

Etiquetas de secuencias expresadas diferenciales de frutos de aguacate raza mexicana (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*)

Enrique Ignacio Sánchez-González¹, Sanjuana Hernández-Delgado²,
Víctor Eustorgio Aguirre-Arzola³, Jorge Ariel Torres-Castillo⁴,
Adriana Gutiérrez-Díez⁵

Resumen -En este estudio se desarrollaron e identificaron etiquetas de secuencias expresadas diferencialmente (ESTs) de frutos inmaduros de *Persea americana* Mill. var. *drymifolia* del estado de Nuevo León, México. Diez genotipos con frutos de forma y tamaño diferentes fueron seleccionados para generar ESTs por la técnica de despliegue diferencial. Se obtuvieron en total 393 fragmentos diferenciales amplificados, 82 fragmentos diferenciales fueron secuenciados y editados para identificación y comparación en las bases de datos para nucleótidos y proteínas del NCBI. Cuarenta secuencias mostraron similitud significativa con secuencias de ARNm y/o secuencias de proteínas hipotéticas o predichas pertenecientes a *P. americana* y/o a otros géneros. Algunas secuencias estuvieron relacionadas a enzimas como flavanona-3-hidroxilasa (F3H), lecitina-colesterol aciltransferasa, glutatión-S-transferasamicrosomal y proteína pleiotrópica de resistencia a drogas. Con la información de la composición nucleotídica de las ESTs se podrán diseñar iniciadores para cuantificar niveles de expresión por RT-PCR en tiempo real de los genes, en diferentes etapas fenológicas del fruto y hacer comparaciones entre los genotipos que permitan determinar usos alternos de sus frutos.

Palabras clave: aguacate, raza Mexicana, despliegue diferencial, EST.

Differential expressed sequence tags of mexican race avocado fruits (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*)

Abstract -In this study, Differential Expressed Sequence Tags (ESTs) of immature fruits of *Persea americana* Mill var. *drymifolia* of the state of Nuevo León, Mexico were developed and identified. Ten genotypes with fruits of different size and shape were selected to generate ESTs by the differential display technique. In total, 393 amplified differential fragments were obtained, 82 fragments were sequenced and edited for identification and comparison with NCBI nucleotide and protein databases. Forty sequences showed significant similarity to mRNA sequences and / or sequences of hypothetical or predicted proteins belonging to *P. americana* and / or other genera. Some sequences were related to enzymes such as flavanone-3-hydroxylase (F3H), lecithin-cholesterol acyltransferase, glutathione-S-transferase microsomal and pleiotropic drug resistance protein. With the information of the nucleotide composition of ESTs, primers could be designed to quantify expression levels by real-time RT-PCR of genes in different phenological stages of the fruit and to make comparisons among genotypes that allow determining alternative uses of their fruits.

Index terms: avocado, Mexican race, differential display, EST.

Corresponding author:
E-mail: mcgudiez@aol.com

Received: September 13, 2016
Accepted : April 10, 2017

Copyright: All the contents of this journal, except where otherwise noted, is licensed under a Creative Commons Attribution License.



¹I.B. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Agronomía. México. E-mails: ei_sanchez@hotmail.com

²M. Sc. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Biotecnología Genómica. México. E-mails: sanetju@gmail.com

³Dr. Sc. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Agronomía. México. E-mails: veaguirre@gmail.com

⁴Dr. Sc. Universidad Autónoma de Tamaulipas. Instituto de Ecología Aplicada. México. E-mails: jorgearieltorres@hotmail.com

⁵Dr. Sc. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Agronomía. Campus de Ciencias Agropecuarias. Francisco Villa S/N. Col. Ex hacienda El Canadá. Gral. Escobedo, Nuevo León. CP. 66050. México. Tel: (+52)8113404399. E-mails: mcgudiez@aol.com

Introducción

El árbol de aguacate tuvo su origen en la parte centro de México y Centroamérica y los hallazgos de aguacates primitivos en cuevas de la Sierra Madre Oriental de México evidencian que el estado de Nuevo León forma parte del centro de origen del aguacate raza Mexicana (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*) (GUTIÉRREZ-DÍEZ et al., 2015). *Drymifolia* es una variedad que es resistente a enfermedades de la raíz y fuente de genes de resistencia a otras enfermedades y plagas; es además fuente rica y diversa de metabolitos secundarios antagonistas a los herbívoros y patógenos, la acumulación de estos y otros compuestos está bajo fuerte control genético, lo que puede aprovecharse en los programas de mejoramiento genético de aguacate (TORRES-GURROLA et al., 2009). El uso de portainjertos de la variedad *drymifolia* es la base de la producción de aguacate Hass en las principales áreas cultivadas en el mundo (RINCÓN-HERNÁNDEZ et al., 2011). En los últimos años una vertiente de investigación molecular en aguacate ha sido la identificación de genes específicos y etiquetas de secuencias expresadas (ESTs, Expressed Sequence Tags) (PLIEGO-ALFARO et al., 2013) relacionadas con la maduración de los frutos y el desarrollo floral (CHANDERBALI et al., 2008). La mayoría de las investigaciones en aguacate hasta el momento se han enfocado a estudiar variedades híbridas como Hass, existiendo poca investigación con respecto a la variedad *drymifolia* (LÓPEZ-GÓMEZ et al., 2007; CUIRIS-PÉREZ et al., 2009; GUTIÉRREZ-DÍEZ et al., 2009; ACOSTA et al., 2012). Los proyectos de ESTs secuencian gran número de fragmentos obtenidos de bibliotecas de ADNc generadas de diferentes estructuras y estadios de desarrollo, permitiendo definir y caracterizar funciones de los genes involucrados en dichos procesos que pueden posteriormente ser utilizados en programas de mejoramiento y manejo de postcosecha (LÓPEZ-GÓMEZ et al., 2007). Un estudio preliminar a la secuenciación del genoma de *drymifolia* muestra que 42% de los genes secuenciados se relacionan con metabolismo, 20% son de función desconocida, 14% corresponden a maduración de fruto, 8% se involucran en síntesis de ácidos grasos, 6% en respuesta a patógenos, 6% son no reportados y 4% se involucran en senescencia (LÓPEZ-GÓMEZ et al., 2007). La elucidación de las bases genéticas relacionadas con el desarrollo, la maduración y el almacenamiento del fruto de aguacate, así como las relacionadas con la resistencia o tolerancia a enfermedades, abrirá oportunidades de transferir estas características agronómicas deseables. Un avance importante en la identificación de genes de este cultivo es la publicación del transcriptoma de *drymifolia* realizada por Ibarra-Laclette et al. (2015). En Nuevo León, México, existen genotipos cultivados y silvestres de *drymifolia* con características fenológicas y morfológicas contrastantes (ACOSTA et al., 2012; GUTIÉRREZ-DÍEZ et al., 2015); la corta vida de anaquel de sus frutos no les permite competir contra variedades

como Hass y Fuerte. La identificación de usos alternos al consumo en fresco del fruto de la variedad *drymifolia*, permitirá la potenciación del cultivo y el mejoramiento de las condiciones socioeconómicas de los productores. En este trabajo se desarrollaron e identificaron ESTs de frutos de genotipos de *Persea americana* Mill. var. *drymifolia* del estado de Nuevo León, México, con el fin de identificar características genéticas que permitan determinar diferencias y a mediano plazo, definir usos alternos para el cultivo del aguacate.

Materiales y Métodos

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México. Mesocarpio de frutos inmaduros de 6 meses aproximados de edad, de diez genotipos de *P. americana* var. *drymifolia* recolectados en los municipios de Aramberri y General Zaragoza, Nuevo León, México, fueron utilizados para generar ESTs por la técnica de despliegue diferencial mediante retrotranscripción seguida por reacción en cadena de la polimerasa (DDRT-PCR). Los genotipos analizados fueron caracterizados como Criollos Nativos: Criollo Bola, Criollo 2 y Todo el Año; Criollos Silvestres: Silvestre; y Criollos Mejorados: Cuerno, Leonor, Mantequilla, María Elena, Pato, y Plátano Grueso (Figura 1). Los criollos mejorados son genotipos seleccionados y propagados a través de injertos, los criollos nativos son genotipos provenientes de semilla que se encuentra en huertas, mientras que los criollos silvestres son genotipos provenientes de semilla que se encuentran en áreas sin disturbio. La extracción de ARN se realizó con el protocolo modificado de Zamboni et al. (2008), la cuantificación e integridad se determinaron por espectrofotometría y geles de agarosa al 2%. Las ESTs se generaron utilizando el estuche comercial RNAimage® (kit 11) de GenHunter (EUA) con los tres iniciadores de anclaje para la retrotranscripción y los ocho iniciadores de secuencia arbitraria contenidos en el estuche; la preparación de las mezclas de reacción y el programa térmico utilizado fueron los establecidos en el protocolo del estuche comercial. Se realizaron pruebas de reproducibilidad por triplicado en cinco genotipos seleccionados al azar para corroborar el tamaño y producción de los fragmentos amplificados. El análisis de fragmentos diferenciales se realizó por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliácridamida al 6% y tinción con AgNO₃ (BENBOUZA et al., 2006). Fueron seleccionados y recuperados fragmentos amplificados (ADNc) diferenciales entre uno o varios de los genotipos con peso molecular superior a 100 pb y su reamplificación fue corroborada en geles de agarosa al 2%. Noventa y cuatro fragmentos con tamaño estimado de 390 a 1500 pb se seleccionaron para secuenciación por duplicado que fue realizada por Eurofins MWG Operon (E.U.A.). La edición de las secuencias se realizó con el

programa Chromas Lite V2.1.1, la alineación se realizó con los programas GENTle V1.9.4 y CodonCodeAligner V5.0.2. Las secuencias editadas se analizaron en las bases de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) mediante comparación de nucleótidos y

proteínas utilizando los algoritmos de Blast-nt, Blast-est, tBlastx-nt y tBlastx-est. Se consideraron secuencias altamente similares aquellas que mostraron valor de corte de $E < 1.0 \times 10^{-5}$. Se reportaron ESTs que mostraron similitud con secuencias de *Persea americana* aunque el valor E fue mayor a 1.0×10^{-5} .

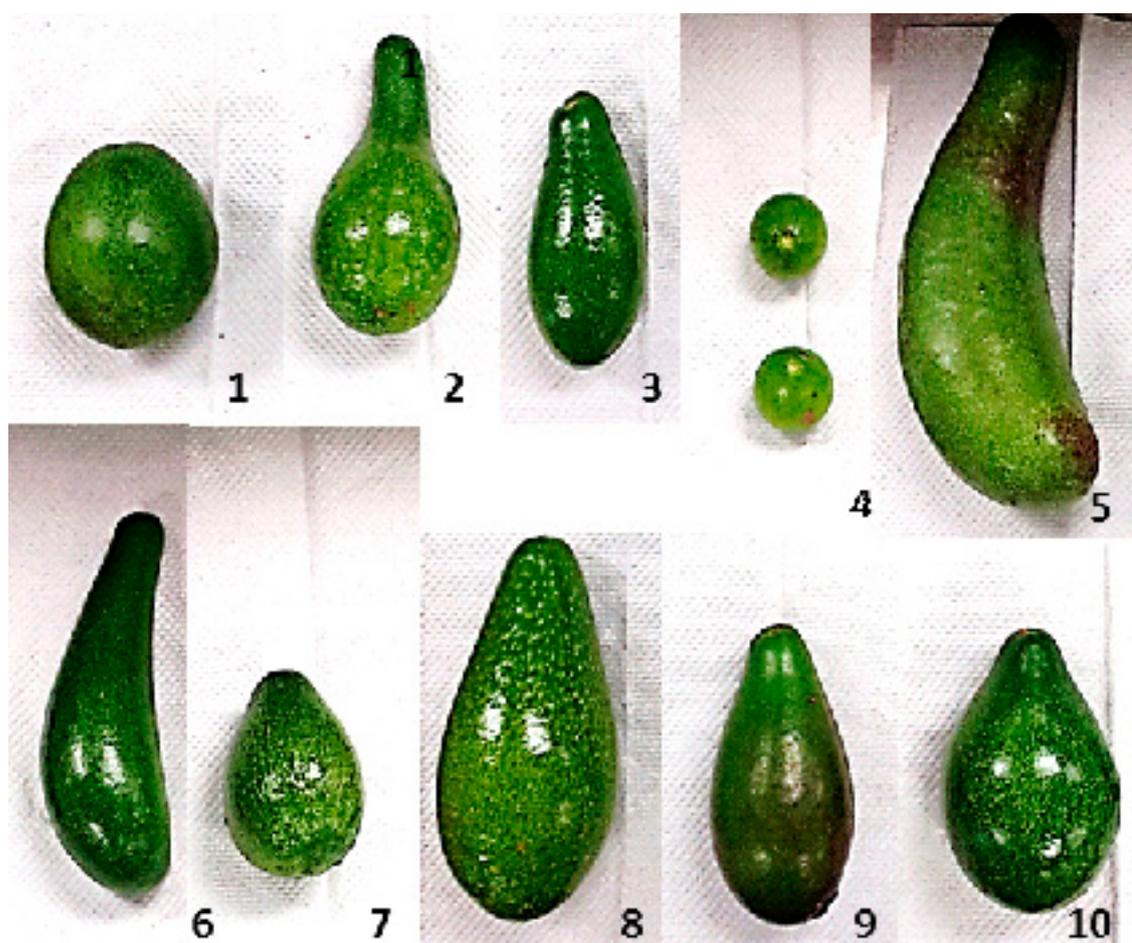


Figure 1. Frutos de aguacate raza mexicana. 1) Criollo Bola; 2) Criollo 2; 3) Todo el Año; 4) Silvestre; 5) Pato; 6) Cuerno; 7) Mantequilla; 8) Plátano Grueso; 9) María Elena; 10) Leonor. El largo de fruto de Silvestre es de 2.5 cm mientras que el largo del fruto Pato es de 22.5 cm.

Resultados y discusión

Se obtuvieron en total 393 fragmentos diferenciales amplificados con reproducibilidad del 100% y con intervalo de tamaño de 95 a 1500 pb. De las 94 ESTs secuenciadas, 12 fueron descartadas en la edición, las 82 ESTs restantes se identificaron con las siglas FA_Pa01 a FA_Pa82. La reproducibilidad de secuenciación fue de 98-100%. Veintinueve ESTs tuvieron secuencia única con los genotipos Criollo Bola (5 ESTs), Criollo 2 (2 ESTs), Leonor (3 ESTs), Mantequilla (4 ESTs), María Elena (3 ESTs), Pato (4 ESTs), Plátano Grueso (1 EST), Silvestre (6 ESTs), Todo el Año (1 EST). Diez grupos se formaron durante el alineamiento de secuencias en el análisis de redundancia y cuarenta secuencias presentaron homologías significativas con al menos uno de los algoritmos utilizados durante la comparación con las bases de datos del NCBI (Tabla 1). Con Blastnt, tres ESTs mostraron homología con secuencias de un gen parcial de la enzima flavanona-3-hidroxilasa (F3H) de distintos cultivares de *Persea americana*; el polimorfismo de este locus se utilizó para analizar la estructura poblacional de 21 accesiones de aguacate silvestre e inferir el origen geográfico de 33 cultivares (CHEN et al., 2008). La enzima F3H puede considerarse como proteína relacionada con el mecanismo de defensa de las plantas junto con otras enzimas indispensables en la biosíntesis de fitoalexinas como chalcona sintasa (CHS) y denilalanil-amonioliase (CORTÉS et al., 2010). F3H participa en la ruta de síntesis de antocianinas y taninos condensados, las antocianinas tienen un papel clave en la señalización entre plantas y microorganismos, en la fertilidad masculina de algunas especies, en la protección contra los rayos UV, en defensa de las plantas como agente antimicrobiano así como agente persuasivo de la alimentación de insectos (APPEL; COCROFT, 2014; LANDI et al., 2015; WINKEL-SHIRLEY, 2001). La identificación de genotipos que presentan esta secuencia y su evaluación para determinar si presentan mecanismos de defensa contra insectos y patógenos, abre la posibilidad del uso de esos genotipos en programas de mejoramiento como portainjertos o en esquemas de cruza dirigidas. Dos ESTs mostraron identidad con secuencias de función desconocida de *Vitis vinifera* y secuencias de *Theobroma cacao* de una proteína pleiotrópica de resistencia a drogas (PDR) y de la enzima lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT). Las PDR abarcan un amplio grupo de proteínas de transporte, algunas relacionadas con funciones fisiológicas como detoxificación, movimiento estomatal, transporte de fitohormonas y translocación de metabolitos secundarios como respuesta a condiciones de estrés biótico y abiótico, así como transporte de diversos compuestos sin composición química en común (BESSIRE et al., 2011; CROUZET et al., 2006; NURUZZAMAN et al., 2014). Los genes PDR presentan diferentes patrones de expresión tanto a nivel del órgano como a nivel de respuesta a

factores bióticos y abióticos. Varios miembros de estos genes PDR se expresan en órganos reproductivos como las flores, aunque este hecho sustenta la función de defensa de los genes, existe la hipótesis de que son responsables del transporte de fragancias florales durante el proceso de polinización (NURUZZAMAN et al., 2014). A pesar de que no hay reportes de la función de las PDR en el proceso de maduración del fruto, se ha reportado la presencia de una PDR en frutos de cítricos dulces (*Citrus sinensis*), para conocer su función bajo condiciones específicas, será necesario realizar nuevas investigaciones a futuro (AMARAL et al., 2007). *Vitis vinifera* se caracteriza porque presenta estilbenos, hidrocarburos aromáticos que están relacionados a flavonoides y que son sintetizados por grupos de plantas que no tienen relación entre ellas como *Vitis*, *Arachis hypogaea* y *Pinus sylvestris*, por lo que parece que diferentes ramas de esta ruta biosintética han cambiado o se han perdido durante la evolución (WINKLEY-SHIRLEY, 2001). El genotipo que presentó la EST relacionada con las secuencias de *Vitis vinifera* fue el Silvestre en cuyo caso la EST fue secuencia única. La otra EST relacionada se presentó de nuevo en el genotipo Silvestre así como en Criollo Bola, Criollo 2, Leonor, María Elena, Plátano Grueso y Todo el Año. Por las características de forma y tamaño de fruto, el genotipo Silvestre puede considerarse como ancestro de los genotipos de la variedad *drymifolia*. El genotipo Todo el Año se caracteriza porque produce flores durante dos épocas del año por lo que presenta frutos fisiológicamente maduros durante la temporada considerada como normal para la mayoría de los genotipos (julio-agosto) y en temporada donde los genotipos tienen frutos en desarrollo (marzo-abril).

La LCAT está relacionada con el metabolismo de glicerolípidos en *Theobroma cacao* (MOTAMAYOR et al., 2013), la familia de las proteínas LCAT en las plantas se divide en cuatro grupos: PDAT (fosfolípido:DAG aciltransferasa), LCAT (lecitina-colesterol aciltransferasa), PSAT (fosfolípido:esterol aciltransferasa) y Fosfolipasa A (PLA) (YOON et al., 2012). La alineación de las secuencias de estas proteínas revelan siete regiones características conservadas; la triada catalítica Ser-Asp-His previamente identificada en LCAT de mamíferos, plantas y PDTA de levaduras (YOON et al., 2012), forma parte de un dominio catalítico de las enzimas LCAT en el cual un ácido graso se une en la posición sn-2 de la fosfatidilcolina (PC) ocurriendo la transesterificación liberando un grupo hidroxil del colesterol para formar éster de colesterol (PEELMAN et al., 1998). La LCAT en mamíferos cataliza la síntesis de éster de colesterol en plasma sanguíneo, secuencias de LCAT de plantas se utilizan para modificar la composición de esteroides para su aplicación en la industria de alimentos funcionales y farmacéutica (LASSNER et al., 2007). Los genotipos en los que se presentaron las ESTs relacionadas con PDR y LCAT fueron Criollo Bola, Criollo 2 (criollos nativos) y Silvestre (criollo silvestre) así como Leonor, María Elena

y Plátano Grueso (criollos mejorados). Plátano Grueso es el genotipo de mayor aceptación por las cualidades de sus frutos (tamaño y sabor). El genotipo Leonor se caracteriza por su buen sabor aunque su fruto presenta menor vida de anaquel mientras que María Elena, de acuerdo con las experiencias de los productores, presenta resistencia a enfermedades; extractos foliares de este genotipo están siendo evaluados por su papel en la modulación de la expresión génica de componentes involucrados en el *quorum sensing* de *Staphylococcus aureus* (GARCÍA et al., 2015). Una EST única, presentada solo por el genotipo María Elena, mostró identidad con una proteína de transportador de potasio de garbanzo (*Cicer arietinum*). Miembros de la familia de transportadores de potasio se han reportado en la epidermis del fruto de la vid al inicio de su desarrollo, sugiriendo que la función de las proteínas es la acumulación de potasio en el fruto (GIERTH; MÄSER, 2007).

Con Blastn-est, 31 ESTs mostraron homología con secuencias de ARNm sin función putativa asignada de las bibliotecas de *Persea americana* del Proyecto del Genoma Floral (<http://fgp.bio.psu.edu>) y del Proyecto del Genoma de la Angiosperma Ancestral (www.AncestralAngiosperm.org). En la comparación con proteínas (tBlastx-nt), una EST presentó similitud con la proteína hipotética glutatión-S-transferasa microsomal (GST) de *Oryza brachyantha*, las proteínas GST catalizan reacciones glutatión dependientes de la transferasa o peroxidasa sobre substratos hidrófobos (DIXON; EDWARDS, 2010). Las GST vegetales han sido caracterizadas por su habilidad para conferir resistencia a los herbicidas en la mayoría de especies de cultivos mayores. Otras subclases han estado implicadas en la respuesta a diversos estreses incluyendo el ataque de patógenos, estrés oxidativo y toxicidad de metales pesados, además de participar en la respuesta celular a auxinas y durante el metabolismo normal de metabolitos secundarios vegetales como antocianinas y ácido cinámico (MARRS, 1996). Utilizando tBlastx-est, 22 ESTs mostraron homología con los mismos números de acceso de secuencias de *Persea americana* que se obtuvieron durante la comparación con el algoritmo Blast-est, y tres más presentaron similitud con nuevos números de acceso de *P. americana*. La mayoría de las ESTs obtenidas mostraron homología con las reportadas por el proyecto del Genoma Floral. A pesar de la diferencia en tamaño y forma de los frutos de los genotipos analizados, no se encontraron secuencias relacionadas con estas características; en el caso de las bases genéticas del tamaño de fruto, Dahan et al. (2011) reportaron dos ADNc que codifican para dos ciclinas relacionadas con el proceso de mitosis en frutos jóvenes de tamaño normal de aguacate Hass. El análisis de ADNc de la biblioteca de la pulpa de fruto de la variedad *drymifolia*, revela la presencia de algunos transcritos que se encuentran de forma abundante como metaloteonina tipo 1, 2 y 3, oleosina, endoquitinasa, fructosa bisfosfatoaldolasa, entre otros (PLIEGO-ALFARO et al., 2013); sin embargo,

ninguna de las secuencias obtenidas en este trabajo coinciden con estos, pudiendo ser posiblemente porque utilizamos genotipos diferentes a los utilizados en el estudio. A partir de la publicación del transcriptoma del aguacate específicamente de la variedad *drymifolia* por Ibarra-Laclette et al. (2015), se cuenta con información sobre patrones de expresión de genes involucrados en la biosíntesis de ácidos grasos y el proceso de maduración del fruto, estos autores reportaron que el 80.94% de los unigenes mostraron alta identidad con al menos una proteína de planta de las que se encuentran disponibles en las bases de datos del NCBI, el resto de los unigenes no tienen función asignada. El agrupamiento jerárquico de los transcriptomas reflejó la similaridad de funciones entre los órganos, así los transcritos de semilla y fruto se agruparon (IBARRA-LACLETTE et al., 2015) y puede ser la explicación de que 31 de las ESTs aquí obtenidas, mostraron similitud con secuencias de *Persea americana* del proyecto del Genoma Floral.

Tabla 1. ESTs que presentaron homologías significativas con secuencias reportadas en la base de datos del NCBI.

Algoritmo	EST FA-Pa#	Valor E	Organismo / Secuencia/Función
Blastn-nt	01 07 66	7.00E-06 0.41 5.00E-06	<i>P. americana</i> / Gen parcial enzima flavanona-3-hidroxilasa (F3H) / Ruta síntesis de antocianinas y taninos condensados.
	09 37	5.00E-21 2.00E-19 2.00E-12 4.00E-09	<i>Vitis vinifera</i> / Proteína pleiotrópica de resistencia a drogas (PDR) y enzima lecitina-colesterol aciltransferasa <i>Theobroma cacao</i> / PDR / Respuesta a estrés biótico y abiótico, transporte de metales pesados.
	26	2.00E-08	<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> / Proteína FAR1 (<i>Far-red impaired response</i>) / Regulación acumulación nuclear de fitocromo A.
	34	7.00E-44	<i>Medicago truncatula</i> / Gen proteína 8f relacionada a autofagia / Respuesta condiciones estrés celular y remodelación de estructura intracelular durante diferenciación celular.
	45	1.00E-31	<i>Agathis dammara</i> / DNA de cloroplasto, genoma completo.
	81	2.00E-27	<i>Cicer arietinum</i> / Transportador de potasio.
Blastn-est	01, 02, 04, 06, 08, 10, 13, 15, 18, 21, 26, 29, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 41, 42, 44, 48, 59, 61, 63, 66, 68, 70, 73, 76, 79	0.013 a 3.00E-119	<i>P. americana</i> / mRNA sin función putativa asignada, Bibliotecas del Proyecto Genoma Floral (http://fgp.bio.psu.edu y Genoma de la Angiosperma Ancestral (www.AncestralAngiosperm.org).
tBlastx-nt	12	3.00E-22	<i>Oryza brachyantha</i> / Proteína hipotética glutatión-S-transferasa microsomal / Cataliza reacciones glutatión dependientes de transferasa o peroxidasa sobre sustratos hidrofobos.
	09	3.00E-26	<i>Citrus sinensis</i> / PDR / Respuesta a estrés biótico y abiótico, transporte de metales pesados.
	26	9.00E-38	<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> / Proteína FAR1 / Regulación acumulación nuclear de fitocromo A.
	34	2.00E-23	<i>Citrus sinensis</i> / Proteína 8f relacionada a autofagia / Respuesta condiciones estrés celular y remodelación de estructura intracelular durante diferenciación celular.
	71	3.00E-07	<i>Solanum lycopersicum</i> / clona del cromosoma 8.
	81	6.00E-15	<i>Phaseolus vulgaris</i> / Transportador de potasio.
tBlastx-est	01, 04, 08, 13, 15, 21, 26, 29, 32, 33, 34, 35, 39, 41, 42, 44, 46, 48, 59, 61, 63, 68, 70, 73, 78	0.069 a 8.00E-36	<i>P. americana</i> / Mismas accesiones que en Blast-est. Las ESTs 26, 68 y 78 fueron similares con otras accesiones de <i>P. americana</i> .

Conclusiones

En la mayoría de los resultados obtenidos durante el análisis de las ESTs, se observó alta similitud con ESTs de *Persea americana* reportadas con función no definida, y en menor medida con proteínas de funciones variadas de plantas de distintos géneros. La información generada en este estudio permitirá realizar análisis específicos para los genotipos de acuerdo con la similitud presentada y determinar la factibilidad de usos alternos de los frutos o su utilización en programas de mejoramiento genético. Con la información de la composición nucleotídica de las ESTs obtenidas, se podrán diseñar iniciadores para cuantificar los niveles de expresión por medio de RT-PCR en tiempo real de los genes, en diferentes etapas fenológicas del fruto y hacer comparaciones entre los genotipos. Los productos de PCR obtenidos de los fragmentos asociados con algún gen de interés se pueden utilizar como sondas en análisis del tipo Northern dotplot y/o diseñar iniciadores para la técnica Primer walking y así tratar de encontrar la secuencia completa de dichos genes. Ahora que ya se encuentra disponible el transcriptoma del aguacate raza Mexicana, será posible estimar la función de cada uno de los diferentes genes detectados y sugerir su asociación a alguna característica agronómica de interés.

Agradecimientos

Al Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP) de la Secretaría de Educación Pública (SEP-México), por el financiamiento del proyecto “Estudio y Conservación de Recursos Genéticos de Aguacate” del cual este estudio formó parte.

Referencias

ACOSTA, D. E.; HERNÁNDEZ, I.; ALMEYDA, I. H. Evaluación de aguacates criollos en nuevo León, México: Región Sur. **Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas**, Texcoco, v. 3, n. 2, p. 245-257, 2012.

AMARAL, A.M.D.; SAITO, D.; FORMIGHIERI, E.F.; RABELLO, E.; DE SOUZA, A.N.; SILVA-STENICO, M.E.; TSAI, S.M. Identification of citrus expressed sequence tags (ESTs) encoding pleiotropic drug resistance (PDR-like proteins). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.30, n.3, p.857-867, 2007.

APPEL, H.M.; COCROFF, R.B. Plants respond to leaf vibrations caused by insect herbivore chewing. **Oecologia**, Berlin, n.175, p.1257-1266, 2014.

BENBOUZA, H.; JACQUEMIN, J-M.; BAUDOIN, J-P; MERGEAI, G. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrilamide gels. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, Belgique, v.10, n.2, p.77-81, 2006.

BESSIRE, M.; BOREL, S.; FABRE, G.; CARRAÇA, L.; EFREMOVA, N.; YEPHREMOV, A.; CAO, Y.; JETTER, R.; JACQUAT, A-C.; MÉTTRAUX, J-P.; NAWRATH, C. A member of the pleiotropic drug resistance family of ATP binding cassette transporters is required for the formation of a functional cuticle in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v.23, p.1958-1970, 2011.

CHANDERBALI, A.S.; ALBERT, V.A.; ASHWORTH, V.E.T.M.; CLEGG, M.T.; LITZ, R.E.; SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. *Persea americana* (avocado): bringing ancient flowers to fruit in the genomics era. **BioEssays**, New York, n.30, p.386-396, 2008.

CHEN, H.; MORELL, P.L.; DE LA CRUZ, M.; CLEGG, M.T. Nucleotide diversity and linkage disequilibrium in wild avocado (*Persea Americana* Mill.). **Journal of Heredity**, Washington, v.99, n.4, p.382-389, 2008.

CORTÉS, M.A.; HERNÁNDEZ, A.; LÓPEZ, R.; SALGADO, R. La búsqueda de genes de resistencia como una alternativa para la selección de portainjertos de aguacate con tolerancia a *Phytophthora cinnamomi*. **Biológicos**, Morelia, v.12, n.2, p.143-150, 2010.

CROUZET, J.; TROMBIK, T.; FRAYSSE, A.S.; BOUTRY, M. Organization and function of the plant pleiotropic drug resistance ABC transporter family. **FEBS Letters**, New York, v.580, n.4, p.1123-1130, 2006.

CUIRIS-PÉREZ H.; GUILLÉN-ANDRADE, H.; PEDRAZA-SANTOS, M.E.; LÓPEZ-MEDINA, J.; VIDALES-FERNÁNDEZ, I. Genetic variability with in Mexican race avocado (*Persea Americana* Mill.) germoplasm collections determined by ISSRs. **Revista Chapingo Serie Horticultura**, Texcoco, v.15, n.2, p.169-175, 2009.

DAHAN, Y.; SABAG, M.; ROSENFELD, R.; IRIHIMOVITCH, V. Cloning of distinct cell-proliferation-related genes from avocado and molecular characterization of their expression, as related to small and normal 'Hass' fruit phenotype development. In: WORLD AVOCADO CONGRESS, 7., 2011, Cairo. **Actas...** p.8.

DIXON, D.P.; EDWARDS, R. Glutathione transferases. In: DIXON, D.P.; EDWARDS, R. **The Arabidopsis book**. Washington: The American Society of Plant Biologists, 2010. Disponible em: <<http://doi.org/urn:doi:e0131.10.1199/tab.0131>>. Acesso em: 31 jul. 2010.

- GARCÍA, M., M.A.; MARTÍNEZ, A., G.C.G.; GUTIÉRREZ, D., A.; AGUIRRE, A., V.E. Efecto de la modulación de los genes de *Quorum sensing* de *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina por extracto de las hojas de aguacate de raza mexicana (*Persea americana* var. *drymifolia*). In: MORAS, R. (Ed.). **Compendio Investigativo de Academia Journals**. Celaya: PDHTech, 2016. v.7, p.2064-2060.
- GIERTH, M.; MÄSER, P. Potassium transporters in plants – involvement in K⁺ acquisition, redistribution and homeostasis. **FEBS Letters**, New York, .v.581, n.19, p.2348-2356, 2007.
- GUTIÉRREZ-DÍEZ A.; MARTÍNEZ-DE LA CRUZ, J.; GARCÍA-ZAMBRANO, E.A.; IRACHETA-DONJUAN, L.; OCAMPO-MORALES, J.D.; CERDA-HURTADO, I.M. Estudio de diversidad genética del aguacate nativo en Nuevo León, México. **Revista Fitotecnia Mexicana**, Texcoco, v.32, n.1, p.9-18, 2009.
- GUTIÉRREZ-DÍEZ, A.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, E.I.; TORRES-CASTILLO, J.A.; CERDA-HURTADO, I.V.; OJEDA-ZACARÍAS, M.C. Genetic diversity of mexican avocado in Nuevo Leon, Mexico. In: CALISKAN, M.; OZ, G.C.; KAVAKLI, H.; OZCAN, B. (Ed.). **Molecular approaches to genetic diversity**. Croatia: InTech, 2015. p.141-159.
- IBARRA-LACLETTE, E.; MÉNDEZ-BRAVO, A.; PÉREZ-TORRES, C.A.; ALBERT, V.A.; MOCKAITIS, K.; LÓPEZ-GÓMEZ, R.; CERVANTES-LUEVANO, J.I.; HERRERA-ESTRELLA, L. Deep sequencing of the Mexican avocado transcriptome, an ancient angiosperm with a high content of fatty acids. **Genomics**, New York, v.16, p.599, 2015. Disponível em: <<http://doi.org/urn:doi:10.1186/s12864-015-1775-y>>. Acesso em: 5 jan. 2015.
- LANDI, M.; TATTINI, M.; GOULD, K.S. Multiple functional roles of anthocyanins in plant-environment interactions. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, n.119, p.4-17, 2015.
- LASSNER, M.; VAN E, A. **Plant sterol acyl transferases**. Patent US7,157,619 B1, 2007.
- LÓPEZ-GÓMEZ, R.; TORRES-CÁRDENAS, Y.; CHÁVEZ-MOCTEZUMA, M.; SALGADO-GARCIGLIA, R.; JIMÉNEZ-MORAILA, B.; CORONA-ARMENTA, G.; HERRERA-ESTRELLA, L. Genómica del fruto de aguacate criollo (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*). In: CONGRESO MUNDIAL DEL AGUACATE, 6., 2007, Chile. **Actas...** p.10.
- MARRS, K.A. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.47, p.127-158, 1996.
- MOTAMAYOR, J.C.; MOCKAITIS, K.; SCHMUTZ, J.; HAIMINEN, N.; LIVINSTONE III, D.; CORNEJO, O.; FINDLEY, S.; ZHENG, P.; UTRO, F.; ROYAERT, S.; SASKI, C.; JENKINS, J.; PODICHETI, R.; ZHAO, M.; SCHEFFLER, B.E.; STACK, J.C.; FELTUS, F.A.; MUSTIGA, G.M.; AMORES, F.; PHILLIPS, W.; MARELLI, J.P.; MAY, G.D.; SHAPIRO, H.; M.A, J.; BUSTAMANTE, C.D.; SCHNELL, R.J.; MAIN, D.; PARIDA, L.; KUHN, D.N. The genome of the most widely cultivated cacao type and its use to identify candidate genes regulating pod color. **Genome Biology**, London, v.14, p.53, 2013. Disponível em: <<http://doi.org/urn:doi:10.1186/gb-2013-14-6-r53>>. Acesso em: 8 jul. 2016.
- NURUZZAMAN, M.; ZHANG, R.; CAO, H-Z. AND LUO, Z-Y. Plant pleiotropic drug resistance transporters: transport mechanism, gene expression, and function. **Journal of Integrative Plant Biology**, Oxford, v.56, n.8, p.729-740, 2014.
- PEELMAN, F.; VINAIMONT, N.; VERHEE, A.; VANLOO, B.; VERSCHELDE, J-L.; LABEUR, C.; SEGURET-MACE, S.; DUVERGER, N.; HUTCHINSON, G.; VANDERKERCKHOVE, J.; TAVERNIER, J.; ROSSENEU, M. A proposed architecture for lecithin cholesterol acyl transferase (LCAT): identification of the catalytic triad and molecular modeling. **Protein Science**, Cambridge, v.7, p.587-599, 1998.
- PLIEGO-ALFARO, F.; BARCELÓ-MUÑOZ, A.; LÓPEZ-GÓMEZ, R.; IBARRA-LACLETTE, E.; HERRERA-ESTRELLA, L.; PALOMO-RÍOS, E.; MERCADO, J.A.; LITZ, R.E. Biotechnology. In: SCHAFFER, B.; WOLSTENHOLME, N.; WHILEY, A.W. (Ed.). **The avocado: botany, production and uses**. 2nd ed. Wallingford: CAB International, 2013. p.268-300.
- RINCÓN-HERNÁNDEZ, C.A.; SÁNCHEZ-PÉREZ, J. DE LA L.; ESPINOSA-GARCÍA, F.J. Caracterización química foliar de los árboles de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*) en los bancos de germoplasma de Michoacán, México. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, Ciudad de Mexico, v.8, p.395-41, 2011.

- TORRES-GURROLA, G.; MONTES-HERNÁNDEZ, S.; ESPINOSA-GARCÍA, F.J. Patrones de variación y distribución geográfica de fenotipos químicos foliares de *Persea americana* var. *drymifolia*. **Revista Fitotecnia Mexicana**, Texcoco, v.32, n.1, p.19-30, 2009.
- WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant Physiology**, Lancaster, v.126, p.485-493, 2001.
- YOON, K.; HAN, D.; LI, Y.; SOMMERFELD, M.; HU, Q. Phospholipid: diacyl glycerol acyl transferase is a multifunctional enzyme involved in membrane lipid turn over and degradation while synthesizing triacyl glycerol in the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. **The Plant Cell**, Rockville, v.24, p.3708-3724, 2012.
- ZAMBONI, A.; PIERANTONI, L.; DE FRANCESCHI, P. Total RNA extraction from strawberry tree (*Arbutus unedo*) and several other woody-plants. **iForest – Biogeosciences and Forestry**, Potenza, v.1, p.122-125, 2008.