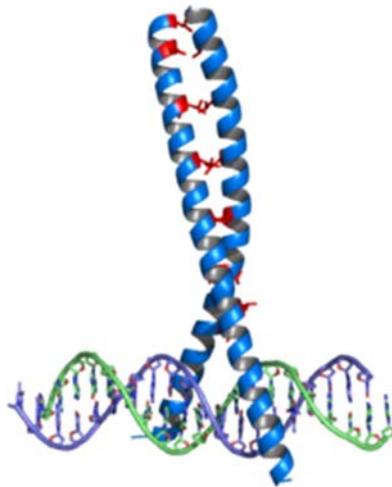


Figura 2. Modelo de la unión del motivo cremallera de leucina al DNA. Tomada de Myers y Kornberg 2000

4.- Motivo bHLH. Muchos factores de transcripción en eucariotas contienen una región básica de unión al DNA conservada seguida inmediatamente por dos hélices

anfipáticas conectadas por un loop, que forman el motivo básico hélice- loop-hélice (bHLH) (Fig. 4). La región básica junto con la parte N-terminal de la primera hélice (H1) del motivo bHLH, se unen al surco mayor del DNA diana, la hélice C-terminal (H2) del motivo bHLH media la dimerización de la proteína a través de la formación de un espiral enrollado (Myers y Kornberg, 2000)

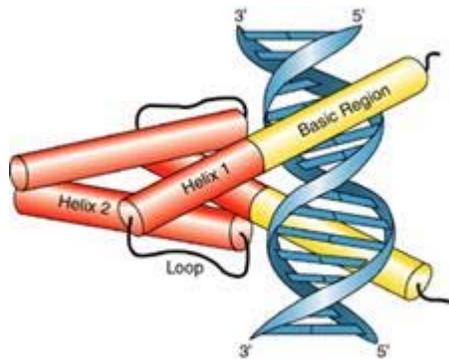


Figura 3. Modelo de la interacción del motivo bHLH con el DNA y la formación de homodimeros con otro factor bHLH. Tomada de Myers y Kornberg 2000.

2.2.1. Factores de transcripción bHLH

El motivo básico (bHLH) es un motivo de aminoácidos altamente conservado que define un grupo de factores de transcripción que fue descrito inicialmente en animales y pronto se descubrió en todos los principales linajes eucariotas (Murre *et al.*, 1989). El dominio bHLH consta de 50-60 aminoácidos que forman dos segmentos distintos, un tramo de 10-15 aminoácidos en su mayor parte básicos (la región base) y una sección de aproximadamente 40 aminoácidos forman dos hélices α anfipáticas, separadas por un loop de longitud variable (la región de hélice-loop-hélice. Los análisis estructurales de las proteínas bHLH de mamíferos y levaduras mostraron

que la región de base constituye la interfaz principal, donde se produce el contacto con el ADN, mientras que las dos hélices promueven la formación de heterómeros entre las proteínas bHLH (Jones, 2004). Se han identificado 19 residuos de aminoácidos de bHLH que pueden ser altamente conservados en organismos que van desde eucariones unicelulares como la levadura hasta pluricelulares complejos (Wang *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2009). Fuera de los aminoácidos conservados del motivo bHLH, las proteínas presentan una secuencia considerablemente divergente (Atchley *et al.* 1999).

Se han identificado muchos factores de transcripción con motivo bHLH en la secuencia de los genomas de más de 20 organismos, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Homo sapiens*, *Arabidopsis thaliana* y *Orizae sativa* (Dang *et al.* 2011).

Las proteínas con motivo bHLH están involucradas en una gran variedad de procesos de regulación, sus funciones incluyen la regulación de la neurogénesis, miogénesis y el desarrollo del corazón en animales (Massari y Murre, 2000; Jones, 2004), control de la absorción de fosfato y la glucólisis en levadura (Robinson y Lopes, 2000), o la modulación de las vías de metabolismo secundario, la diferenciación epidérmica y las respuestas al medio ambiente en las plantas (Ramsay y Glover, 2005; Castillo *et al.*, 2007).

2.3. Filogenia de los factores bHLH

Los análisis filogenéticos han clasificado la diversidad de las proteínas bHLH en un número de grupos distintos, más de 50 proteínas con motivos bHLH están codificadas en los genomas de animales (metazoos), por lo general se clasifican en

seis grupos principales (A-F) basado en su capacidad de unirse al ADN (Atchley y Fitch, 1997; Ledent y Vervoort, 2001; Jones, 2004).

En metazoos, los análisis filogenéticos demostraron la presencia de al menos 44 subfamilias en el ancestro común (Simionato *et al.*, 2007). Además, los estudios mostraron que en los metazoos el antepasado de la proteína con motivo bHLH estaba presente hace 600-700 millones de años, un periodo anterior al de las plantas (Douzery *et al.*, 2004; Peterson *et al.*, 2004). Un estudio filogenético indicó que el grupo A que contiene proteínas con motivo bHLH de mamíferos, carece de proteínas bHLH de plantas. Los otros grupos tenían una mezcla de diferentes especies y la mayoría de las proteínas bHLH de plantas pertenecían al grupo B (Stevens *et al.*, 2008; Skinner *et al.*, 2010).

Aunque los factores de transcripción bHLH se han encontrado en todos los eucariotas analizados hasta ahora, los estudios relacionados con función de estas proteínas en plantas son relativamente limitados en comparación con sus ortólogos animales (Song *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014). Los análisis filogenéticos mostraron que las proteínas con motivo bHLH en plantas comprenden 26 subfamilias, 20 de las cuales están presentes en los ancestros comunes de los musgos y plantas vasculares existentes, que se cree aparecieron hace 440 millones de años (Pires y Dolan, 2010). A partir del análisis de la secuencia del genoma de plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa*, se identificaron 147 factores de transcripción bHLH en *Arabidopsis*, que se dividen en 21 subfamilias de acuerdo con los análisis filogenéticos (Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). En el genoma del arroz se identificaron 177 genes bHLH (Li *et al.*, 2006). Sin embargo, el origen y la historia

evolutiva de estos grupos no se pueden entender solamente con las secuencias de *A. thaliana* y *O. sativa*, la caracterización de la evolución en plantas de las proteínas con motivo bHLH y su diversidad requiere el análisis filogenético de estas a partir de una selección más diversa de plantas (Rodríguez-Ezpeleta *et al.*, 2005).

2.4. Caracterización de los factores bHLH

Investigaciones recientes han indicado que algunas plantas regulan la respuesta al estrés abiótico por medio de factores de transcripción con motivo bHLH, un ejemplo son los genes PtrbHLH de *Poncirus trifoliata* (Naranja espinoso) y MdC1bHLH1 de *Malus domestica* (Manzana), que se sugiere responden al estrés por frío (Pillitteri y Torii, 2007). Un gran grupo de proteínas bHLH en plantas contienen una región básica dentro del motivo que les permite reconocer la E-Box (5'-CANNTG-3') y / o G-Box (5'-CACGTG-3') en las secuencias promotoras de los genes destino. En un análisis que incluyó *Arabidopsis*, álamo, arroz, musgo, algas y otras 359 plantas, se identificaron dos aminoácidos esenciales en el reconocimiento de las E-Box (Glu-13 y Arg-16).

Siete proteínas bHLH adicionales presentan el cambio de Arg-16 por una Lys sin interferencia en la actividad de unión a E-Box. Tres residuos adicionales en la región básica (His / Lys-9, Glu-13 y Arg-17) proporcionan especificidad de unión al ADN de la caja G. Otros factores de transcripción bHLHs que tienen más de cinco aminoácidos en la región básica, pero que carecen de los residuos esenciales para las especificidades de reconocimiento de unión E-box son conocidos como no aglutinantes de la E-box. Además, hay proteínas bHLH de plantas que no presentan

una región básica y se predicen como no aglutinantes de ADN. La mayoría de las proteínas bHLH se clasifican en los grupos A o B y se espera que se unan a las secuencias consenso de las E-box (Morgenstern y Atchley, 1999). El grupo B incluye miembros que presentan específicamente unión G-box, en el grupo C se encuentran proteínas bHLH que comparten un dominio PAS y se unen a las secuencias promotoras sin necesidad de la E-box (Zelze *et al.*, 1997). El grupo E incluye proteínas bHLH que contiene un residuo conservado Pro o Gly en una posición clave dentro de la región básica, preferentemente se unen a secuencias referidas como N-cajas, y además comparten un motivo adicional WRPW. Algunas proteínas del grupo D, se ha descrito como incapaces de unirse al ADN, y podrían formar heterodímeros que funcionan como reguladores negativos de la unión de un regulador bHLH con el DNA (Fairman *et al.*, 1993). El grupo F incluye proteínas denominadas COE, las cuales comparten el dominio COE el cual es un dominio adicional que le confiere una mayor estabilidad al motivo bHLH al momento de unirse al DNA. Se ha sugerido que la secuencia de la proteína bHLH ancestral era del grupo B la cual se presentó en la evolución temprana de los eucariotas, de la cual los diferentes bHLHs de diferentes linajes evolucionaron de forma independiente (Ledent y Vervoort, 2001; Heim *et al.*, 2003).

2.5. Funciones asociadas a los factores bHLH

La diversificación funcional de las familias de genes que codifican factores de transcripción se está convirtiendo en una importante fuente de diversidad morfológica

y fisiológica subyacente a la evolución (Doebley y Lukens, 1998; Riechmann *et al.*, 2000; Tsiantis y Hay, 2003; Kellogg, 2004)

Los factores de transcripción bHLH están involucrados en varios procesos que son importantes para las plantas, como hacer frente a la sequía, el desarrollo de los estomas (Galinha *et al.*, 2007), la formación de raíces radicales (Benfey *et al.*, 1993) y la regulación del metabolismo hormonal (Di Laurenzio *et al.*, 1996). Los cambios en los procesos de desarrollo, tales como la limitación y expansión de la hoja pueden resultar en tolerancia a la sequía (Liu *et al.*, 2014).

2.5.1. Funciones asociadas a los factores bHLH en plantas

ESPATULA (SPT) es un gen que codifica un factor de transcripción con motivo bHLH implicado en la organogénesis del carpelo, respuesta a la luz, la señalización de la temperatura y la limitación de los tamaños de las hojas y meristemas en respuesta a las señales ambientales (Xu *et al.*, 1999). El gen SPT se expresa en los primordios de las hojas jóvenes, y su sobreexpresión disminuye el número y tamaño de las células dentro de las hojas. Esto indica que SPT puede ser responsable de la restricción meristemática de los primordios de la hoja, dejando al descubierto un mecanismo importante para la determinación final del tamaño de las hojas (Yamaguchi *et al.*, 1998). La pérdida de función de SPT en plantas mutantes mostraron una mayor división celular y células más grandes que la planta de tipo silvestre resultando en una tasa de crecimiento mayor y raíces primarias más largas (Xu *et al.*, 1999). La expresión SPT se correlaciona con áreas de alto contenido de auxinas y el promotor de SPT contiene varios elementos de respuesta a auxina

(AREs), lo que sugiere una relación entre el SPT y auxina (Xu *et al.*, 1999). En *Arabidopsis* el gen SPT juega un papel en el desarrollo de todos los tejidos que se derivan de los márgenes del carpelo, siendo requerido para la transmisión de las vías de desarrollo y el apoyo para el desarrollo del septum, el estilo y el estigma (Alvarez y Smyth, 1999, 2002).

El análisis de los niveles de transcripción del gen Atlg49770 con motivo bHLH, en varios órganos de la planta de *A. thaliana*, mostró que no existe expresión del gen en plántulas, raíces, hojas en roseta, botones florales o flores maduras, sin embargo, se expresa fuertemente en silicuas (Kondou *et al.*, 2008). Se ha descrito que el desarrollo de las semillas se controla mediante la regulación de la expresión de muchos genes en varias etapas de desarrollo de las semillas, por lo tanto, se investigó el nivel de expresión del gen Atlg49770 (RT-PCR) en estas etapas y se observó que el nivel de expresión aumentó gradualmente después de los siete días de la polinización, cuando el embrión está en la etapa temprana de corazón (Kondou *et al.*, 2008).

En estudios realizados en durazno (*Prunus persica*), se encontraron tres factores de transcripción con motivo bHLH involucrados en los procesos de dehiscencia del fruto. Estos genes son ortólogos de los encontrados en *Arabidopsis*: ALCATRAZ (ALC) (Rajani y Sundaresa, 2001), su pariente más cercano ESPATULA (SPT), e INDEHISCENTE (IND) (Liljegren *et al.*, 2004), los cuales juntos forman una red de regulación que orquesta la diferenciación de la valva, lo que permite que tenga lugar la dispersión de semillas. SPT se expresa continuamente en los márgenes de desarrollo de los carpelos, presumiblemente apoyan su crecimiento en *Arabidopsis*

(Alvarez y Smyth, 2002). La expresión de SPT también se localizó en el estomio de las anteras, el estilo y el estigma. (Groszmann *et al.*, 2008). En la maduración de las silicuas, la expresión de SPT está restringida a los bordes de las valvas en un patrón que se asemeja a los genes MADS-box (Savidge *et al.*, 1995, Ferrandiz *et al.*, 2000). No hay evidencia anterior de que las funciones de ALC estén relacionadas con el desarrollo del gineceo cuando SPT está activo. SPT y ALC son aparentemente los productos de reciente duplicación de genes en un antepasado de la familia Brassicaceae, ya que no se encontraron genes ALC en las especies fuera de esta familia (Groszmann *et al.*, 2008).

Se ha sugerido que AtNIG1 y bHLH92 están involucrados en la respuesta al estrés salino en la planta (Abe *et al.*, 2003). El gen OsbHLH148 actúa en respuesta al estrés por sequía del arroz, lo cual que le confiere tolerancia a la sequía mediante la interacción con proteínas OsJAZ que funcionan en la señalización por jasmonato (Lawlor, 2013). En *Arabidopsis*, bHLH122 es un regulador positivo de la tolerancia a la sequía, tolerancia a NaCl y la señalización osmótica (Nakashima *et al.*, 2009). Usando el sistema de dos híbridos (Y2H) de levadura, se demostró que el motivo HLH es necesario para la dimerización e interacción proteína-proteína, la cual requiere un residuo clave (Leu66) que es conservado en el motivo bHLH de proteínas de plantas (Carretero-Paulet *et al.*, 2010; Galstyan *et al.*, 2011).

2.6. Génesis de la fisiología de semillas

El endospermo es importante para el desarrollo de semillas y en algunas especies es importante para el desarrollo de las plántulas después de la germinación debido a

que nutre al embrión y la plántula después de la fertilización en Eudicotiledóneas tales como *Arabidopsis thaliana* (Boisnard-Lorig *et al.*, 2001). Los núcleos del endospermo triploide se dividen repetidamente sin formación de la pared celular, lo que resulta en la formación de una gran célula multinucleada (sincitio) (Boisnard-Lorig *et al.*, 2001).

El endospermo celular es consumido poco a poco por el embrión durante el desarrollo de la semilla, dejando sólo la capa de células de aleurona-periférica como en las semillas maduras, el desarrollo del tegumento del órgano maternal y la nueva generación del embrión y el endospermo completan la formación de una semilla viable (Bush *et al.*, 1996; Torres-Ruiz *et al.*, 1996; Takada *et al.*, 2001; Olsen, 2004).

En *Arabidopsis*, una dicotiledónea y en maíz (*Zea mays*) una monocotiledónea, el endospermo tiene un papel importante en el control del tamaño de la semilla, se sabe que, en ambos casos, un desequilibrio en la dosificación materno/paterno afecta el tamaño del endospermo y de la semilla (Scott *et al.*, 1998; Olsen, 2004).

El factor de transcripción bHLH de *A. thaliana* (SPATULA), interviene en el control de la germinación de la semilla, mostrando que SPATULA es un factor de transcripción multifuncional, que actúa como un represor estable a la luz y al ácido giberélico (GA₃), (Heisler *et al.*, 2001), SPATULA también actúa como regulador del desarrollo del carpelo, así como en la expansión de los cotiledones y pétalos (Steven *et al.*, 2005).

Guzmán-Rodríguez y colaboradores (2013) realizaron un análisis de secuencias expresadas (EST) de semilla de aguacate nativo mexicano *Persea americana* var. *drymifolia*, en el cual se obtuvo como resultado una expresión muy abundante de

diferentes genes. Estas secuencias se analizaron adicionalmente utilizando BLASTX (NCBI). Las lecturas más abundantes, que reflejan una mayor expresión, fueron las que coinciden con secuencias de un factor de transcripción bHLH.

3. Justificación

Kondou y colaboradores (2008) observaron que el gen At1g49770 de *Arabidopsis thaliana* el cual es un factor de transcripción bHLH solo se expresa en las silicuas de las plantas de *Arabidopsis thaliana*, al igual Nicolas y colaboradores (20013) observaron en *Vitis vinífera* que la expresión de un factor de transcripción bHLH se expresa fuertemente en el fruto.

Los antecedentes existentes demuestran que los factores de transcripción tipo bHLH juegan un papel muy importante en la orquestación del desarrollo de la semilla y dehiscencia del fruto en *Arabidopsis thaliana* y *Prunus persica*

El aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) es un recurso frutícola muy importante para nuestro país y estado, es el principal generador de portainjertos para los cultivares comerciales. En este contexto es de una gran importancia conocer el proceso molecular del desarrollo de la semilla de esta variedad de aguacate, ya que actualmente se carece de información en este aspecto. La abundante presencia de lecturas en una librería de ESTs de semilla de aguacate que coinciden con la secuencia que codifica para un factor de transcripción bHLH, sugiere un papel protagónico en el control del desarrollo de la semilla y fruto siendo de gran interés caracterizar este gen.

4. Hipótesis

Las secuencias mayoritariamente encontradas en una librería de ESTs de semilla de aguacate (*Persea americana* var. *drymifolia*) ensamblan la secuencia completa de un gen que codifica para un factor de transcripción tipo bHLH.

5. Objetivo general

Caracterizar un gen con motivo bHLH de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) y determinar su expresión durante el desarrollo de la semilla.

6. Objetivos particulares

1. Caracterizar el gen del factor de transcripción tipo bHLH presente en aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) y analizar en *in silico* la proteína.
2. Analizar el perfil de transcripción del gen en la semilla durante diferentes estadios de desarrollo del fruto.

7. Materiales y Métodos

7.1 Material biológico.

Se colectaron frutos de aguacate nativo mexicano en el municipio de Tingambato, Michoacán, México, el cual se encuentra en las coordenadas 19° 30' de latitud norte y 101° 51' de longitud oeste, a una altura de 1980 m.s.n.m. Los frutos colectados representaron diferentes estadios de desarrollo que correspondieron a 1, 4 y 8 meses. Estas muestras se procesaron en el laboratorio separando las diferentes estructuras del fruto, mesocarpio, exocarpio y semilla, los cuales fueron debidamente etiquetados y conservados en nitrógeno líquido para su conservación. Adicionalmente, se germinaron algunas semillas para la obtención de plántulas y la separación de las diferentes estructuras de la planta, hojas, tallo y raíz, debidamente etiquetados y guardados para su posterior utilización.

7.2 Ensamble de secuencias EST.

Las 123 lecturas obtenidas de 5005 de la biblioteca de transcriptoma de semilla de aguacate (ESTs) fueron aisladas y ensambladas mediante el programa bioinformático DNA dragón V.1.2. (www.dna-dragon.com/) para determinar los EST y/o singletons asociados.

7.3 Análisis de secuencias tipo bHLH

Para determinar la similitud de las secuencias de semilla de aguacate se realizaron ensayos tipo blastX con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>), para la obtención de las secuencias más cercanas según su eValue de diferentes especies de plantas, seleccionándose solo

las secuencias que estuvieran completas y que su porcentaje de identidad y cobertura fueran altos (mayor al 50 % de identidad). Estas secuencias fueron utilizadas para realizar alineamientos múltiples con el objetivo de detectar la relación filogenética con secuencias de factores bHLH, estos alineamientos se realizaron con el programa bioinformático MEGA 7.0.14 con el algoritmo clustalW. La Predicción de ORF, Peso Molecular y Punto Isoeléctrico, se realizó con el programa bioinformático Unipro UGENE 1.26.

7.4 Modelado 3D de la proteína bHLH

Para el modelado de los motivos bHLH de las secuencias se utilizó el programa bioinformático SWISS-MODEL; (<https://swissmodel.expasy.org/>)

Para la inferencia de la estructura de la proteína completa se utilizó el programa bioinformático I-TASSER; el cual modela las proteínas a partir de un molde (zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/), al igual que para su manipulación se utilizaron los programas, RasMol Versión 2.7.52, Chimera 1.11.2, SPDBV_4.10.

7.5 Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para los ensayos de PCR semicuantitativo y qPCR en tiempo real, para esto se utilizó la herramienta bioinformática Primer3Plus (www.bioinformatics.nl/primer3plus/) (Jurka *et al.*, 1995-1996), en el cual se procesaron y seleccionaron oligonucleótidos de las características deseadas, quedando para el extremo 5' el oligo bHLHFw (5'-GACGGCCATCGAATAAGAAC-3') y para el 3' el oligo bHLHRv (5'-TAGCGACAGGATTTGGCAGTTT -3') dando un

amplicon calculado de 195 pb. Para el monitoreo con un gen de referencia, se diseñaron oligonucleótidos para el gen de actina

ACTFw (5'-TGCTGATCGTATGAGCAAGG-3') y ACTRv (5'-ACCCTCCAATCCAGACACTG-3'). Los sitios y secuencias amplificadas se encuentran en los Apéndices III y IV

7.6 Extracción y preparación de RNA

Para la extracción de RNA se utilizó el método de extracción de RNA total de plantas de López-Gómez y Gómez-Lim (1992). Se utilizó un buffer de lisis para extracción de RNA I (Tris-borato, pH 7.5 150 mM, EDTA 50 mM, SDS 2%, Mercaptoetanol 1%) (Apéndice 1). La eliminación del DNA se llevó a cabo con el kit Deoxyribonuclease I, Amplification Grade. (Buffer de reacción DNase I, DNase I, EDTA) a 1µg de RNA se le adicionó 1 µl de buffer de reacción y 1µl de DNase I, la muestra se incubó 15 minutos a temperatura ambiente, pasado este tiempo se le agregó 1µl de EDTA 25 mM para desactivar la enzima por 10 minutos a 60°C.

7.7 Extracción DNA plasmídico

A partir de la clona grlgsemd4023-f08 del banco de cDNA de semilla de aguacate se realizó la extracción de DNA para tener un control positivo. Para la extracción de DNA plasmídico se utilizó el método de lisis alcalina, (Birnboim y Doly 1979). Se emplearon las siguientes soluciones: Solución I (Tris-cl pH 8.0, EDTA pH 8.0, Glucosa 50mM), solución II (NaOH 0.2 N y SDS 1%), solución III (Acetato de K 5M, Ácido acético glacial y agua) (Apéndice 2).

7.8 Cuantificación y resolución de ácidos nucleicos

La resolución de ácidos nucleicos se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa TBE (Tris, borato, EDTA) al 2%, teñidas con bromuro de etidio (0.001%) y las cuantificaciones del material genético se llevaron a cabo en un Biophotometer Eppendorf.

7.9 Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se llevó a cabo con el kit First Strand cDNA synthesis kit (Thermo Scientific cat. No. K1632) según las especificaciones del fabricante partiendo de una concentración inicial de RNA de 1µg (Apéndice V).

7.10 PCR de punto final para el gen bHLH.

Los ensayos de PCR punto final se llevaron a cabo en un equipo Veriti 96 well Thermal cycler (Applied Biosystems). Las mezclas de reacción se prepararon en microtubos de 0.2 ml con los siguientes componentes MgCl₂ 1.5 mM, Taq DNA 1u polimerasa, 5.5 µl de agua grado MB, 1 µL de Buffer-Mg 10X, 100 ng cDNA, 40 pM dNTPs, 0.9 µM oligonucleótidos FW-RV), en un volumen final de 10 µl. El programa de amplificación se llevó a cabo bajo las siguientes las condiciones: 95°C por 5 min, 30 ciclos (95°C, 45 s; 65°C, 45 s; 72°C, 45 s), y una extensión final a 72°C durante 7 min.

7.11 Ensayos de PCR Tiempo real

Los ensayos de PCR el tiempo real se llevaron a cabo en el equipo Step One Real time PCR system (Applied Biosystems), mediante la metodología de curva estándar y química de SYBR® Green, para los genes bHLH y actina. Las mezclas de reacción se realizaron con los siguientes componentes VeriQuest™ FasSYBR® Green qPCR, Master Mix with ROX (2) ,5 µl, 0.9 µl de oligonucleótidos FW-RV, 0.2 µl de agua grado MB y 3 µl de cDNA en un volumen final de 10 µl. Las condiciones de amplificación fueron 95°C, 10 min, 30 ciclos (95°C, 45 s; 65°C, 45 s para bHLH y 61°C, 45 s para actina; 72°C, 45 s), 72°C 7 min, se realizaron triplicados de cada ensayo para tener un mejor ajuste de curva.

7.12 Ensayos de PCR semicuantitativo

Para corroborar los estudios de qPCR se llevó a cabo ensayos de PCR semicuantitativo los cuales se realizaron en un equipo Veriti 96 well Thermal cycler (Applied Biosystems), Las mezclas de reacción se prepararon en microtubos de 0.2 ml con los siguientes componentes: MgCl₂ 1.5 mM, Taq DNA polimerasa 1u, 5.5 µl de agua grado MB, 1 µL de 10X Buffer Taq-Mg, 100 ng cDNA , 40 pM dNTPs, 0.9 µM oligonucleótidos FW-RV, en un volumen final de 10 µl. Las condiciones de amplificación fueron 95°C-10 min, 30 ciclos (95°C, 45 s, 65°C, 45 s, para bHLH y 61°C, 45 s para actina, 72°C, 45 s), 72°C, 7 min. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa TBE al 2% y las imágenes se analizaron en el programa bioinformático GelAnalyzer 2010, para generar la expresión relativa de la expresión de nuestro gen en comparación con el gen endógeno.

8. Resultados

8.1 Ensamble de secuencias ESTs

De las 125 lecturas ensambladas se encontró un solo uniEST que corresponde a una secuencia que codifica para un factor de transcripción del tipo bHLH. Su análisis y comparación con otras secuencias de bHLH permitieron determinar el ORF de este gen teniendo un tamaño de 993 pb, con un marco de lectura de 331 aminoácidos (Fig. 5), calculándose también su PM de 36.48 kDa y PI de 9.04. Esta secuencia fue dada de alta en la base de datos de NCBI con el identificador ID MF353071 PabHLHS1

```

1  M A L E A V V F P Q D L F G Y S C K D F
1  ATGGCGCTTGAAGCTGTTGTATTTCTCAAGATCTATTTGGTTACAGTTGCAAGGACTTT

21  Y S L P A A F T F D D L K V E E K Q K K
61  TACTCTTTGCCAGCAGCTTTCACTTTTGATGATCTTAAAGTAGAAGAAAAGCAGAAGAAA

41  D L V L D T E T S S L I G K N Q N L A T
121  GATCTAGTACTAGATACTGAGACTAGTAGCCTCATAGGGAAAAATCAAATCTAGCGACA

61  G F G S F C G N W D S S S S S I L Q N S
181  GGATTTGGCAGTTTTGTGGGAATTGGGATTCCTCCTCTCCTCCATTCTACAAAATTCA

81  S P E A C T G D G F F N G S Y P P E A T
241  TCCCCAGAAGCTTGCACTGGAGATGGGTTCTTTAATGGTTCTTATCCTCCTGAAGCGACG

101  P C G R R K R R R A K S S K N I E E V E
301  CCGTGCGGTAGAAAGAAAGAGACGACGGGCAAAGAGCAGCAAGAACATAGAAGAAGTCGAG

121  N Q R M T H I V V E R N R R K Q M N E Y
361  AACCGAGAATGACCCACATTGTCGTCGAGCGCAACCGTCGGAAGCAGATGAACGAGTAT

141  L A V L R S L M P P S Y V Q R G D Q A S
421  CTTGCAGTGCTCAGATCTCTGATGCCACCCTCATATGTTCAAAGGGGTGACCAAGCTTCC

161  I V G G A I N F V K E L E Q L L Q S L E
481  ATCGTAGGTGGGGCAATAAATTTGTTAAGGAACTGGAACAACCTCCTCCAATCTCTTGAA

181  A Q K R M T Q Q S E P G L T S P F A N F
541  GCCCAGAAGAGAATGACCCACAATCCGAACCCGGGCTCACCTCACCTTTGCGCAATTTTC

201  F T F P Q Y S S S T N R S S T N E A V A
601  TTCACCTTCCCTCAGTACTCTAGCTCGACCAACCGCAGTTCAACAAATGAAGCAGTGGCC

221  E N H S A I A D I E V T M V E S H A N L
661  GAGAACCATTCCGGCATCGCTGACATCGAAGTGACGATGGTCGAAAGCCATGCCAATCTC

241  K V V S K R R P K Q L L K M V A G L K N
721  AAAGTGGTCTCCAAGCGGGCACCGAAGCAGCTCTTGAAGATGGTAGCCGGGCTCAAAAAC

261  L R L T I L H L N V T S I G K M A S T L
781  CTTGCTCTACTATCCTCCATCTCAATGTGACAAGCATTGGAAAAATGGCCTCTACTCTT

281  S V V K L E E N C G L T T V D E N T P C
841  TCAGTGGTAAAGTTGGAAGAGAATTGCGGGCTCACGACCGTTGATGAAAATACCCCCTGC

301  G L S Y A R K G I K R S H T L I E K N F
901  GGTATTATCATATGCTAGGAAAGGAATCAAGAGGAGCCATACATTAATTGAAAAAATTTT

321  T G R G P R G P L Y H *
961  ACTGGGAGGGGGCCAGGGGCCCTTTTACTACTAAAAAATGGGAGTTTAAAGGGGTCC
1021CTTTTATTTCCCGGGGGGGGAATTTTTAAAACCTCTGGGAAAAAAAAAATTTTAAAAAGA
1081GGGGGGTGGGGCCCCCCCCACAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Figura 5. Secuencia completa del factor de transcripción bHLH de semilla de aguacate nativo mexicano. Producto del ensamble de 125 reads. En negro secuencia de nucleótidos, en rojo secuencia de aminoácidos.

8.2. Análisis de secuencias tipo bHLH

El análisis BLASTX arrojó un total de 30 secuencias, de las cuales se escogieron las tres que tenían mayor cobertura e identidad con la secuencia de interés para realizar la comparación filogenética de los motivos bHLH (Cuadro 1).

Cuadro 1. Porcentajes de identidad y similitud del gen bHLH de *Persea americana* var. *drymifolia* con dos secuencias identificadas en bases de datos.

Especie	Cobertura	Identidad
<i>Arabidopsis thaliana</i>	89%	64%
<i>Vitis vinifera</i>	89%	54%
<i>Glycine max</i>	89%	54%

Los alineamientos múltiples de secuencias del NCBI con la del gen de aguacate arrojaron como resultado un bajo nivel de aminoácidos conservados, sin embargo, la región del motivo bHLH contiene hasta un 95 % de aminoácidos conservados (Fig. 6).

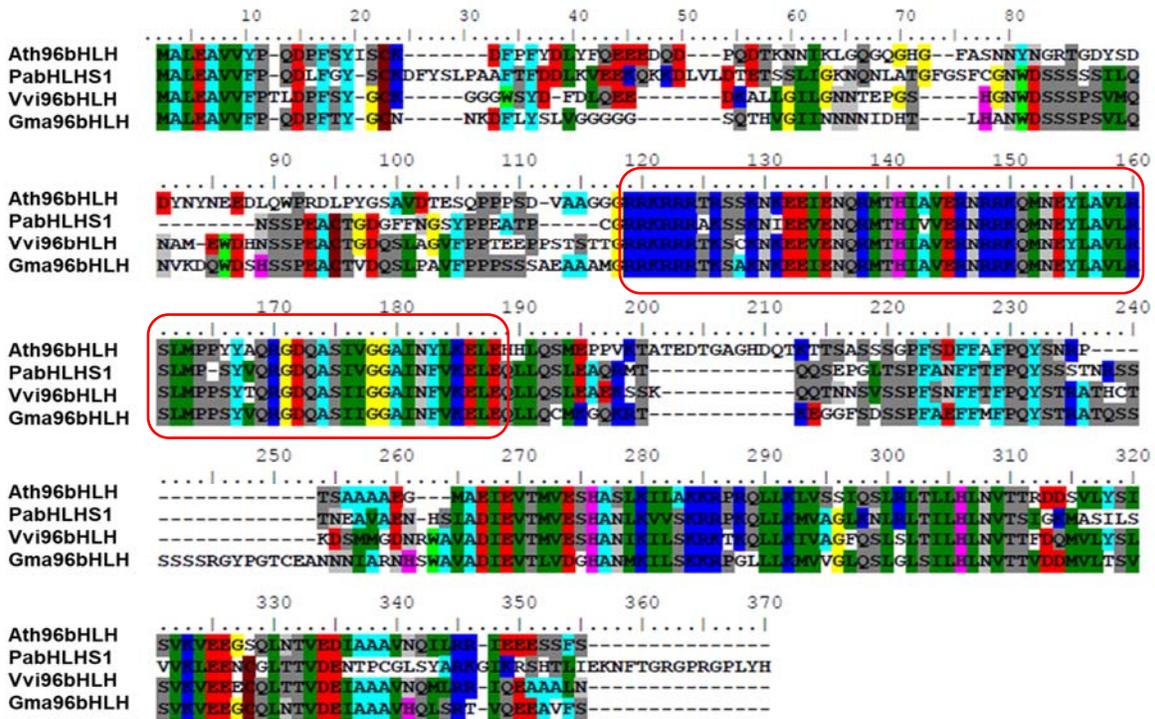


Figura 6. Alineamiento de la secuencia del factor bHLH de *Persea americana* var. *drymifolia* con las secuencias con mayor cobertura e identidad identificadas en *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera* y *Glicine max*. En las cajas se indica la secuencia del motivo bHLH.

Se identificaron cambios de aminoácidos del mismo grupo o naturaleza química (Arg-Lys, Ile-Val, Ser-Tyr), y aminoácidos completamente diferentes (Thr-Ala, Ser-Cys-Ala, Lys-Ile, Ala-Val-Tyr, Gln-His), lo cual sugiere posibles cambios en la estructura del motivo bHLH (Fig. 7).

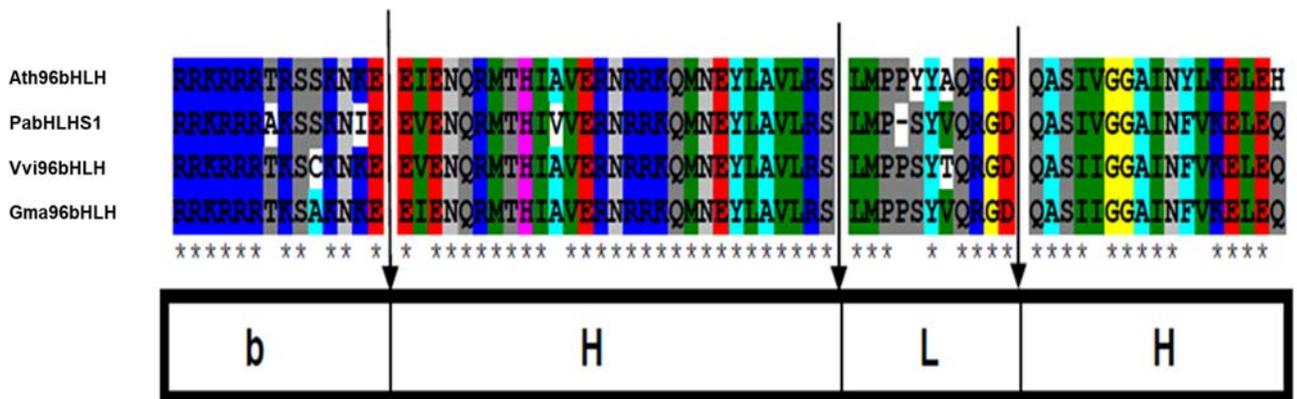


Figura 7. Alineamiento del motivo bHLH con las secuencias de mayor identidad. *Arabidopsis thaliana* (Ath96bHLH) (RAFLIS-42-108), *Persea americana* var. *drymifolia* (PabHLHS1) (MF353071), *Vitis vinífera* (Vvi96Bhlh) (gi|359492901), *Glycine max* (Gma96bHLH) (gi|356552929). En el recuadro inferior se indican las regiones para la estructura básica (b), hélices (H) y loop (L).

A continuación, para determinar si las secuencias de aminoácidos del factor bHLH de aguacate mostraba homología con un factor de transcripción cuya función es conocida en el desarrollo de la semilla de *Arabidopsis*, se utilizó la secuencia del gen ZHOUPI. Este gen está involucrado en la separación del embrión del endospermo y es de expresión específica de semilla. El resultado de este alineamiento mostró que la secuencia de ZHOUPI tiene un bajo nivel de aminoácidos conservados incluyendo el motivo bHLH (Fig. 8).

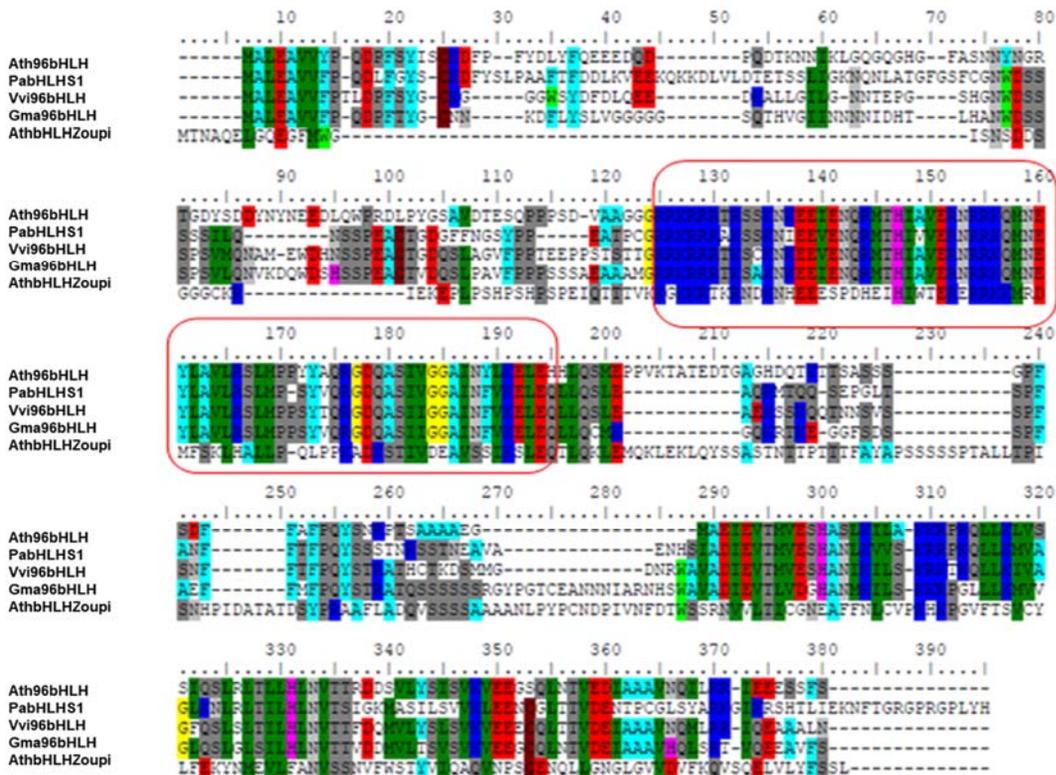


Figura 4. Alineamiento de la secuencia del factor bHLH de *Persea americana* var. *drymifolia* con las secuencias con mayor cobertura e identidad identificadas y el gen *Arabidopsis thaliana* Zoupi (AthbHLHZoupi), *Persea americana* var. *drymifolia* (PabHLHS1) en *Arabidopsis thaliana* (Ath96bHLH) (RAFLIS-42-108), *Vitis vinífera* (Vvi96bHLH) (gi|359492901) y *Glycine max* (Gma96bHLH) (gi|356552929) y la secuencia Zoupi de *Arabidopsis thaliana*. Las cajas con recuadro rojo indican la secuencia del motivo bHLH.

8.3. Modelado 3D de la proteína del factor bHLH

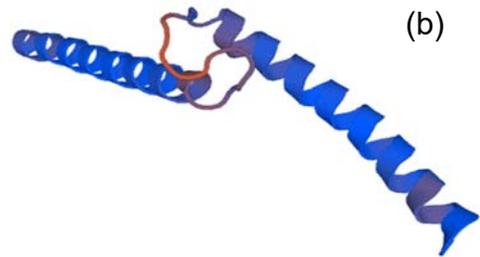
Se consideró importante realizar un modelaje estructural 3D para determinar si existe similitud entre las proteínas bHLH y así inferir su modo de acción. Se realizó el modelado estructural 3D de las proteínas completas de *V. vinífera*, *G. max*, *A. thaliana* y *P. americana* var. *drymifolia* (Fig. 9).

Primero se modeló la región correspondiente al motivo bHLH de las secuencias que presentaron mayor similitud con la secuencia de interés, utilizando como templado el factor de transcripción MyC2 con una identidad de la secuencia de un 31.75 % (Fig. 9).

(a)



(b)



(c)

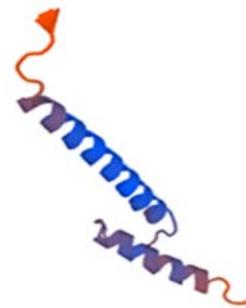
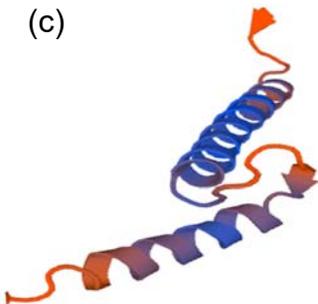


Figura 5. Modelos 3D de los motivos bHLH de las secuencias analizadas con el programa bioinformático SWISS-MODEL. (a) *Vitis vinífera* (Vvi96bHLH), (b) *Glycine*

max (Gma96bHLH), (c) *Arabidopsis thaliana* (Ath96bHLH), (d) *Persea americana* var. *drymifolia* (PabHLHS1).

Esto sugiere que las estructuras de las proteínas no son similares en su modelado 3D a pesar de que en el alineamiento se observa que comparten varios aminoácidos que están conservados. En el caso de *V. vinifera* y *G. max*, la estructura de los motivos bHLH no presenta la región básica, en cambio la estructura de *A. thaliana* es muy similar a la de *P. americana*, aunque al parecer esta presenta una estructura de lámina β en el loop que bHLH de *P. americana* no presenta.

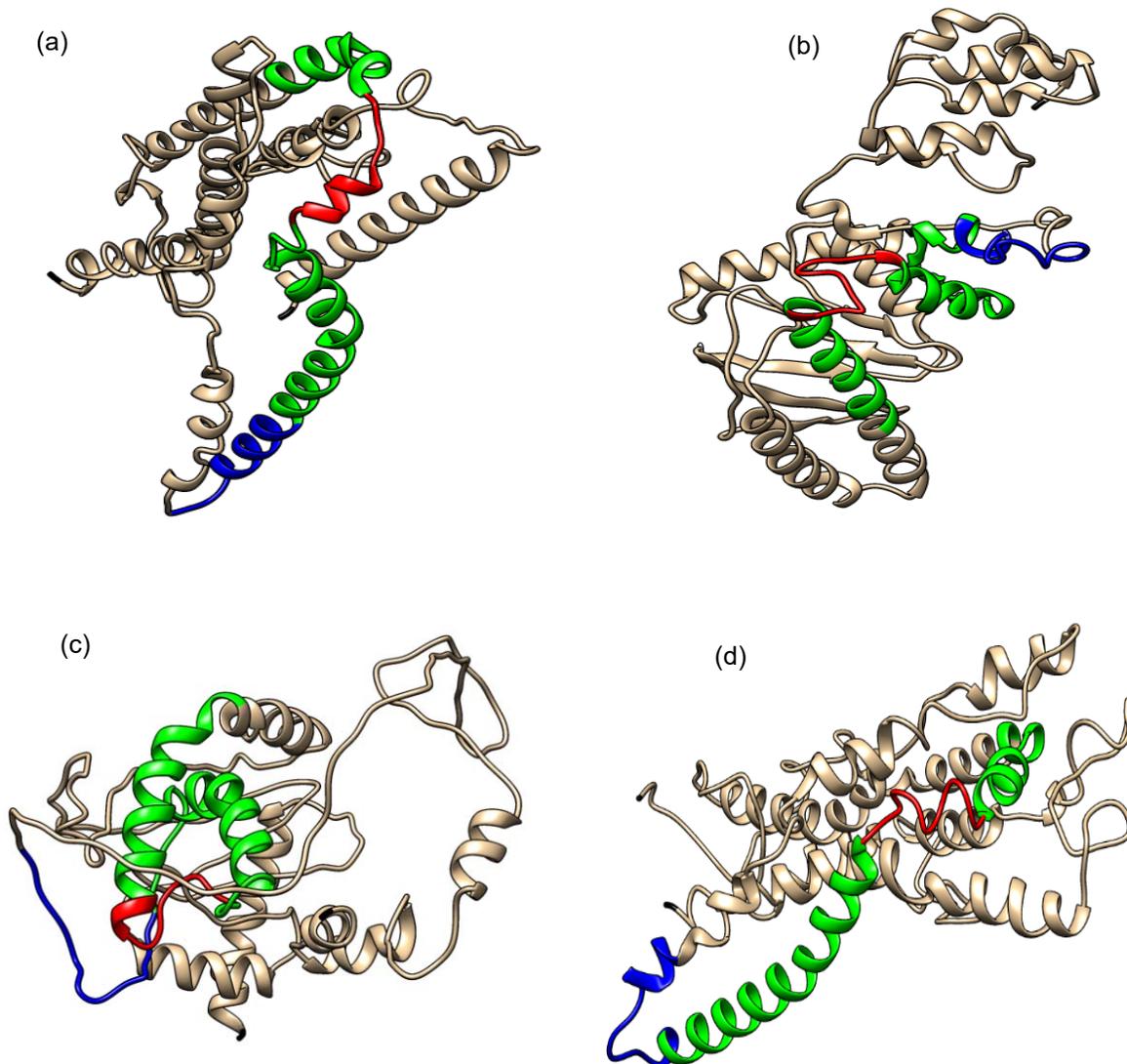


Figura 6. Modelos 3D de las proteínas bHLH de plantas. El análisis se realizó con el programa bioinformático I-TASSER; zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/, al igual que para su manipulación se utilizaron los programas, RasMol Versión 2.7.52, Chimera 1.11.2, SPDBV_4.10. (a) *Vitis vinifera* (Vvi96Bhlh), (b) *Glycine max* (Gma96bHLH), (c) *Arabidopsis thaliana* (Ath96bHLH), (d) *Persea americana* var. *drymifolia* (PabHLHS1).

En los modelos 3D de las proteínas completas se observa que la estructura es muy diferente entre ellas. Se realizó el cálculo hipotético de varias de las características

de las proteínas como lo es el C-Score, el peso molecular, el punto isoelectrico y tamaño, este análisis se presenta en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Predicción de características de las proteínas bHLH de *Vitis vinífera* (Vvi96bHLH), *Glicine max* (Gma96bHLH), *Arabidopsis thaliana* (Ath96bHLH) y *Persea americana* var. *drymifolia* (PabHLHS1)

Gen	C-Score	Peso molecular	Punto isoeléctrico	Tamaño
Ath96bHLH	-3.57	35.97 kDa	5.31	960pb-320aa
Vvi96bHLH	-4.12	34.62 kDa	5.94	930pb-310aa
Gma96bHLH	-3.65	35.57 kDa	7.12	972pb-324aa
PabHLHS1	-4.11	36.48 kDa	9.04	993pb-331aa

Las características de estos factores de transcripción son similares en el peso molecular y tamaño, pero diferentes en el punto isoeléctrico. Los valores de C-Score indican la calidad de la estructura para el método de I-TASSER, van de -5 a 2, donde el valor más cercano a 2 indica más posibilidades de que el modelado de la proteína sea correcto. En este caso se puede ver que los valores son muy bajos esto se debe a que no existen proteínas cristalizadas de los factores de transcripción bHLH las cuales son muy importantes para el modelado de las mismas, en este caso solo hay estructuras cristalizadas del motivo bHLH.

Con la finalidad de comparar la estructura tridimensional del factor bHLH de aguacate y la del gen Zoupi de *A. thaliana* del cual se conoce su función en el desarrollo de la semilla, se realizó el modelado de ambas proteínas con el programa I-TASSER (V5.0) (Fig. 11).

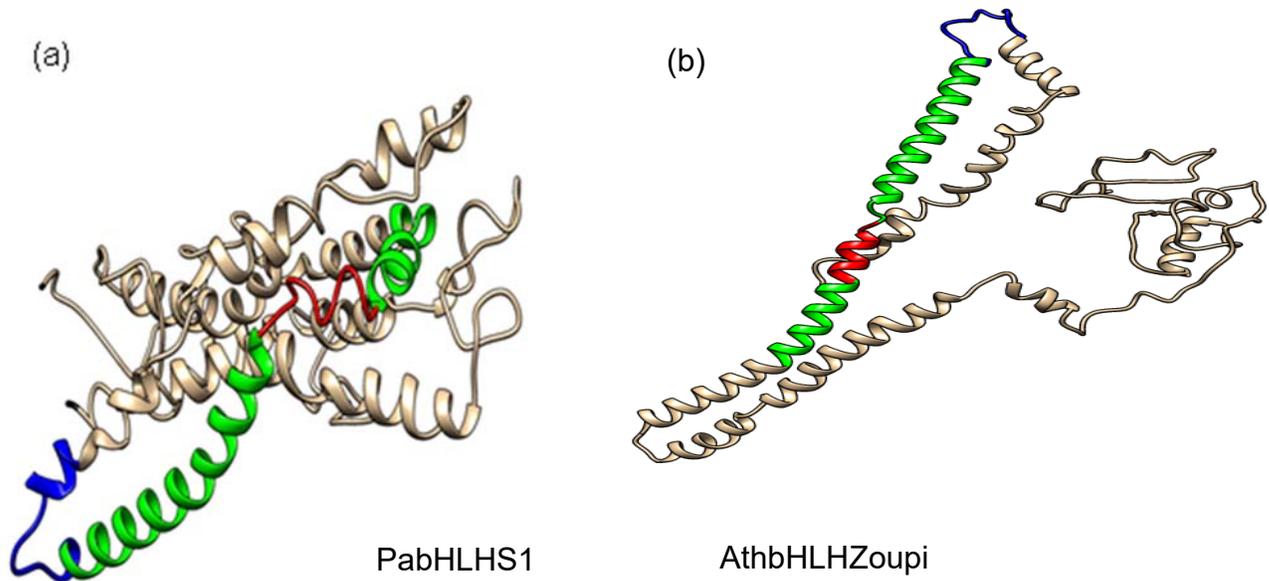


Figura 7. Modelado tridimensional de proteínas. (a) proteína bHLH *Persea americana* var. *drymifolia*, (b) proteína bHLH ZOUPI de *Arabidopsis thaliana*. Se utilizó el programa I-TASSER (V5.0)

Este modelado mostró que las proteínas no tienen una cercanía en toda su secuencia, lo que indica que las estructuras son muy diferentes, confirmando así la diversidad en los factores de transcripción bHLH. Y pudiendo inferirse así que este resultado no ayuda a determinar la posible participación del factor bHLH de semilla de aguacate en una función similar a la del factor de transcripción Zoupi.

Adicionalmente, se realizó un sobrelapado de las estructuras 3D. Este resultado permite observar estructuralmente a los factores y a la nula presencia de zonas similares en la proteína, o en el motivo bHLH que en los alineamientos es claramente observado (Fig. 12).

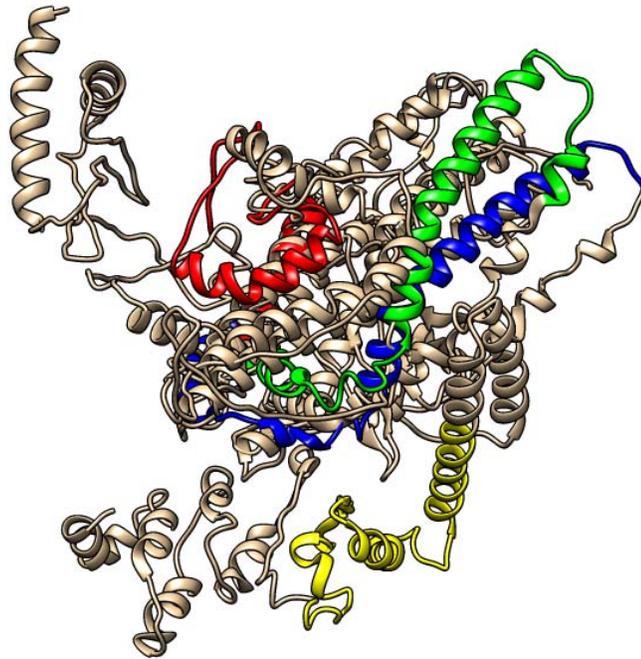


Figura 8. Sobrelape de las cuatro proteínas. En azul el motivo bHLH *Persea americana* var. *drymifolia* (PabHLHS1), en verde el motivo bHLH de *Arabidopsis thaliana* (Ath96Bhlh), en amarillo el motivo bHLH de *Vitis vinifera* (Vvi96bHLH), en rojo el motivo bHLH de *Glycine max* (Gma96bHLH).

8.4 Análisis de expresión del gen bHLH de aguacate por PCR Tiempo Real

8.4.1 Extracción de RNA

Las extracción de RNA total de diferentes estadios de desarrollo de la semilla y de diferentes estructuras de la planta obtenidos con la metodología propuesta, se obtuvieron concentraciones de entre 0.1944 y 0.1561 ng/ μ l con una relación 260/280 de 1.83 , las cuales fueron consideradas como concentraciones suficientes para los estudios posteriores.

8.4.2 Análisis de expresión del gen actina y bHLH

El primer paso para realizar el ensayo de tiempo real es estandarizar los oligonucleótidos del gen de referencia (actina) y el de interés. Para esto, se realizaron PCR punto final con la finalidad de estandarizar y obtener un solo producto de amplificación, tanto para el gen de interés (bHLH) como el gen de referencia de (actina). De acuerdo con el diseño de los oligonucleótidos, los tamaños de los productos de amplificación son de 195 pb para bHLH y 104 pb para actina. Los productos de amplificación obtenidos fueron los esperados (Fig. 13).

Estas condiciones se utilizaron para realizar los ensayos de curva estándar en el gen de actina lográndose un valor de correlación de $R^2 = 0.96$, lo cual demuestra que la eficiencia de los oligonucleótidos diseñados es buena. Las pruebas de PCR tiempo real, se realizaron a 30 ciclos partiendo de una concentración conocida de 250 ng/rxn con diluciones 1:5, por triplicado para mayor ajuste de la curva (Fig. 15A).

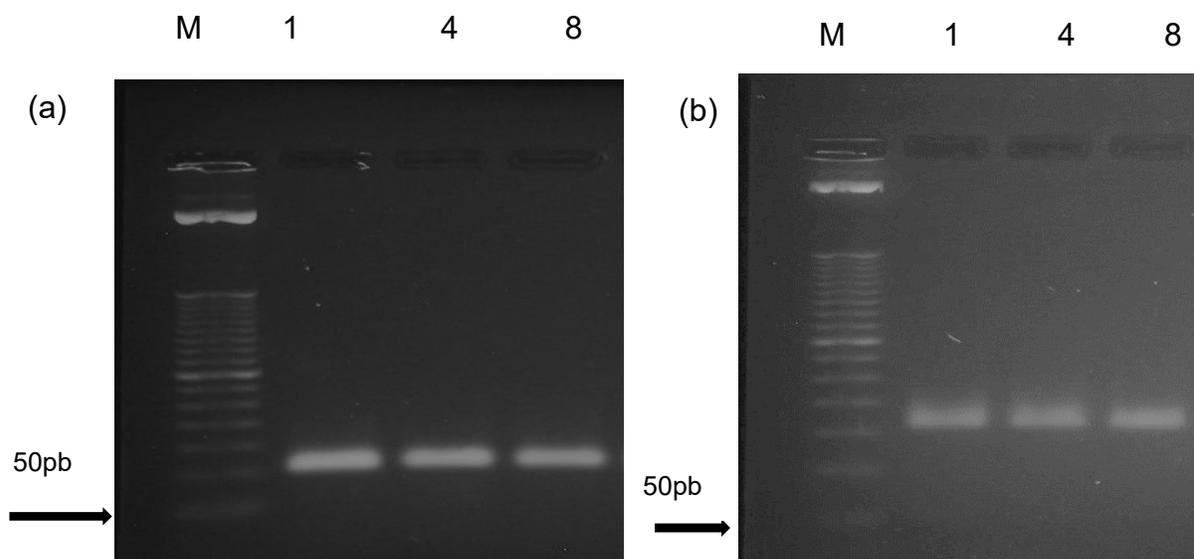


Figura 13. Amplificación punto final usando oligos para tiempo real para Actina y bHLH. Geles de agarosa al 2% en TBE 1X, teñidos con bromuro de etidio. a) Actina, b) bHLH, Carril M, marcador de tamaño molecular 50 pb invitrogen 10416-014, carriles 1, 4 y 8, productos de amplificación de los diferentes estadios de desarrollo.

Se procedió con la estandarización de los oligonucleótidos de bHLH para el ensayo de PCR tiempo Real, así como la estandarización del gen de actina lográndose un solo producto con un valor de $R^2= 0.96$, y un porcentaje de eficiencia de amplificación de 129.113. Resaltando la utilización efectiva de estos oligonucleótidos para el gen problema. Para los ensayos, se realizó un experimento por triplicado partiendo de 250ng/rxn a 5 puntos de dilución.

Las curvas obtenidas fueron utilizadas para los cálculos de los niveles de expresión relativa del factor bHLH en los estadios 1, 4 y 8 que corresponde a los meses de desarrollo del fruto de aguacate, para su normalización con la metodología de $2\Delta\Delta Ct$. De acuerdo con el resultado, se observó un nivel de expresión similar del gen bHLH

en los estadios 1 y 4 meses de desarrollo con una disminución en el estadio 8 (Fig. 14). Este nivel de expresión sugiere una participación del gen durante el desarrollo de la semilla particularmente en los estadios 1 y 4.

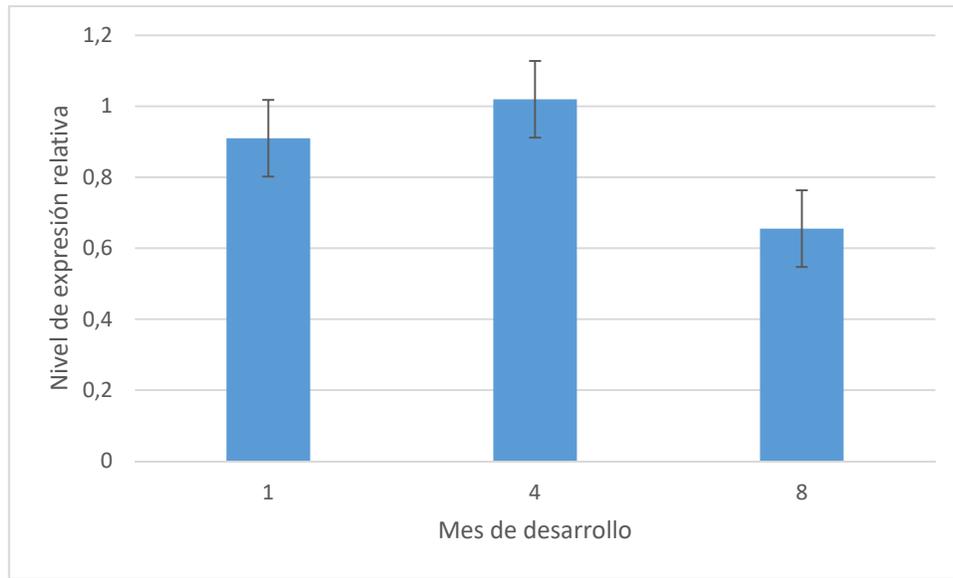


Figura 14. Ensayo de expresión relativa del gen bHLH PCR-tiempo real. cDNA de los estadios de desarrollo de semilla de 1, 4 y 8 meses.

8.5. Ensayo de expresión del gen bHLH de aguacate por PCR semicuantitativo

Con la finalidad de corroborar los resultados de los ensayos de tiempo real, se realizaron ensayos de PCR semicuantitativos. En las pruebas de PCR semicuantitativos con los mismos estadios que en la prueba anterior de PCR tiempo real, la tendencia es la misma, con una expresión similar en los estadios 1 y 4 teniendo una baja en la expresión en el estadio 8 confirmando los resultados obtenidos de las pruebas de PCR tiempo real (Fig. 15).

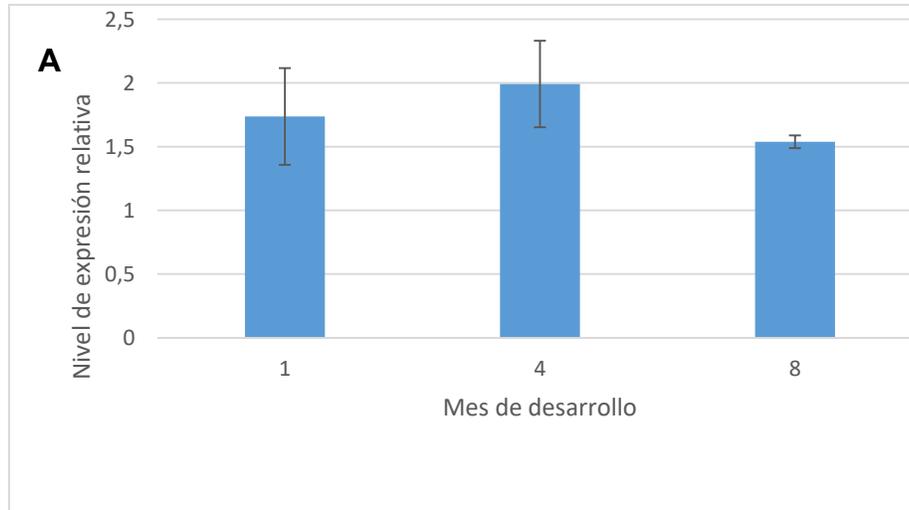


Figura 15. Ensayo de expresión del gen bHLH por PCR semicuantitativo. (A) expresión relativa del gen bHLH utilizando como referente el gen de actina. (B) gel de agarosa al 2% TBE 1X de los productos de PCR de bHLH y actina.

8.6. Ensayo de expresión del gen bHLH en diferentes estructuras de la planta.

Con la finalidad de conocer la expresión de este factor de transcripción en la planta de aguacate se realizaron ensayos de PCR punto final en diferentes estructuras; flores, hojas, raíz y semilla. Como se muestra en la (Fig. 16), se detectaron niveles de transcripción solamente en la semilla y en ninguna otra estructura de la planta.

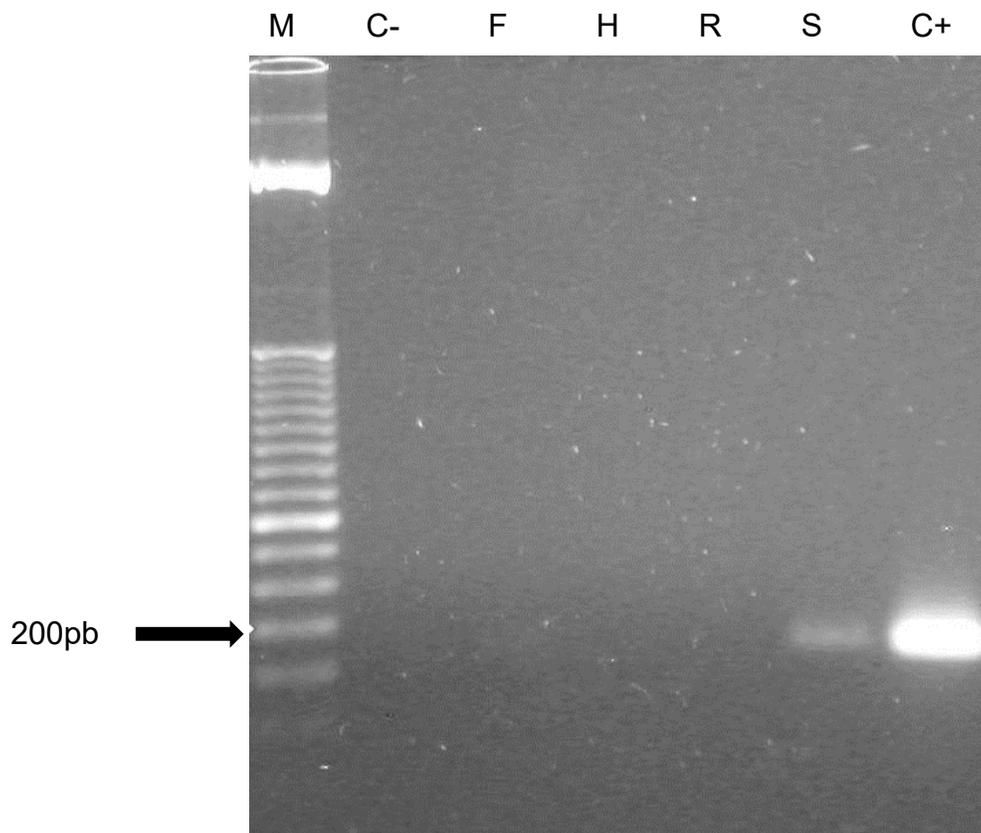


Figura 16. Ensayo de PCR punto final del gen bHLH en las diferentes estructuras de la planta de aguacate nativo mexicano. Gel de agarosa al 2%, M; Marcador de tamaño molecular de 50pb, C; Control negativo, F; Flor, H; Hoja, R; Raíz, S; Semilla, C+; Control positivo.

9. Discusión

El análisis bioinformático (ensamblado) de las lecturas obtenidas de la base de datos de los ESTs de semilla de aguacate permitió caracterizar una secuencia de 1117pb, en la cual se identificó un marco de lectura de 993 pb, el cual codifica para un factor de transcripción bHLH putativo de 331 aa. Los factores de transcripción se expresan generalmente en niveles bajos; sin embargo, en la colección EST de semilla de aguacate, se detectó una abundante expresión (123 reads) o cual puede sugerir un papel preponderante en el desarrollo de la semilla de aguacate. Como primera estrategia se buscó si la secuencia obtenida presentaba similitud con los genes ya reportados SPATULA (SPT), ALCATRAZ (ALC), INDEHISCENT (IND) y ZHOUPI (ZOU) los cuales codifican para factores de transcripción bHLH involucrados en el desarrollo de la semilla del modelo *Arabidopsis thaliana*, no encontrando ninguna similitud en la secuencia a excepción del motivo bHLH. Se realizó un BLAST con la base de datos del phytozome para encontrar si alguna secuencia de *Arabidopsis* mostraba una mayor similitud; los genes encontrados corresponden a los factores de transcripción bHLH96 y bHLH94 como se muestra a continuación:

>[AT1G72210](#).1 | Symbols: | basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein | chr1:27180066-27182268 FORWARD LENGTH=320
Length = 320

Score = 244 bits (622), Expect = 6e-65, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 159/309 (51%), Positives = 198/309 (64%), Gaps = 39/309 (12%)

```
Query: 1 MALEAVVFPQDLFGY-SCKDFYSLPAAFTFDDLKVEEKQKKDLVLDTETSSSLIGKNQNLA 59
MALEAVV+PQD F Y SCKDF F DL +E++ +D DT+ + +G+ Q
Sbjct: 1 MALEAVVYPQDPFSYISCKDF-----PFYDLYFQEEEDQD-PQDTKNNIKLGQGQ--G 50

Query: 60 TGFGSFCGNWDSSSSSILQNSSPEACT-----GDGFFNGSYYPE---ATPCGRRKRRR 109
GF S N + S N + E G S PP A GRRKRRR
Sbjct: 51 HGFASNNYNGRTGDYSDDYNYNEEDLQWPRDLPYGSADVDESQPPPSDVAAGGRRKRRR 110

Query: 110 AKSSKNIEEVENQRMTHIVVERNRRKQMNAYLAVLRSLMPPSYVQRGDQASIVGGAINFV 169
+SSKN EE+ENQRMTHI VERNRRKQMNAYLAVLRSLMPP Y QRGDQASIVGGAIN++
Sbjct: 111 TRSSKNKEEIEENQRMTHIAVERNRRKQMNAYLAVLRSLMPPYYAQRGDQASIVGGAINYL 170

Query: 170 KELEQLQSLE-----AQKRMTQQSEPGLTSPFANFFTFPQYSSSTNRSSTNEA 218
KELE LQS+E A T+ + + PF++FF FPQYS NR T+ A
Sbjct: 171 KELEHHLQSMPEPPVKTATEDTGAGHDQTKTTSASSSGPFSDFFAFPQYS---NR-PTSAA 226

Query: 219 VAENHSAIADIEVTMVESHANLKVFSKRRPKQLLKMVAGLQNLRLTILHLNVTISGRNGL 278
AE +A+IEVTMVESHA+LK+ +K+RP+QLLK+V+ +Q+LRLT+LHLNVT+ + L
Sbjct: 227 AAE---GMAEIEVTMVESHASLKILAKKRPRQLLKLVSIIQSLRLTLHLNVTTRDDSVL 283

Query: 279 YSFTVKVKK 287
YS +VKV++
Sbjct: 284 YSISVKVEE 292
```

>[AT1G22490](#).1 | Symbols: | basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein | chr1:7938448-7940489 REVERSE LENGTH=304
Length = 304

Score = 232 bits (592), Expect = 2e-61, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 143/297 (48%), Positives = 188/297 (63%), Gaps = 28/297 (9%)

```
Query: 1 MALEAVVFPQDLFGY--SCKDFYSLPAAFTFDDLKVEEKQKKDLVLDTETS-SLIGKNQN 57
M LEAVV+PQD FGY +CKDF F DL Q++ + DT+ + +G Q+
Sbjct: 1 MPLEAVVYPQDPFGYLSNCKDF-----MFHDLY---SQEEFVAQDTKNNIDKLGHEQS 50

Query: 58 LATGFGSFCGNW-DSSSSSILQNSSPEACTGDGFFNGSYYPEATPCGRRKRRRAKSSKNI 116
W D +L S E S+PP P RRKRRR ++ KN
Sbjct: 51 FVEQKGEDDHQWRDYHQYPLLIPSLGEBELGLTAIDVESHPP---PQHRRKRRRTRNCKNK 107

Query: 117 EEVENQRMTHIVVERNRRKQMNAYLAVLRSLMPPSYVQRGDQASIVGGAINFVKELEQLL 176
EE+ENQRMTHI VERNRRKQMNAYLAVLRSLMP SY QRGDQASIVGGAIN+VKELE +L
Sbjct: 108 EEIENQRMTHIAVERNRRKQMNAYLAVLRSLMPPSSYAQRGDQASIVGGAINYVKELEHIL 167

Query: 177 QSLEAQKRMTQQ-----SEPGLTSPFANFFTFPQYSSSTNRSSTNEAVAENHSAIADIE 230
QS+E ++ T S L PF +FF+FPQYS+ ++ + + A+IE
Sbjct: 168 QSMPEKRTRTHDPKGDKTSTSSLVGPFTDFFSFPQYSTKSSSDVPESSSP-----AEIE 222

Query: 231 VTMESHANLKVFSKRRPKQLLKMVAGLQNLRLTILHLNVTISGRNGLYSFTVKVKK 287
VT+ ESHAN+K+ +K++P+QLLK++ LQ+LRLT+LHLNVT++ + LYS +V+V++
Sbjct: 223 VTVAESHANIKIMTKKPRQLLKLITSLQSLRLTLHLNVTTLHNSILYSISVRVEE 279
```

Sin embargo, la expresión de estos dos genes no está caracterizada para *Arabidopsis thaliana*. Este dato es muy interesante pues abre la perspectiva de conocer que papel pudiesen tener estos genes en *Arabidopsis* y por ende un posible indicio del papel del factor de transcripción bHLH de aguacate.

Para conocer más sobre este gen se realizó el modelado 3D de la proteína debido a que en ocasiones las proteínas al tomar su conformación estructural pueden compartir motivos que las haga similares estructuralmente. Sin embargo, el modelado no aportó información, ya que las proteínas no son similares en su estructura tridimensional, indicando una gran diversidad de estos factores de transcripción. En lo alineamientos se observó que la secuencia de interés comparte residuos de aminoácidos con otras proteínas, sugiriendo que en los procesos en los que se encuentran involucrados son similares; como el reconocimiento de la molécula de DNA así como la formación de homo y heterodimeros con otros factores para así ser más estable al momento del reconocimiento. Las funciones específicas de estos genes no se encuentran descritas, además, en el modelo de las proteínas de estos factores de transcripción no se pueden observar motivos estructurales o plegamientos similares ni siquiera en el motivo bHLH, el cual es una de las partes más conservadas entre estas secuencias.

Sin embargo, un dato interesante de los estudios de expresión es que este factor de transcripción es muy estable a lo largo del desarrollo de la semilla. Se tiene un reporte en el frutos de uva de que este tipo de factores tiene una expresión en toda la planta pero mayoritariamente en el fruto, en el cual se expresa principalmente en la parte del mesocarpo aún más que en la semilla (Nicolas *et al.* 2013). También,

existen reportes de que en *Arabidopsis* este tipo de factores solo se expresan en las silicuas (Kondou *et al* 2008), sugiriendo que pueden tener una expresión organoespecífico. En referencia a lo anterior, los datos de expresión de este factor en la semilla podrían sugerir un papel preponderante en el génesis y desarrollo de la semilla, el embrión y del fruto ya que recientemente se ha reportado que el factor de transcripción bHLH de SPATULA de *Arabidopsis* es un regulador clave del tamaño de órganos de la planta como son los cotiledones y hojas (Makkena *et al.*, 2016). Para el estadio 8 (aproximadamente 8 meses de desarrollo del fruto) se tiene una disminución de la expresión, lo cual puede estar relacionado con la culminación del desarrollo del fruto en todas sus partes.

Debido a la escasez de reportes de trabajos con semillas de aguacate se tuvo que realizar la búsqueda de un gen de referencia para los trabajos de expresión, probándose varios genes como los de ubiquitina y ubiquitina de pequeño tamaño (SUMO), Ribosomales como 60s, 16s, tres regiones del gen de actina. Finalmente, se tuvo éxito con los de actina propuestos y ubiquitina de pequeño tamaño (sumo), ya que los otros oligonúcleotidos al momento de hacer las pruebas de validación nos arrojaban resultados de dos o más productos de amplificación y por lo cual no fueron buenos candidatos por la inespecificidad. Incluso con los resultados de esta investigación se puede proponer como un gen endógeno o base del desarrollo de la semilla al factor de transcripción bHLH de aguacate debido a su comportamiento estable.

Con los estudios de expresión en los diferentes órganos de la planta de aguacate, los resultados sugieren organoespecificidad de este gen para la semilla, resultados

similares se han obtenidos en genes como el ZHOUP1 de *Arabidopsis thaliana*, el cual se expresa exclusivamente en los cotiledones de la semilla (Yang *et al.*, 2008). Para reforzar este dato se realizó una búsqueda de la secuencia del factor de transcripción en la recientemente publicada base de datos del transcriptoma de aguacate nativo mexicano (Ibarra-Laclete *et al.*, 2015). Esta base de datos fue generada por secuenciación masiva utilizando diferentes órganos de la planta, el análisis se realizó utilizando el programa bioinformático unipro ugene 1.26, en la búsqueda se encontró un solo gen (unigen) con el identificador 16985 (Fig. 17), lo cual sugiere una secuencia única en el transcriptoma.

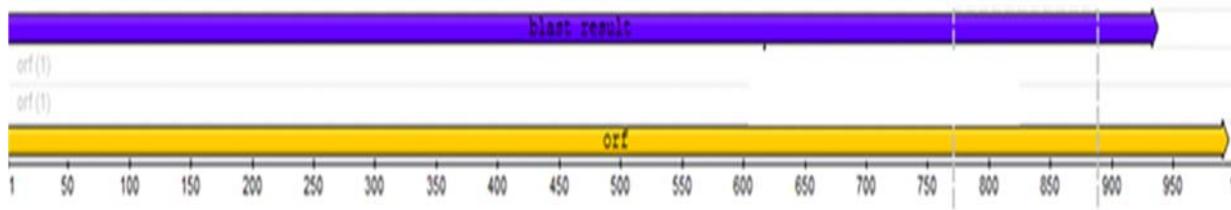


Figura 17. Blast local en la base de datos del transcriptoma de aguacate nativo mexicano, con el programa bioinformático (unipro UGENE 1.27) Unigen # 16985.

Esta base de datos además presenta una serie de tablas complementarias de niveles de expresión en aguacate de ciertos unigenes en diferentes partes de la planta, en estos reportes se menciona que para el unigen # 16985 que corresponde al factor de transcripción bHLH de *Persea americana* var. *drymifolia* presenta niveles de expresión en todos los órganos de la planta con valores de 3 a 32 (expresión). En el cuadro 3 se muestran estos niveles destacándose de manera mayoritaria la expresión en la semilla. Sin embargo, los autores refieren como un valor de corte para la expresión organoespecífica a valores por arriba de 4, los valores por debajo

de este punto de corte se tomarán como una expresión nula o ausente, lo cual refuerza el resultado de expresión mayoritaria en semilla.

En los resultados de PCR punto final que se realizaron en este trabajo se puede observar la expresión solo en semilla, lo cual contradice los resultados del trabajo de transcriptoma de Ibarra-Laclette *et al.* (2015), ya que en este se describen expresiones en diferentes estructuras de la planta. Sin embargo, aunque se reportan niveles de expresión estos son bajos y a la hora de analizar las secuencias de unigenes específicas y realizar un corte el cual permite eliminar ruidos posiblemente vinculados con el manejo de las muestras toman como valor este valor el número 4, cualquier valor por debajo a este lo describen como una expresión nula (cuadro 3).

Cuadro 3. Niveles de transcripción de bHLH encontrados en la base de datos del transcriptoma de aguacate nativo mexicano.

Semilla	Hoja	Tallo	Raíz	Yemas	Flores	Frutos
32.16	4.05	10.28	12.42	10.72	13.69	3.0

Cabe destacar que aunque esto es consistente con los datos generados en esta investigación con la información que se obtuvo de PCR punto final, es necesario realizar un ensayo de PCR tiempo real utilizando cDNA de los diferentes órganos de la planta, debido a la sensibilidad de esta prueba, nos permita determinar si existe una expresión muy baja en otras partes de la planta.

Entre muchas preguntas que quedan abiertas en este trabajo una que sobresale es la abundancia tan grande de reads de este mensajero en el transcriptoma de la semilla de aguacate, por lo general los factores de transcripción se encuentran

expresados a muy bajos niveles, hay otros factores de transcripción en la colección de ESTs cuya expresión es de 1 o 2 pero no de cientos, lo cual puede sugerir un papel protagónico en el desarrollo del fruto. Todo esto en el contexto de que hay una enorme heterogeneidad de los frutos de aguacate tanto en tamaño y forma para las diferentes variedades.

10. Conclusiones

Se logró obtener y caracterizar un transcrito que codifica para un factor de transcripción tipo bHLH en semilla de fruto de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*).

Los modelos tridimensionales de la proteína de este gen y su solapamiento no mostraron similitud estructural con las proteínas de los factores de transcripción tipo bHLH de las plantas probadas.

Los resultados de expresión de este factor de transcripción sugieren que es organoespecífico de semilla y estar asociado a la etapa de desarrollo de la misma.

11.- Perspectivas

- Realizar un estudio más detallado de la expresión de este factor de transcripción disectando la semilla (embrión, cotiledones)
- Utilizar las líneas insersionales de *Arabidopsis* para los genes bHLH96 y bHLH94 y observar el fenotipo en líneas homocigóticas
- Transformar plantas de *Arabidopsis* y jitomate sobreexpresando el gen
- Trabajar con semillas de otra variedad de aguacate
- Realizar un estudio de inmunolocalización en fruto

12. Literatura citada

- Abe H,Urao T, Ito T,Sekim, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. (2003) A rabiopsis ATMYC2 (bHLH) An ATMXB2(MYO) function as transcripiptinal activators in abscisic acid signaling.Plant Cell. 15(1):63-78
- Alvarez, J. and Smyth, D.R. (1999) CRABS CLAW and SPATULA, two Arabidopsis genes that control carpel development in parallel with AGAMOUS. Development, 126, 2377–2386.
- Alvarez, J. and Smyth, D.R. (2002) CRABS CLAW and SPATULA genes regulate growth and pattern formation during gynoecium development in Arabidopsis thaliana. Int. J. Plant Sci. 163, 17–41.
- Atchley, W.R, Fitch WM .(1997) Anatural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. Proc Natl Acad Sci.;94:5172–5176.
- Atchley, R.A, Burgess C, Keeney M.(1999) The effect of time course and context on the facilitation of semantic features in the cerebral hemispheres. Neuropsychology. ;13:389–403
- Benfey, P.N., Linstead, P.J., Roberts, K., Schiefelbein, J.W., Hauser, M.T., and Aeschbacher, R.A. (1993). Root development in Arabidopsis: Four mutants with dramatically altered root morphogenesis. Development 119, 57–70
- Ben-Ya’acov, A.G. Bufler, A.F. Barrientos-Priego, E. de la Cruz-Torres and L.López-López. 1992b. A study of avocado germplasm resources, 1988-1990.I. General description of the international Project and its findings. Proc. of Second World Avocado CongressII: 535-541.
- Bergh, B.1992. The origin, nature and genetic improvement of the avocado.California Avocado Society Yearbook 76:61-7
- Birnboim, H.C, Doly J Nucleic Acids Res. 1979 Nov 24;7(6):1513-23
- Boisnard-Lorig C, Colon-Carmona A, Bauch M, Hodge S, Doemer P, Bancharel E, Buck, M.J., and Atchley, W.R. (2003). Phylogenetic analysis of plant basic helix-loop-helix proteins. J. Mol. Evol. 56, 742–750.
- Brokaw, W.H.1987.Avocado clonal rootstock propagation. Proc. Inter. Plant Prop.Soc. 37:97-103

- Brooks, R.M., and H.P. Olmo. 1972 Register of New Fruit and Nut Varieties. Second Edition, University of California Press, Ltd. Berkeley, California. USA
- Busch M, Mayer U, Jurgens G (1996) Molecular analysis of the Arabidopsis pattern formation of gene GNOM: gene structure and intragenic complementation. *Mol Gen Genet* 250: 681–691
- Calkhoven, C.F. and Geert, A.B. (1996) Multiple steps in the regulation of transcription-factor level and activity. *Biochem. J.* 317: 329–342.
- Carrero-Paulet L, Galstyan A, Roig-Villanova I, Martinez-Garcia JF, Bilbao-Castro JR, Robertson DL. Genome wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in Arabidopsis, poplar, rice, moss and algae. *Plant Physiol.* 2010;153:1398–1412
- Castillon A, Shen H, Huq E (2007) Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends Plant Sci* 12:514–521.
- Di Laurenzio L., Wysockadiller, J., Malamy, J.E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M.G., Feldmann, K.A., and Benfey, P.N. 1996. The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root. *Cell* 86: 423-433.
- Doebley, J. and L. Lukens. 1998. Transcriptional regulation and the evolution of plant form. *Plant Cell* 10: 1075-1082.
- Douzery. E.J, Snell EA, Baptiste E, Delsuc F & Philippe H. (2004) The timing of eukaryotic evolution: Does a relaxed molecular clock reconcile proteins and fossils *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 15386.
- Dumas C, Haseloff J, and Berger F (2001) Dynamic analyses of the expression of the HISTONE::YFP fusion protein in Arabidopsis show that syncytial endosperm is divided in mitotic domains. *Plant Cell* 13: 495-509.
- Fairman, R., Chao, H.-G., Mueller, L., Lavoie, T.B., Shen, L., Novotny, J., and Matsueda, G.R. 1995. Characterization of a new four-chain coiled-coil: Influence of chain length on stability. *Protein Sci.* 4 1457–1469
- Fári, M. G. y Kralovánszky, U. P. (2006) The founding father of biotechnology: Károly (Karl) Ereky Orsós Ottó Laboratory, University of Debrecen, Centre of

- Agricultural Sciences, Department of Vegetable. *International Journal of Horticultural Science*. 2008-01-15
- Faure, J.E, Rotman N, Fortune P, Dumas C (2002) Fertilization in *Arabidopsis thaliana* wild type: developmental stages and time course. *Plant J* 30: 481–488
- Ferrandiz, C.Liljegren, SJ. Yanofsky, MF. Negative regulation of the SHATTERPROOF genes by FRUITFULL during *Arabidopsis* fruit development, *Science* (2000) 436-438
- Finnegan, J. & McElroy, D.: Transgene inactivation - plants fight back. *Biotechnology* 12 (1994) 883-888.
- Galstyan A, Bou-Torrent J, Roig-Villanova I, Martínez-García JF. (2012) A dual mechanism controls nuclear localization in the atypical basic-helix-loop-helix protein PAR1 of *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant* 5: 669–677
- Groszmann, M. Paicu, T. Smyth,D.R. Functional domains of SPATULA, a bHLH transcription factor involved in carpel and fruit development in *Arabidopsis*, *Plant Journal* 55 (2008) 40e52.
- Heim, M.A, Jakoby M, Werber M, Martin C, Weisshaar B, et al. (2003) The basic-helix-loop helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Mol Biol Evol* 20: 735–747.
- Heisler, M.G., Atkinson, A., Bylstra, Y.H., Walsh, R., and Smyth, D.R. (2001). SPATULA, a gene that controls development of carpel margin tissues in *Arabidopsis*, encodes a bHLH protein. *Development* 128, 1089–1098.
- Jin, W.E. M. Ibeagha-Awemu, G. Liang, F. Beaudoin, X. Zhao, and L. L. Guan. 2014. Transcriptome microRNA profiling of bovine mammary epithelial cells challenged with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* bacteria reveals pathogen directed microRNA expression profiles. *BMC Genomics* 15:181.. doi:10.1186/1471-2164-15-181
- Jones S. 2004 An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biol* 5:226.
- Kerppola, T.K, Curran T. Fos-Jun heterodimers and Jun homodimers bend DNA in opposite orientations: implications for transcription factor cooperativity. *Cell*. 1991 Jul 26;66(2):317–326

- Kondou Y, Nakazawa M, Kawashima M, Ichikawa T, Yoshizumi T, Suzuki K, Ishikawa A, Koshi T, Matsui R, Muto S, (2008) RETARDED GROWTH OF EMBRYO1, a new basic helix-loop-helix protein, expresses in endosperm to control embryo growth. *Plant Physiol* 147: 1924–1935
- Khorasanizadeh S. and Rastinejad, F. (2001) Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. *Trends Biochem. Sci.*, 26, 384–390.
- Klug, A. and J.W.R. Schwabe 1995. Zinc fingers. *FASEB J.* 9:597–604.
- Ledent, V. and M. Vervoort. 2001. The basic helix–loop–hélix protein family: comparative genomics and phylogenetic analysis. *Genome Res.* 11:754–770.
- Li X, Duan X, Jiang H, Sun Y, Tang Y, Yuan Z, Guo J, Liang W, Chen L, Yin J, Ma H, Wang J, Zhang D: Genome-wide analysis of basic/helix-loop-helix transcription factor family in rice and Arabidopsis. *Plant Physiol* 2006, 141:1167-1184
- Liljegren, S.J. Roeder, A.H.K. Kempin, S.A. Gremski, K., Østergaard, L., Guimil, S., Reyes, D.K. and Yanofsky, M.F. (2004) Control of fruit patterning in Arabidopsis by INDEHISCENT. *Cell*, 116, 843–853.
- Liu A, Wang Y, Zhang D, Wang X, Song H, Dang C, et al. (2013) Classification and evolutionary analysis of the basic helix-loop-helix gene family in the green anole lizard, *Anolis carolinensis*. *Mol Genet Genomics* 288: 365–380. doi: 10.1007/s00438-013-0755-7 PMID: 23756994
- Makkena, S., Lamb R.S. (2013). The bHLH transcription factor SPATULA is a key regulator of organ size in *Arabidopsis thaliana*. *Plant signaling & Behavior* 8:5 e 24140.
- Massari, M.E. and Murre C (2000) Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* 20(2):429-40
- Murre, C.P. McCaw, H. Vaessin, M. Caudy, L. Jan, Y. Jan, C. Cabrera, J. Buskin, S. Hauschka, A. Lassar, H. Weintraub, and D. Baltimore. 1989 Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generates complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58:537-544.
- McKnight SL & Yamamoto KR (eds) (1993) *Transcriptional Regulation*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. *Mechanisms of Transcription* (1998) Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 63.

- Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K. Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. *Plant Physiol.* 2009;5:88–95. doi: 10.1104/pp.108.129791.
- Papworth M, Kolasinska P, Minczuk M. (2006). Designer zinc-finger proteins and their applications. *Gene*17;366:27-38.
- Olsen, O.A (2004) Nuclear endosperm development in cereals and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell (Suppl)* 16: S214–S227
- Pillitteri, L. J. & Torii, K. U. 2007. Breaking the silence: three bHLH proteins direct cell-fate decisions during stomatal development. *BioEssays* 29, 861 –870.
- Pires, N, Dolan L. 2010. Origin and diversification of basic-helix-loop-helix proteins in plants. *Molecular Biology and Evolution* 27, 862–874.
- Rajani, S. and Sundaresan, V. (2001) The *Arabidopsis* myc/bHLH gene *ALCATRAZ* enables cell separation in fruit dehiscence. *Curr.Biol.* 11, 1914–1922.
- Ramsay, N.A. and Glover, B.J. (2005) MYB-bHLH- WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends Plant Science*, 10, 63-70.
- Rastinejad, F. Perlmann,T., Evans,R.M. and Sigler,P.B. (1995) Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature*, 375, 203–211.
- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, 2000. *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290: 2105-2110
- Robinson, K.A and Lopes, J.M (2000) *Saccharomyces cerevisiae* basic helix-loop-helix proteins regulate diverse biological processes. *Nucleic Acids Res* 28(7):1499-50.
- Rodriguez-Ezpeleta N, Brinkmann H, Burey SC, Roure B, Burger G, Löffelhardt W, et al. Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: green plants, red algae, and glaucophytes. *Curr Biol.* 2005; 15:1325–30.
- Savidge, B. Rounsley,S.D. Yanofsky,M.F. Temporal relationship between the transcription of 2 *Arabidopsis* MADS box genes and the floral organ identity genes, *Plant Cell* 7 (1995) 721e733.

- Simionato E, Ledent V, Richards G, Thomas-Chollier M, Kerner P, Coornaert D, Bernard M, Degnan, Vervoort M. 2007. Origin and diversification of the basic helix-loop-helix gene family in metazoans: insights from comparative genomics. *BMC Evol Biol.* 7:33
- Scott, J.G., Liu, N. and Wen, Z. (1998) Insect cytochromes P450 :diversity, insecticide resistance, and tolerance to plant toxins. *Comp Biochem Physiol Part C* 121: 147 –155.
- Skinner, M.K, Manikkam M, Guerrero-Bosagna C. Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. *Trends Endocrinol. Metab.* 2010; 21:214–222.
- Stevens, J.D. Roalson, E.H., Skinner, M.K. (2008). Phylogenetic and expression analysis of the basic helix-loop-helix transcription factor gene family: genomic approach to cellular differentiation. *Differentiation* 76(9): 1006—1022
- Toledo-Ortiz G, Huq E, Quail PH. 2003. The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell* 15, 1749–1770.
- Torres-Ruiz, R.A, Lohner A, Jurgens G (1996) The GURKE gene is required for normal organization of the apical region in the Arabidopsis embryo. *Plant J* 10: 1005–1016
- Thiele, D.J. Metal-regulated transcription in eukaryotes *Nucleic Acids Research*, 20 (1992), pp. 1183-1191
- Tsiantis, M. and A. Hay (2003). “Comparative plant development: The time of the leaf” *Nat Rev Genet* 4(3): 169–180
- Wang Y, Chen K, Yao Q, Zheng X, Yang Z (2009) Phylogenetic analysis of zebrafish basic helix-loop-helix transcription factors. *J Mol Evol* 68: 629–640
- Watson J, Baker T, Bell S et al. (2013) *Molecular Biology of the Gene*, 7th ed. Menlo Park, CA: Benjamin Cummings.
- William, L.O. 1977. The avocados, a synopsis of genus *Persea*, subg. *Persea*. *Economic Botany* 31:315-320

- Xu YL, Li L, Gage DA, Zeevaart JA: Feedback regulation of GA5 expression and metabolic engineering of gibberellin levels in Arabidopsis. *Plant Cell* 1999, 11(5):927–936
- Yamaguchi S, Sun T, Kawaide H, Kamiya Y: The GA2 locus of Arabidopsis thaliana encodes ent-kaurene synthase of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiol* 1998, 116(4):1271–1278
- Yang S, Johnston N, Talideh E, Mitchell S, Jeffree C, Goodrich J, Ingram G: The endosperm-specific *ZHOUP1* gene of *Arabidopsis thaliana* regulates endosperm breakdown and embryonic epidermal development. *Development* 2008 135: 3501-3509; doi: 10.1242/dev.026708

Apéndice I.

EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE PLANTAS 1.

Reactivos.

Buffer de lisis (Tris-borato, pH 7.5 150 mM, EDTA 50 mM, SDS 2%, Mercaptoetanol 1%), PCI 25:24:1, Cloroformo isoamilico 24:1, LiCl 9M, Mercaptoetanol, Acetato de Potasio 5M.

Metodología:

1. Pesar 100mg de tejido congelado con Nitrógeno líquido y pulverizarlo en un mortero.
2. Agregar 600µl de buffer de lisis +2µl de 2-β-mercaptoetanol y homogenizar en vortex.
3. Calentar 15 minutos en baño maría a 65°C
4. Mezclar rápidamente el homogenizado con 33.3 µl de acetato de potasio 5 M, agregándose inmediatamente después 375 µl de etanol puro frío y homogenizar la muestra.
5. Centrifugar la muestra a 10,000 rpm por 10 minutos y recuperar la fase acuosa.
6. Realizar una extracción con PCI y homogenizar seguido de centrifugar a 10,000 rpm por 10 minutos, recuperar la fase acuosa.
7. Realizar una extracción más con PCI, centrifugar a 10,000 rpm por 10 minutos, recuperar la fase acuosa.
8. Hacer una extracción más con cloroformo isoamilico frío 24:1, centrifugar a 10,000 rpm y recuperar la fase acuosa.
9. Precipitar el RNA con 1/3 de Cloruro de litio 3M y dejar precipitar a -20°C.

10. Centrifugar a 13,000 rpm por 20 minutos y tirar el sobrenadante.
11. Agregar 1ml de etanol al 70% y centrifugar a 10,000 rpm por 5 minutos.
12. Resuspender la pastilla en 35 μ l de agua destilada esteril.
13. Almacenar a -70°c hasta su uso.

Apéndice II

Mini prep lisis alcalina.

Reactivos.

Solución I (Tris-cl pH 8.0, EDTA pH 8.0, Glucosa 50Mm), Solución II (NaOH 0.2 N y SDS 1%), solución III, (Acetato de K 5M, Ácido acético glacial y agua), PCI: 25:24:1, Etanol absoluto, etanol 70%, agua destilada esteril.

1. Inocular un tubo con 3ml de medio Lb liquido incubar toda la noche a 37°C con agitación.
2. Vaciar a un tubo eppendorf.
3. Centrifugar a 12,000 rpm por 1 minuto.
4. Decantar el sobrenadante.
5. Resuspender la pastilla en 100 µl de solución I fría y mezclar en vortex.
6. Añadir 200µl de solución II fresca y mezclar por inversión e incubar en hielo por 5 minutos.
7. Añadir 150 µl de solución III, mezclar suavemente invirtiendo el tubo.
8. Incubar en hielo por 20 minutos.
9. Centrifugar a 12,000 rpm por 1 minuto.
10. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
11. Añadir 225 µl de PCI.
12. Centrifugar a 12,000 rpm por 5 minutos.
13. Transferir la fase acuosa a otro eppendorf limpio.
14. Precipitar con 1ml de etanol absoluto frío, mezclar bien e incubar 1 hora a -20°C
15. Centrifugar a 12,000 rpm por 10 minutos.

16. Decantar el sobrenadante y lavar la pastilla en 500 μ l de etanol al 70%, centrifugar a 12,000 rpm por 1 minuto y eliminar el sobrenadante.
17. Dejar secar 10 minutos a temperatura ambiente.
18. Resuspender en 30 μ l de agua destilada estéril.
19. Guardar en congelador para su uso.

Apéndice III

Oligonucleótidos bHLH para tiempo real

ATGGCGCTTGAAGCTGTTGTATTCCTCAAGATCTATTTGGTTACAGTTGCAAGGACTTTTACTCTT
TGCCAGCAGCTTTCACTTTTGATGATCTTAAAGTAGAAGAAAAGCAGAAGAAAGATCTAGTACTAG
ATACTGAGACTAGTAGCCTCATAGGGAAAAATCAAAATC **TAGCGACAGGATTTGGCAGTTT**TTGTG
GGAATTGGGATTCTCCTCTTCTCCATTCTACAAATTCATCCCCAGAAGCTTGCACTGGAGATG
GGTCTTTAATGGTTCTTATCCTCCTGAAGCGACGCCGTGC **GGTAGAAGAAGAGACGACGGGCA**
AAGAGCAGCAAGAACATAGAAGAAGTCGAGAACCAGAGAATGACCCACATTGTCGTCGAGCGCA
ACCGTCGGAAGCAGATGAACGAGTATCTTGCAGTGCTCAGATCTCTGATGCCACCCTCATATGTT
CAAAGGGGTGACCAAGCTTCCATCGTAGGTGGGGCAATAAATTTTCGTTAAGGAACTGGAACAAC
CCTCCAATCTCTTGAAGCCCAGAAGAGAATGACCCAACAATCCGAACCCGGGCTCACCTCACCTT
TCGCCAATTTCTTACCTTCCCTCAGTACTCTAGCTCGACCAACCGCAGTTCAACAAATGAAGCAG
TGGCCGAGAACCATTGCGCGATCGCTGACATCGAAGTGACGATGGTCGAAAGCCATGCCAATCT
CAAAGTGGTCTCCAAGCGGCGACCGAAGCAGCTCTTGAAGATGGTAGCCGGGCTCAAAAACCTT
CGTCTCACTATCCTCCATCTCAATGTGACAAGCATTGGAAAAATGGCCTCTACTTTTCAGTGGTA
AAGTTGGAAGAGAATTGCGGGCTCACGACCGTTGATGAAAATACCCCCTGCGGTTTATCATATGC
TAGGAAAGGAATCAAGAGGAGCCATACATTAATTGAAAAAATTTTACTGGGAGGGGGCCCAGGG
GCCCCCTTATCACTAAAAAATGGGAGTTTAAAGGGGTCCCTTTTATTTCCCGGGGGGGGAAT
TTTTAAACTCTGGGAAAAAAAATTTTTAAAAAGAGGGGGGTGGGGCCCCCCCACAAAAAAA
AAAAAA

bHLH RTFw 5' – TAGCGACAGGATTTGGCAGTTT – 3'

bHLH RTRv 5' - TGCCCCGTCGTCTCTTTCTTCTACC – 3'

Producto de amplificación: 195pb

Apéndice IV

Oligonucleótidos Actina para tiempo real.

ATGGCTGATGCAGAGGACATTACAGCCCCTTGTTTGTGACAATGGAAGTGGAAATGGTAAAGGCTGG
ATTTGCTGGAGATGATGCTCCAAGGGCGGTTTTCCCTAGCATTGTGGGTTCGGCCTCGACACACAG
GCGTTATGGTTGGGATGGGGCAGAAAAGATGCATATGTAGGAGATGAGGCTCAGTCTAAGAGAGG
TATTCTTACTTTGAAATATCCCATCGAGCATGGAATTGTGAGCAACTGGGACGACATGGAGAAGAT
TTGGCATCATACCTTCTACAATGAGCTCCGTGTGGCTCCTGAAGAACATCCAGTTCTCTTGACCGA
GGCCCCTCTCAACCCAAAAGCCAACAGGGGAGAAGATGACACAGATAATGTTTGAGACTTTCAATG
TTCCAGCAATGTATGTTGCCATTCAAGCTGTTCTCTCCCTCTATGCTAGTGGCCGTACCACAGGTA
TTGTAAGTGGATTTCGGGTGATGGTGTGACCCACACTGTCCCTATCTATGAGGGCTATGCACTTCCA
CATGCTATTCTCAGGCTTGACCTTGCTGGACGAGATCTGACAGATGCCCTGATGAAGATACTGAC
AGAGAGAGGGTATTCATTCACCACTACTGCTGAGAGGGAAATTGTTTCGTGACATGAAGGAGAAGC
TCGCTTATGTGGCTCTTGACTATGAGCAAGAACCTTGAGACTGCTAAGAGTAGCTCAACCATTGAAA
AGAGCTATGAGCTGCCCGATGGTCAGGTGATCACGATTGGGGCAGAGCGATTCCGCTGCCCTGA
GGTGTATTCCAGCCATCCCTCATTGGAATGGAAGCTGCTGGAATCCATGAGACTACGTACAAC
CAATCATGAAGTGTGATGTTGATATCAGGAAGGATTTGTATGGAAACATTGTGCTTAGCGGTGGTT
CCACCATGTTCCAGGCAT **TGCTGATCGTATGAGCAAGG**AGATCACTGCTCTTGCCCCAAGCAGC
ATGAAGATAAAGGTGGTGGCTCCTCCTGAAAGAAAGTA **CAGTGTCTGGATTGGAGGGT**CAATTCT
GGCCTCACTGAGCACCTTCCAACAGATGTGGATATCCAAGGGTGAGTACGATGAGTCTGGGCCAT
CTATTGTCCACAGGAAGTGCTTCTAG

Actina RTFw 5' – **TGCTGATCGTATGAGCAAGG** – 3'

Actina RTRv 5' – **ACCCTCCAATCCAGACACTG** – 3'

Producto de amplificación: 104pb.