

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UN FRAGMENTO  
DE GEN QUE CODIFICA UNA POLIFENOL OXIDASA EN LULO  
(*Solanum quitoense* Lam.) ACCESIÓN ILS-388**

**MAURICIO ANTONIO PULIDO JIMÉNEZ**

**REQUISITO PRESENTADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE MAESTRÍA EN  
CIENCIAS BIOLÓGICAS CON ÉNFASIS EN BIOTECNOLOGÍA VEGETAL**

**DIRECTOR: VÍCTOR MANUEL NÚÑEZ ZARANTES, Ph.D.**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Bogotá, D.C., Colombia**

**2009**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

**Artículo 23 de la resolución No. 13 de julio de 1946:**

**“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará por que no se publique nada contrario a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.**

## TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Origen, distribución y hábitat del lulo	4
2.2. Descripción botánica	5
2.3. Filogenia de la sección <i>Lasiocarpa</i>	6
2.4. Características estructurales de las polifenol oxidasas (PPO)	7
2.5. Actividad catalítica de las PPO	12
2.6. Ensayos para la detección de PPO	14
2.7. Genes que codifican PPO	15
2.8. Clonación de genes PPO	17
2.9. Expresión de genes PPO	18
2.10. Localización celular de las PPO	19
2.11. Localización de las PPO en los tejidos	21
2.12. Inactivación de la expresión de PPO mediante silenciamiento de genes	22
2.13. PPO y resistencia a patógenos	24
2.14. Pardeamiento enzimático y su relación con agroindustria	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1. Material vegetal	28
3.2. Extracción y purificación de DNAs genómicos	28
3.2.1. DNA de lulo y papa	28
3.2.2. DNA de <i>E. coli</i>	28
3.3. Evaluación de la integridad y cuantificación de los DNAs genómicos	29
3.4. Diseño de iniciadores para PCR	29
3.5. Amplificación por PCR de los fragmentos 1 y 2 del candidato a gen <i>ppo</i> de lulo	30
3.6. Purificación de los fragmentos 1 y 2	30
3.7. Secuenciación de los fragmentos 1 y 2	30
3.8. Determinación de secuencias consenso para los fragmentos 1 y 2 y obtención de la secuencia parcial del candidato a gen <i>ppo</i> de lulo	31
3.9. Análisis de hibridación Southern	31
3.9.1. Digestión de los DNAs genómicos	31
3.9.2. Transferencia <i>Southern</i>	32
3.9.3. Generación de una sonda para el análisis <i>Southern</i>	32
3.9.4. Marcaje del fragmento de 920 pb con Biotina	33
3.9.5. Determinación de la actividad específica relativa de la sonda biotinilada	33
3.9.6. Hibridación <i>Southern</i>	33

3.10.	Análisis de la secuencia determinada en lulo	34
3.10.1.	Similitud de la secuencia nucleotídica de lulo con genes <i>ppo</i> de otras especies	34
3.10.2.	Mapas de restricción para los genes <i>ppo</i>	34
3.10.3.	Identificación de marcos de lectura abiertos	34
3.10.4.	Similitud de la proteína hipotética deducida del gen <i>ppo</i> de lulo con proteínas PPO de otras especies	35
3.10.5.	Análisis de relación filogenética de la proteína PPO hipotética de lulo con otras PPO	35
3.10.6.	Identificación de dominios conservados en la proteína hipotética de lulo	35
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
4.1.	Iniciadores para PCR	36
4.2.	Amplificación por PCR de los fragmentos 1 y 2 del candidato a gen <i>ppo</i> de lulo	41
4.3.	Análisis de la secuencia del candidato a gen <i>ppo</i> de lulo	44
4.4.	Análisis de hibridación <i>Southern</i>	45
4.5.	Análisis de conservación de sitios de restricción en genes <i>ppo</i>	54
4.6.	Análisis de la proteína PPO deducida a partir del candidato a gen <i>ppo</i> de lulo	56
4.7.	Conservación del dominio funcional de las Tirosinasas en la PPO hipotética de lulo	62
4.8.	Análisis filogenético de la PPO hipotética deducida de la secuencia identificada en lulo	70
5.	CONCLUSIONES	73
6.	RECOMENDACIONES	75
7.	BIBLIOGRAFÍA	76
8.	ANEXOS	86
	Anexo 1. Protocolo para la extracción y purificación de DNA genómico de lulo y papa	86
	Anexo 2. Protocolo para la extracción y purificación de DNA genómico de <i>E. coli</i>	88
	Anexo 3. Protocolo para el marcaje de sondas con Biotina	89
	Anexo 4. Protocolo para la determinación de la actividad específica relativa de sondas biotiniladas	90
	Anexo 5. Protocolo para la detección de sondas biotiniladas hibridadas con DNA genómico de lulo	92

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura tridimensional de la PPO de batata	8
Figura 2.	Ubicación de los iniciadores diseñados para amplificar los fragmentos 1 y 2 del gen <i>ppo</i> de lulo	37
Figura 3.	Alineamiento de secuencias de los genes <i>ppo</i> de diversas especies para el diseño de los iniciadores utilizados en la amplificación del fragmento 1	38
Figura 4.	Alineamiento de secuencias de los genes <i>ppo</i> de diversas especies para el diseño de los iniciadores utilizados en la amplificación del fragmento 2	39
Figura 5.	Amplificación por PCR del fragmento 1 con los iniciadores SupPPO-F y SupPPO-L a partir de DNA genómico	42
Figura 6.	Amplificación por PCR del fragmento 2 con los iniciadores InfPPO-F y PPO-Rv a partir de DNA genómico	43
Figura 7.	Secuencia de nucleótidos correspondiente al candidato a gen <i>ppo</i> identificado en lulo (1430 pb)	45
Figura 8.	Producto de PCR utilizado como sonda para el análisis <i>Southern</i> del genoma de lulo	50
Figura 9.	Análisis de hibridación <i>Southern</i>	52
Figura 10.	Mapas de restricción de los genes <i>ppo</i>	57 - 59
Figura 11.	Secuencia de aminoácidos deducida del fragmento de 1430 pb identificado en lulo (474 a.a)	60
Figura 12.	Localización del dominio funcional de las tirosinasas en la PPO hipotética de lulo	63
Figura 13.	Conservación de las histidinas involucradas en la coordinación con los átomos de cobre A y B de la PPO hipotética de lulo	65
Figura 14.	Conservación de aminoácidos en la periferia del sitio activo de la PPO hipotética de lulo	66

Figura 15. Relación filogenética entre las PPO de diversas especies  
vegetales

71

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Características de los iniciadores diseñados para la amplificación de fragmentos de un candidato a gen <i>ppo</i> en lulo.	37
Tabla 2.	Sitios de anillaje sobre genes <i>ppo</i> de solanáceas y tamaño de los productos de PCR que permitirían generar los iniciadores diseñados para este estudio.	40
Tabla 3.	Condiciones de reacción utilizadas en la amplificación por PCR del fragmento 1 del candidato a gen <i>ppo</i> de lulo	42
Tabla 4.	Programa de ciclaje utilizado para la amplificación por PCR del fragmento 1 del candidato a gen <i>ppo</i> de lulo	43
Tabla 5.	Condiciones de reacción utilizadas en la amplificación por PCR del fragmento 2 del candidato a gen <i>ppo</i> de lulo	44
Tabla 6.	Programa de ciclaje utilizado en la amplificación por PCR del fragmento 2 del candidato a gen <i>ppo</i> de lulo	44
Tabla 7.	Contenido de nucleótidos y porcentaje de guaninas y citosinas (%GC) en genes <i>ppo</i> de algunas especies	47
Tabla 8.	Niveles de similitud entre la secuencia nucleotídica identificada en lulo y los genes <i>ppo</i> de otras especies	48
Tabla 9.	Condiciones de reacción utilizadas para la amplificación por PCR del fragmento de 920 pb utilizado como sonda en el análisis de hibridación <i>Southern</i> del genoma de lulo	51
Tabla 10.	Programa de ciclaje utilizado para la amplificación por PCR del fragmento de 920 pb utilizado como sonda en el análisis de hibridación <i>Southern</i> del genoma de lulo	51
Tabla 11.	Concentración de sales, temperatura y tiempo empleados en los lavados poshibridación del análisis <i>Southern</i>	52
Tabla 12.	Enzimas de restricción que cortan a los genes <i>ppo</i> analizados	52
Tabla 13.	Marcos de lectura identificados en la secuencia de lulo de 1430 pares de bases	60

Tabla 14. Valores de identidad de la proteína hipotética deducida del fragmento identificado en lulo respecto a las PPO de otras especies vegetales

61

## RESUMEN

Se presenta el aislamiento y caracterización molecular de un fragmento de DNA genómico de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) junto con evidencias que permiten postularlo como candidato a gen de polifenol oxidasa (*ppo*). Se diseñaron dos parejas de oligonucleótidos específicos que permitieron amplificar mediante PCR dos fragmentos de 950 y 920 pb correspondientes a las regiones 5' y 3' del gen; los productos de PCR fueron secuenciados y ensamblados para obtener una secuencia final de 1430 pb que presentó valores de identidad entre 80 y 83% con los genes *ppo* de papa, tomate y tabaco y un contenido de guaninas-citosinas del 43.5% que está dentro de los rangos determinados para los mismos. De otro lado, un fragmento de DNA de papa utilizado como sonda en el análisis Southern del genoma de lulo produjo una señal de hibridación positiva única de alto peso molecular (12 kb) que si bien confirma la presencia de genes *ppo* en el genoma de lulo, no permite confirmar ni descartar la posibilidad de que existan varias copias de genes *ppo* en esta especie. La proteína hipotética deducida de la secuencia nucleotídica identificada presentó valores de identidad entre 80 y 83% con las PPO de tomate, papa y tabaco e incluye el dominio funcional característico de las tirosinasas, familia de proteínas que incluye a las PPO de las plantas. El alineamiento de las PPO de solanáceas y otras especies con la proteína hipotética de lulo señaló que el sitio de unión a cobre A estaría ubicado entre la histidina 100 y el triptófano 136 y que es muy parecido al observado en las PPO E y F de tomate y A y B de papa; el sitio de unión a cobre B estaría localizado entre la histidina 231 y el aspartato 284 y es muy semejante al observado en las proteínas antes mencionadas. El análisis filogenético realizado con las PPO ya reportadas y la proteína hipotética de lulo ubicó a esta última en el mismo grupo en el que se encuentran las pertenecientes a las solanáceas anteriormente referidas, muy cerca de las PPO E y F de tomate, A y B de papa y PPO de tabaco. Este

candidato a gen *ppo* de lulo podría ser útil para estudios de silenciamiento de la expresión de PPO empleando la técnica de RNA antisentido.

## 1. INTRODUCCIÓN

El lulo (*Solanum quitoense* Lam.), perteneciente a la familia Solanaceae (así como la papa, el tomate y el tabaco) es una especie frutal originaria de los Andes de Colombia, Perú y Ecuador (Heiser, 1985), la cual ha sido considerada como promisoría para la explotación agrícola e industrial por más de 80 años. Según M. Lobo (comunicación personal, 15 de mayo, 2009), en Colombia la productividad del lulo alcanza niveles que están por debajo del rendimiento potencial debido a la baja oferta tecnológica disponible para esta especie y a que los esfuerzos de investigación y fomento se han canalizado a cultivos tradicionales relacionados con la seguridad alimentaria, la industria y la generación de divisas.

Se estima que en Colombia la superficie sembrada con lulo en 2003 ascendió a 5.750 hectáreas, con una producción anual de 47.236 toneladas (CCI, 2006). Aunque la especie tiene un gran mercado y amplia aceptación en el país, para suplir la demanda nacional se precisa importar de Ecuador aproximadamente el 25% del volumen consumido por año, lo que equivale a la producción de alrededor de 1000 hectáreas (Torres, 2002). De otro lado, la comercialización de aproximadamente el 50% de la producción nacional se ve considerablemente limitada debido a los daños ocasionados por un fenómeno cuyas características son muy similares a las del pardeamiento enzimático (Arias, *et al.*, 2006).

El pardeamiento enzimático es el principal causante del deterioro del color de la corteza y la pulpa en la gran mayoría de frutas y verduras de importancia agrícola y económica, hecho que limita de manera significativa la posibilidad de comercialización del producto, ya sea para el consumo en fresco o para el procesamiento industrial (McEvily, *et al.*, 1992). Este fenómeno es provocado por la acción de una familia de enzimas denominadas polifenol oxidasas (PPO), las cuales están

confinadas dentro de los plastidios de las células vegetales y se liberan al citoplasma una vez que se ha producido daño en la estructura celular de los tejidos como consecuencia del impacto mecánico ocasionado durante la recolección de la cosecha y la manipulación poscosecha de los frutos (Vaughn y Duke, 1981; Vaughn, *et al.*, 1988).

El método más ampliamente utilizado para controlar el pardeamiento enzimático en los productos alimenticios procesados es la adición de agentes químicos antioxidantes tales como los sulfitos (Martínez y Whitaker, 1995). Sin embargo, estudios efectuados por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) han demostrado que dichas sustancias representan un riesgo para la salud humana (Timbo, *et al.*, 2004). Por tal razón, la búsqueda de alternativas de naturaleza biotecnológica a éste problema ha cobrado gran importancia a nivel mundial. Para implementar una de tales opciones, conocida como silenciamiento de genes mediante RNA antisentido, se requiere aislar un gen o parte de un gen *ppo*.

En todas las especies vegetales económicamente importantes en las que se observa este fenómeno se han encontrado genes que codifican para PPO (Newman, *et al.*, 1993; Thygesen, *et al.*, 1995; Goldman, *et al.*, 1998). Se presume que la alteración anteriormente referida en lulo es pardeamiento enzimático. Sin embargo, hasta la fecha no se conocen estudios bioquímicos que demuestren la presencia de polifenol oxidasas en lulo y tampoco hay reportes de la existencia de genes *ppo* en la especie.

El objetivo principal que motivó la realización de este trabajo fue aislar y caracterizar desde el punto de vista molecular un gen responsable de la expresión de una polifenol oxidasas en lulo (*Solanum quitoense* Lam., accesión ILS 388). Para lograr tal fin, los objetivos específicos que se plantearon fueron:

(i) Diseñar oligonucleótidos que permitieran amplificar mediante PCR un gen *ppo* de lulo. (ii) Amplificar mediante PCR un gen *ppo* de lulo. (iii) Determinar la secuencia de nucleótidos del gen aislado. (iv) Establecer el grado de similitud del gen identificado en lulo con los genes *ppo* de otras especies. (v) Establecer el grado de similitud de la proteína deducida del gen aislado con las PPO previamente reportadas. (vi) Determinar el nivel de relación filogenética de la proteína deducida con otras PPO conocidas.

En esta investigación se aisló y caracterizó desde el punto de vista molecular un fragmento de DNA genómico de lulo de 1430 pb que mostró valores de identidad que oscilan entre 80 y 83% con genes *ppo* de papa, tomate y tabaco. De otro lado, un fragmento de DNA de papa utilizado como sonda en el análisis Southern del genoma de lulo produjo una señal de hibridación positiva única de alto peso molecular (12 kb) que si bien confirma la presencia de genes *ppo* en el genoma de lulo, no permite confirmar ni descartar la posibilidad de que existan varias copias de genes *ppo* en esta especie. La proteína hipotética deducida de la secuencia de DNA identificada presentó valores de identidad entre 80 y 83% con las PPO de las solanáceas e incluyó el dominio funcional característico de las tirosinasas, familia de proteínas dentro de la cual se encuentran las PPO de las plantas. Finalmente, el análisis filogenético realizado ubicó a la proteína hipotética de lulo en el mismo grupo en el que se encuentran las pertenecientes a las solanáceas anteriormente referidas. Las evidencias que se presentan en este trabajo permiten postular al fragmento de 1430 pb aquí descrito como candidato a gen *ppo* de lulo, el cual podría ser de gran utilidad en los estudios de silenciamiento de la expresión de proteínas PPO que emplean la técnica de RNA antisentido.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Origen, distribución y hábitat del lulo

El lulo o naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) es una especie frutal andina perteneciente a la familia Solanaceae, cuyo centro primario de diversidad y variabilidad genéticas comprende el área de Colombia, Ecuador y Perú. El taxón corresponde a la sección Lasiocarpa, la cual comprende 13 especies de las cuales 8 se encuentran en Colombia, lo que indica que en nuestro país se encuentra la mayor diversidad a nivel de número de taxa (Heiser, 1985). Cultivada a alturas entre 700 y 2000 metros sobre el nivel de mar (m.s.n.m), la especie se encuentra distribuida desde Chile hasta México (Miranda, *et al.*, 1999). En Colombia se cultiva en el rango altitudinal comprendido entre 1600 y 2400 m.s.n.m. (Galvis y Herrera, 1999) en los departamentos de Nariño, Huila, Quindío, Valle, Cauca, Risaralda, Caldas, Santander, Antioquia, Caquetá y Tolima (Gómez, *et al.*, 1999).

El lulo crece en forma espontánea en el área andina, situándose especialmente en condiciones de sotobosque (lugares frescos y sombreados) cercanos a corrientes de agua. La planta presenta hojas de gran tamaño, con ángulos de inserción obtusos o agudos para captar la luz que pasa a través del bosque. Bajo este conjunto de condiciones florece y fructifica en forma casi continua y presenta períodos productivos prolongados. A partir de plantas que crecen espontáneamente, el hombre toma los materiales para siembra tanto a plena exposición solar como bajo sombrío. Según M. Lobo (comunicación personal, 15 de mayo, 2009), en el primer caso, las plantas florecen y fructifican abundantemente, acelerándose los procesos fotosintéticos de esta especie que como se anotó, es de sotobosque. Como consecuencia, se reduce el período productivo, permaneciendo en fructificación alrededor de 12 meses. Luego de este tiempo, el lulo es atacado por diferentes

enfermedades y plagas, aspecto que se menciona frecuentemente en la literatura como limitante para el desarrollo de la especie como realidad productiva. En el segundo caso, los agricultores talan parcialmente el bosque para sembrar lulo, brindándole al cultivo poca atención. Una vez que éste disminuye su producción o es atacado por enfermedades, el cultivo es abandonado.

## **2.2. Descripción botánica**

El lulo es considerado una especie semisilvestre no domesticada por presentar algunas características como: frutos con gran cantidad de semillas para asegurar su supervivencia, dormancia en las semillas, antocianinas, tricomas en los frutos y una bioarquitectura adecuada para captar mayor radiación solar. El lulo presenta una raíz pivotante, fibrosa y superficial. El tallo es semileñoso, robusto, cilíndrico, verde y succulento, que puede crecer erecto o ramificado desde la base y presenta o no, espinas, dependiendo de la variedad. Las ramas presentan una distribución radial; las hojas son palmeadas, alternas y forman un ángulo de inserción hacia abajo, de color verde intenso por el haz y verde claro por el envés.

Las flores son hermafroditas, agrupadas en inflorescencias cima escarpioide tipo drepanio. La flor es pentámera, perfecta; en una misma inflorescencia se encuentran 3 tipos de flores, de estilo largo, estilo medio y estilo corto. El ovario es súpero, bilocular, pubescente y de color amarillo. El número promedio de flores por inflorescencia es de 5 a 10. Las inflorescencias se encuentran adheridas a las axilas de las ramas y en el tallo (Zuluaga, 1994). El fruto es una baya globosa cubierta de tricomas de color amarillo o rojo que se van perdiendo cuando el fruto inicia su madurez. La corteza es de color amarillo intenso o anaranjado cuando alcanza la madurez. La pulpa es translúcida, jugosa y llena de semillas. Las semillas son pequeñas, con forma de lenteja, de color

amarillo pálido o crema; se encuentran un promedio de 1000 semillas por fruto con un peso aproximado de 22 gramos. La temperatura óptima de germinación se encuentra entre 21 y 26 °C (Zuluaga, 1994).

### **2.3. Filogenia de la sección Lasiocarpa**

Con el propósito de identificar el progenitor del lulo, desde hace tres décadas se han realizado trabajos de sistemática, taxonomía numérica y cladística. Los estudios de taxonomía numérica en los que se han utilizado 43 caracteres (Heiser, 1972) y más tarde 20 caracteres en un análisis numérico más sofisticado (Whalen y Caruso, 1983), mostraron una considerable coincidencia e indicaron que *S. candidum* (Lindl.) es la especie más cercana a *S. quitoense* (Lam.). El primer trabajo de cladística para la sección Lasiocarpa señaló a *S. candidum* (Lindl.) como especie ancestral de *S. quitoense* (Lam.) (Whalen, *et al.*, 1981).

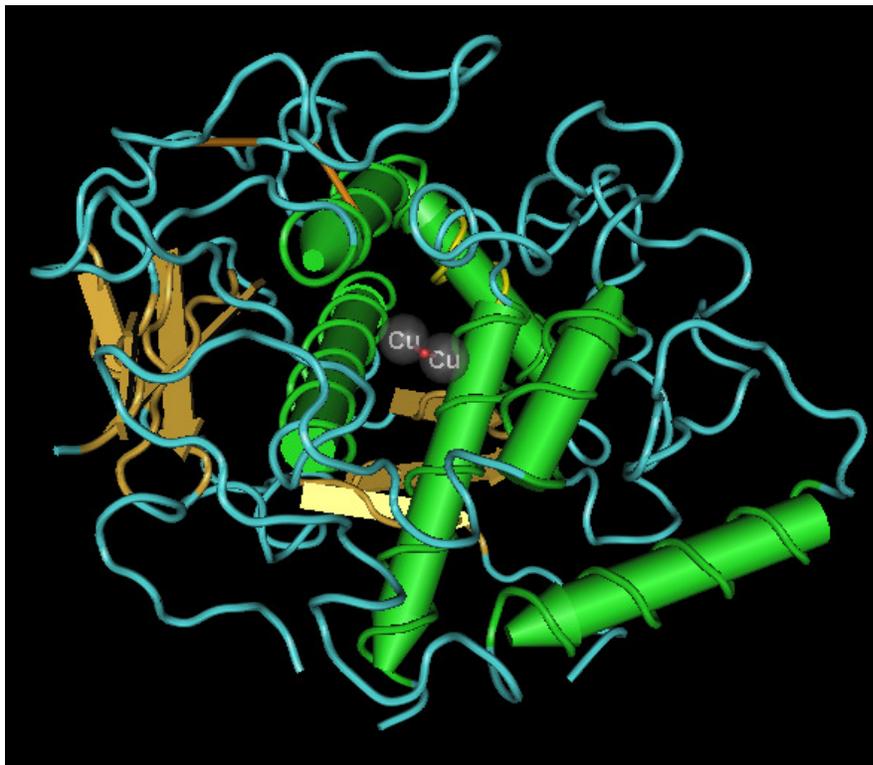
Puesto que todas las especies analizadas son diploides, se han intentado cruces en todas las posibles combinaciones. Los resultados muestran algún acuerdo entre la habilidad de las especies para cruzarse. Hay híbridos entre *S. quitoense* (Lam.) y *S. sessiliflorum* (Dunal). Los híbridos entre *S. quitoense* (Lam.) y *S. vestissimum* (Dunal) se han asegurado mediante cultivo de embriones. Los híbridos entre *S. quitoense* (Lam.) y *S. candidum* (Lindl.) son difíciles de obtener, en cambio los correspondientes al cruce *S. quitoense* (Lam.) con *S. hirtum* (Vahl) son fácilmente asegurados. Además, los híbridos F1 muestran una fertilidad más alta que la de cualquiera de los otros híbridos. En cruces entre *S. hyporhodium* (A. Braun & Bouche) y *S. quitoense* (Lam.) los frutos son asegurados con la primera como madre, pero las semillas son vacías. En el caso *S. quitoense* (Lam.) x *S. stramonifolium* (Jacq.) los frutos se desarrollan con *S. quitoense* (Lam.) como madre, pero no maduran (Heiser, 1985).

Basándose en su morfología, *S. candidum* (Lindl.) es claramente el más cercano pariente del lulo (Heiser, 1985). Sin embargo, el hecho de que este no se cruce con lulo fácilmente y que el híbrido muestre fertilidad reducida debilita la hipótesis de que éste sea el progenitor directo. Además, hay algunas diferencias morfológicas que son bastante difíciles de explicar si este fuera el progenitor. Desde luego, *S. candidum* (Lindl.) es mucho más diferente de lulo de lo que la variedad silvestre de *S. sessiliflorum* (Dunal) es de la variedad domesticada. Con base en los resultados de los cruces se puede sugerir a *S. hirtum* (Vahl) como progenitor, excepto que aquí las diferencias morfológicas son tan grandes que tal relación parece insostenible. Si como suponen algunos investigadores, el lulo es una especie recientemente domesticada, podría esperarse que sus progenitores estén aún con nosotros. Heiser (1985) propone a Colombia como centro de origen de la especie.

#### **2.4. Características estructurales de las polifenol oxidasas (PPO)**

Las polifenol oxidasas (también llamadas catecol oxidasas u ortodifenol oxidasas) son metaloenzimas monoméricas ubicuas en las plantas, que poseen dos sitios catalíticos a los cuales se unen una amplia gama de sustratos fenólicos y en los que se hallan acoplados dos átomos de cobre. Las PPO hacen parte de un grupo de proteínas portadoras de cobre que comparten estructuras geométricas y electrónicas comunes, en el que se encuentran la hemocianina, proteína de almacenamiento y transporte de oxígeno en artrópodos y moluscos, y la tirosinasa, enzima que cataliza la ortohidroxilación de tirosina para generar D-L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-Dopa) (Lerch, 1983). La catecol oxidasa de la batata (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), especie filogenéticamente cercana a las solanáceas, se ha convertido en modelo para las investigaciones de estructura y función de este tipo de enzimas por ser una de las moléculas más estudiadas. Ésta presenta forma elipsoidal y unas dimensiones de 55x45x45 Å (PDB ID: 1bt3). La estructura secundaria es primariamente

$\alpha$ -helicoidal con un núcleo constituido por un haz de cuatro hélices ( $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_6$ , y  $\alpha_7$ ). Este haz helicoidal aloja al centro catalítico de cobre dinuclear y está rodeado por las hélices  $\alpha_1$  y  $\alpha_4$  y varias hojas  $\beta$  cortas. La presencia de dos puentes disulfuro (Cys11-Cys28 y Cys27-Cys89) ayuda a anclar la región N-terminal rica en horquillas de la proteína (constituida por los residuos 1 al 50) a la hélice  $\alpha_2$  (Klabunde, *et al.*, 1998).



**Figura 1. Estructura tridimensional de la PPO de batata (*Ipomoea batatas*).** Los cordones de color azul representan las regiones con estructura de hélice alfa y las flechas de color café las regiones con estructura de hoja plegada beta. Hacia el centro de la proteína se observan los dos átomos de cobre que hacen parte de su sitio activo.

A lo largo de la evolución sólo las estructuras con una función biológica esencial han sido notablemente conservadas. La comparación de secuencias y la imposibilidad de que los sitios de cobre dinuclear (como los existentes en las tirosinasas, hemocianinas y fenoloxidasas) se hubieran formado repentinamente sugieren que las metaloproteínas ancestrales probablemente tuvieron una estructura que permitía la unión de un solo átomo de cobre (Jaenicke y Decker, 2004).

En la catecol oxidasa de batata cada uno de los dos sitios de cobre está delimitado por tres residuos de histidina presentes en las cuatro hélices del haz. El sitio de cobre A está delimitado por His 88, His 109 e His 118. La His 88 está localizada en la mitad de la hélice  $\alpha_2$ , la His 109 y la His 118 están al comienzo y en la mitad de la hélice  $\alpha_3$  respectivamente. El sitio de cobre B está delimitado por His 240, His 244 e His 274. Estos residuos se encuentran en la mitad de las hélices  $\alpha_6$  y  $\alpha_7$ . En el estado oxidado de la proteína, los dos iones cúpricos se encuentran a una distancia de 2.9 Å.

Además de los seis ligandos de histidina, existe una molécula (posiblemente un ión hidróxido) que completa la esfera de coordinación piramidal trigonal para ambos iones metálicos con la His 109 y la His 240, que se hallan en posiciones apicales del poliedro de coordinación para el cobre A y el cobre B respectivamente (Klabunde, *et al.*, 1998). Esta conformación estructural coincide con los datos de estructura fina de absorción de rayos X extendida (EXAFS) para las catecol oxidasas oxidadas de *Lycopus europaeus* (L.) y batata, que ratifican una distancia Cu-Cu de 2.9 Å en ambas enzimas. Tras la reducción de la enzima, la separación metal-metal incrementa significativamente a 4.4 Å, mientras las histidinas se mueven levemente y no se observa cambio conformacional significativo para otros residuos de la proteína (Eicken, *et al.*, 1998).

Una característica interesante del centro de cobre dinuclear en las catecol oxidasas es la presencia de un enlace covalente tioéter formado entre el carbono  $\epsilon$  de la His 109, uno de los ligandos del cobre, y el átomo de azufre de la Cys 92. De manera interesante, una unión tioéter ha sido descrita para la enzima de cobre mononuclear galactosa oxidasa. En este caso, la unión covalente se produce entre el carbono  $\epsilon$  de una tirosina y el átomo de azufre de la cisteína (Ito, *et al.*, 1991). Existen reportes de uniones cisteinil-histidinil en la tirosinasa de *Neurospora crassa* (Shear & B. O. Dodge) (Lerch, 1982) también como en la hemocianina de moluscos (Gielens, *et al.*, 1997; Miller, *et al.*, 1998). La estructura de la unidad funcional de la hemocianina en moluscos también muestra una de las seis histidinas que actúan como ligando involucrada en una unión tioéter (Cuff, *et al.*, 1998). La estructura cristalina de la catecol oxidasa de batata revela que la presencia de esta unión covalente confiere restricciones estructurales adicionales en la región del centro de cobre A. Este estado puede optimizar la estructura electrónica del metal requerido para la oxidación del sustrato difenólico y puede permitir una rápida transferencia de electrones en el proceso redox.

En todas las proteínas de cobre tipo 3 conocidas, la entrada al sitio activo está cubierta por un aminoácido, el cual tiene que ser removido para que se produzca la activación de la enzima. En el caso de la hemocianina de los artrópodos éste aminoácido es una fenilalanina (Phe 49) altamente conservada; en la tirosinasa de *Streptomyces castaneoglobisporus* (Yen) Pridham es una tirosina (Tyr 98) la cual no es proporcionada por la enzima misma sino por una proteína asociada (Matoba, *et al.*, 2006). En las hemocianinas de moluscos y las fenoloxidasas de plantas un aminoácido alifático menos conservado cierra la entrada al sitio activo. Independientemente de su naturaleza química, este aminoácido tiene que ser removido de la entrada para permitir el libre acceso del sustrato (Marusek, *et al.*, 2006; Decker, *et al.*, 2007). En el caso de la catecol oxidasa de batata el centro de cobre dinuclear se

encuentra en el centro de un bolsillo hidrofóbico delimitado por la cadena lateral de Ile 241, Phe 261, His 244, y Ala 264 mientras que el acceso al centro catalítico está controlado por el anillo aromático de la Phe 261, localizada en la horquilla que conecta las hélices  $\alpha_6$  y  $\alpha_7$ .

Las catecol oxidasas y las hemocianinas no muestran una similitud de secuencias significativa y no se parecen en su estructura general, excepto por el sitio catalítico. Basándose en estudios bioquímicos (Solomon, *et al.*, 1996), espectroscópicos (Eicken, *et al.*, 1998) y los datos estructurales existentes, se ha propuesto un mecanismo catalítico en el cual el oxígeno molecular y el sustrato se unen de manera simultánea al sitio catalítico (Klabunde, *et al.*, 1998).

La estructura tridimensional de las PPO y su actividad catalítica están definidas por la existencia de puentes disulfuro que le confieren rasgos característicos. Mediante métodos químicos se ha logrado desnaturalizar y renaturalizar una PPO de manzana purificada y parcialmente proteolisada, con un 88% de actividad recuperada (Mari, *et al.*, 1998). Las condiciones de renaturalización óptimas involucraron diálisis de los extractos (previamente tratados con guanidina 6M) empleando sulfato cúprico y sulfato de amonio, siendo este último esencial para la recuperación de la actividad enzimática.

La estructura terciaria de la PPO renaturalizada resultó mucho más compacta gracias a la presencia de puentes disulfuro; fue resistente a proteólisis adicional mientras que la PPO desnaturalizada fue totalmente digerida, mostrando el papel de la estructura terciaria de la PPO renaturalizada en la resistencia a proteasas. En batata se han aislado dos PPO; las dos isoenzimas poseen un centro de cobre dinuclear y son monómeros con masa molecular de 39 y 40 kDa respectivamente (Eicken, *et al.*, 1998).

## 2.5. Actividad catalítica de las PPO

En las plantas existe una amplia variedad de moléculas polifenólicas que son sustrato para las PPO, entre las que se destacan el ácido clorogénico (el cual es el principal polifenol en manzana madura) y la (-)-epicatequina. Las PPO catalizan exclusivamente las reacciones de oxidación de orto-difenoles a orto-diquinonas (Cary, *et al.*, 1992; Eicken, *et al.*, 1998). Las quinonas altamente reactivas producidas por la acción de las PPO sobre sus sustratos fenólicos espontáneamente se autopolimerizan para formar pigmentos (melaninas) de color café, gris o negro, fenómeno conocido como pardeamiento enzimático, muy común en frutas y verduras y que ha sido propuesto como mecanismo de defensa de la planta contra patógenos e insectos (Dervall, 1961; Mayer, *et al.*, 1979; Vaughn, *et al.*, 1988). Aunque se pensaba que la capacidad para oxidar moléculas de naturaleza fenólica era exclusiva de las fenoloxidasas, actualmente se sabe que en las hemocianinas de moluscos y artrópodos dicha función puede ser activada mediante proteólisis parcial o por alteración de la estructura tridimensional de la proteína como respuesta al tratamiento con sales o dodecil sulfato de sodio (Claus y Decker, 2006). Las PPO provenientes de hongos y plantas pueden también oxidar proteínas y residuos de tirosina unidos a péptidos, generando entrecruzamientos inter e intramoleculares (Selinheimo, *et al.*, 2007).

El análisis de la actividad catalítica de las PPO empleando una serie de buffers a pH y fuerza iónica comunes indica que la actividad de la enzima es mucho mayor en presencia de iones citrato y menor en iones oxalato. La baja actividad en oxalato ha sido atribuida a un efecto quelante del cobre (en estado de oxidación +2) más efectivo por parte del dianión oxalato. En general, las sales de sodio inhiben la enzima y aunque se observan pocas diferencias en la inhibición entre las sales de

sodio y potasio, el grado y tipo de la inhibición es anión-dependiente (Malkin, *et al.*, 2001).

La actividad de la enzima es óptima a  $\text{pH} \approx 4$ , el cual es cercano al  $\text{pH}$  de la pulpa de algunas frutas como la manzana. Sin embargo, a  $\text{pH} = 4$  la enzima es inestable, razón por la cual inmediatamente después de un corte o herida la PPO (por ejemplo la de manzana) es bioquímicamente funcional pero pierde su actividad de manera muy rápida (Murata, *et al.*, 1992). El control de la actividad PPO en manzana se ha investigado mediante el uso de ácido ascórbico a diferentes valores de  $\text{pH}$ , temperatura y tiempo de incubación. La enzima es casi totalmente inactivada a concentraciones de ácido ascórbico entre 1 y 1.5%. Una solución de ácido ascórbico al 1% causa una importante inhibición que está relacionada con el incremento de los valores de acidez hasta  $\text{pH} = 1.0$ . Un tratamiento consistente en el calentamiento de rebanadas de manzana sumergidas en soluciones de ácido ascórbico al 1% causa una reducción significativa del pardeamiento enzimático; la temperatura óptima para la inactivación está en el rango entre 60-70 °C. Incrementando el tiempo de inmersión en ácido ascórbico al 1% y evaluando diferentes valores de  $\text{pH}$ , se logra reducir la actividad fenolasa (el-Shimi, 1993).

Además del ácido ascórbico, existen otras sustancias naturales como la N-acetilcisteína y el glutatión que pueden inhibir la actividad PPO. El tratamiento de rebanadas de manzana recién cortadas con N-acetilcisteína 1% demostró ser útil para mantener su color durante 14 días de almacenamiento, mientras que el uso de ácido ascórbico no fue suficiente para prevenir el deterioro del color desde el primer día de almacenamiento. Los agentes antipardeamiento naturales antes referidos han demostrado ser más efectivos que el ácido ascórbico en el control del pardeamiento enzimático de los productos agroindustriales frescos (Rojas-Graü, *et al.*, 2008). Jeong y colaboradores (2009) identificaron

doce polifenoles aislados de extractos de *Morus ihou* (Ser) Koidz que tienen la propiedad de inhibir a las PPO. Entre los compuestos estudiados hay cuatro flavanonas, cuatro flavonas y cuatro fenilbenzofuranos. Se observó que los compuestos que tenían un grupo resorcinol insustituido fueron inhibidores altamente efectivos de la actividad monofenolasa; la flavona 5 mostró solamente actividad inhibitoria monofenolasa mientras que la flavanona 1 y el fenilbenzofurán 9 inhibieron de manera significativa tanto la actividad monofenolasa como la difenolasa.

## **2.6. Ensayos para la detección de PPO**

Son muchos los métodos empleados para la detección de las PPO; algunos permiten evidenciar la presencia de las PPO a través de la medición de la actividad relativa de la enzima sobre sus substratos (Hutcheson, *et al.*, 1980), otros miden el consumo de oxígeno molecular durante el proceso catalítico propiciado por la enzima (Golbeck y Cammarata, 1981), y otros son de tipo inmunoquímico, los cuales pueden identificar más específicamente a estas enzimas que los ensayos de actividad antes mencionados (Lieberei, *et al.*, 1981). Sin embargo se ha propuesto el uso de un substrato ideal, el 4-hydroxyanisol, para determinar la actividad fenolasa de las PPO en frutas y vegetales (Espin, *et al.*, 1998). El método está basado en la reacción de acoplamiento entre las quinonas producto de la oxidación del 4-hydroxyanisol en presencia de la polifenol oxidasa y el 3-metil-2-benzotiazolinona, para formar un compuesto detectable mediante métodos espectrofotométricos. Este es un método más sensible y preciso que los reportados previamente para la determinación de actividad monofenolasa en PPO. Recientemente Gandía-Herrero y colaboradores (2009) han desarrollado un método basado en la detección de la fluorescencia de los productos derivados de la actividad PPO para hacer un seguimiento del comportamiento enzimático de estas proteínas.

## 2.7. Genes que codifican PPO

Las polifenol oxidasas vegetales son enzimas codificadas por genes nucleares. Las diferencias existentes en la secuencia de nucleótidos de varios clones de cDNA identificados en haba (*Vicia faba* L.) son la evidencia de que los genes que codifican PPO en algunas especies están presentes como familias multigénicas (6 miembros en los casos de papa y trigo, 7 miembros en el caso de tomate y al menos tres en haba) (Thygesen, *et al.*, 1995; Demeke y Morris, 2002; Newman, *et al.*, 1993; Cary, *et al.*, 1992;) mientras en otras se ha identificado un solo gen. En los arrozos asiáticos (*Oryza sativa* L.) de la subespecie *indica* el pardeamiento enzimático es controlado por el gen *phr1*, en el cual las variaciones genéticas que lo inactivaron surgieron tres veces de manera independiente (Yu, *et al.*, 2008).

Los genes que codifican PPO son expresados a nivel de raíz, tallo, hoja, peciolo, flor (órganos reproductivos) y fruto, cada uno exhibiendo patrones de expresión temporal y espacial específicos (Thipyapong, *et al.*, 1997; Goldman, *et al.*, 1998). Los mayores niveles de transcripción de estos genes se dan en estadios tempranos del desarrollo de los órganos de la planta; a medida que ocurre el desarrollo los niveles de transcripción decrecen hasta ser virtualmente indetectables (Hunt, *et al.*, 1993; Dry y Robinson, 1994; Boss, *et al.*, 1995).

Es interesante que en el caso de los tubérculos de papa la expresión de los genes *ppo* y la actividad enzimática de la proteína se mantienen más allá del desarrollo temprano y a lo largo del desarrollo y crecimiento del tubérculo. En tomate, el gen *p2* codifica un polipéptido de 66.3 kDa que se expresa abundantemente en meristemos florales. Este polipéptido se acumula en primordios florales y continúa siendo expresado durante el desarrollo de órganos florales (Shahar, *et al.*, 1992).

En trabajos en los que se han empleado librerías de cDNA de hoja de papa y tomate (Coetzer, *et al.*, 2001; Newman, *et al.*, 1993), se han identificado genes *ppo* que presentan tamaños de aproximadamente 2 kpb. De otro lado, cinco de los siete genes *ppo* en tomate mostraron secuencias divergentes en sus regiones promotoras. Tales variaciones pueden regular la expresión diferencial de estos genes. Consistente con otros reportes sobre la estructura de genes *ppo* en especies de dicotiledóneas (Shahar, *et al.*, 1992; Newman, *et al.*, 1993; Dry y Robinson, 1994), la comparación de los genes *ppo* en papa muestra que estos carecen de intrones. Esto plantea la posibilidad de que los genes *ppo* estuvieran originalmente localizados en los cloroplastos y que en algún momento fueran secuestrados por el núcleo (Thygesen, *et al.*, 1995). A diferencia de lo que ocurre en dicotiledóneas, los resultados de la secuenciación de fragmentos pertenecientes a los genes *tappo-d1* y *tappo-a1* de trigo (*Triticum aestivum* L.) permitieron confirmar que en cada uno de ellos hay dos intrones (Chang, *et al.*, 2007).

Todos los genes *ppo* caracterizados hasta el momento codifican polipéptidos precursores con tamaños entre 66 y 71 kDa; tras el clivaje de un péptido de tránsito localizado sobre el extremo N-terminal que presenta un tamaño promedio de 90 aminoácidos y que se presume participa en la importación de PPO a los plastidios, la proteína madura muestra tamaños de entre 57 y 62 kDa (Cary, *et al.*, 1992). Estos péptidos de tránsito son ricos en Serina, Treonina (aminoácidos hidroxilados), Alanina y Valina (aminoácidos hidrofóbicos) y presentan una carga eléctrica neta positiva, todas estas características propias de este tipo de secuencias (Keegstra, *et al.*, 1989). Las PPO presentan valores de homología muy elevados entre sí; al amplificar mediante PCR fragmentos de 681 pb correspondientes a genes *ppo* de varias especies frutales se observa que las secuencias de aminoácidos deducidas presentan niveles de identidad entre 85.3 y 97.5% (Haruta, *et al.*, 1999). Sin embargo, la mayor conservación de secuencias de PPO dentro y entre especies se da

alrededor de las regiones donde se localizan los residuos de histidina los cuales están involucrados en la unión de los átomos de cobre a la proteína (Thygesen, *et al.*, 1995).

En plantas maduras los niveles de transcritos correspondientes a genes *ppo* se incrementan sistemáticamente en hojas jóvenes cuando las hojas maduras son dañadas. De otro lado, la acumulación de mRNA que codifica PPO en tejidos dañados de plantas de manzana evidencia la existencia de un control génico a nivel transcripcional (Boss, *et al.*, 1995).

## **2.8. Clonación de genes *ppo***

En general, para clonar fragmentos de DNA que codifiquen PPO se han utilizados dos tipos de estrategias. La primera consiste en construir librerías de cDNA. Posteriormente, la secuencia de interés es detectada mediante el uso de una sonda radiomarcada. La segunda consiste en amplificar por PCR directamente de DNA genómico (utilizando una pareja de iniciadores específicos) el fragmento de interés.

Para la caracterización de fragmentos de cDNA que codifican PPO en manzana (Boss, *et al.*, 1995) y en flor de tabaco (Goldman, *et al.*, 1998), a partir de la corteza superficial del fruto (variedad Granny Smith) y de pistilos respectivamente, se extrajo RNA poliadenilado, el cual fue utilizado como molde para generar (mediante transcripción reversa) una colección de fragmentos que permitiera construir una librería de cDNA.

Los fragmentos de cDNA obtenidos de corteza de manzana fueron insertados en el vector UNI-ZAP XR (derivado del bacteriófago  $\lambda$ ), el cual posee extremos libres portadores de extensiones de poli(T), los que en virtud de la complementariedad de bases, aparean con las extensiones de poli (A) de los extremos 3' de cada cadena, que aparecen como resultado de la acción de la DNA Polimerasa. El sistema permite la escisión del

fragmento de interés dentro de plásmidos de regular tamaño, muy apropiados para los procedimientos de secuenciación.

Las secuencias nucleotídicas de los cDNA de genes *ppo* en manzana previamente reportadas fueron empleadas para diseñar parejas de iniciadores con los cuales se logró amplificar por PCR directamente de DNA genómico un par de fragmentos que codifican PPO en manzana japonesa (variedad Fuji). Estos iniciadores fueron diseñados de forma tal que en sus extremos estuvieran incluidas las secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción con el fin de generar extremos cohesivos que facilitaran la inserción del fragmento en el vector seleccionado. Los productos de tales amplificaciones fueron introducidos mediante clonación dirigida en el fagémido pBS (KS-), ampliamente utilizado en biología molecular (Haruta, *et al.*, 1998).

## **2.9. Expresión de genes *ppo***

Aunque varios genes *ppo* de plantas han sido clonados, solamente uno proveniente de manzana ha sido expresado en *E. coli*. El gen *ppo* fue clonado en el plásmido pBS (KS-) y lo expresaron en *E. coli* para compararlo con la PPO aislada de manzana. El clon correspondiente a la proteína precursora (PPO7) y el clon en el que la porción que codifica para el péptido de tránsito había sido removida fueron expresados como productos de fusión sobre la porción C-terminal de Glutación-S-Transferasa (GST). Las proteínas fueron analizadas por Western Blot utilizando un anticuerpo producido contra la principal PPO en manzana madura (Murata, *et al.*, 1993). La masa molecular aparente de las dos proteínas una vez liberadas de GST fue 77 y 66 kDa respectivamente. La proteína madura (66 kDa) mostró el mismo tamaño que la de extractos crudos de fruto maduro o inmaduro. Estos resultados señalan que la movilidad de la PPO de manzana según estudios de electroforesis en

poliacrilamida no corresponde con su masa molecular; ello debido a la estructura tridimensional de la proteína, determinada en buena medida por la existencia de varios puentes disulfuro que le confieren a la molécula un grado de rigidez que precisa una disposición espacial particular (Haruta, *et al.*, 1998).

## **2.10. Localización celular de las PPO**

Los estudios de fraccionamiento celular, inmunohistoquímica y modificación genética o química de plastidios indican que las únicas estructuras con actividad PPO detectable citoquímicamente son reconocidas como partes del plastidio. En células fotosintéticas sanas las PPO existen en forma latente en el lumen de los tilacoides y actúan como fenol oxidasas *in vivo* solamente cuando son liberadas al citoplasma en células dañadas o senescentes (como las presentes en frutos maduros).

Las PPO son sintetizadas en los ribosomas citoplásmicos y después transportadas a través de las membranas del plastidio. Puesto que ninguna actividad PPO es detectada fuera del plastidio, se postula que las PPO son procesadas y activadas después de cruzar la membrana de los mismos (Vaughn y Duke, 1981). Los únicos casos en los que las PPO intervienen en el metabolismo fenólico son aquellos en los cuales los contenidos de plastidio y vacuola interactúan directamente. Estos casos pueden ser divididos en dos categorías: senescencia y lesión. En el primer caso, las PPO han sido señaladas como responsables del desarrollo de pigmentación en la oliva negra y otros tejidos vegetales de color café oscuro o negro, usualmente en estados muy avanzados de maduración o muertos. En el segundo caso, la disrupción de los plastidios causada por daño de las estructuras celulares resulta en la activación de polifenol oxidasas latentes, las cuales reaccionan con los fenoles liberados desde la vacuola.

Las PPO son enzimas relativamente estables y la liberación de la actividad latente puede ocurrir durante largos períodos de tiempo, resultando en producción continuada de quinonas a pesar de las propiedades inhibitorias de los productos finales de la actividad PPO (Vaughn, *et al.*, 1988). Los estudios sobre importación, direccionamiento y procesamiento de la proteína precursora radiomarcada en cloroplastos aislados revelaron que la proteína es transportada al lumen del tilacoide en dos pasos: 1) El precursor de 67 kDa importado al estroma del cloroplasto en forma dependiente de ATP es procesado hasta ser convertido en un intermediario de 62 kDa. 2) El intermediario es translocado hacia el lumen de manera dependiente de luz y procesado hasta generar un polipéptido de tamaño cercano a 59 kD. El polipéptido maduro es soluble en el lumen y no unido a la cara interna de la membrana del tilacoide (Sommer, *et al.*, 1994). Otros mecanismos de direccionamiento diferentes han sido sugeridos pero no hay evidencia de ellos.

Las PPO se hallan en los plastidios de tejidos en desarrollo (Vaughn y Duke, 1984) y en algunos casos su producción se mantiene durante estadios posteriores de desarrollo y crecimiento (como en el caso de tubérculos de papa). Se ha observado que existe alguna correlación entre los niveles de compuestos fenólicos y presencia de PPO así como correlación entre bajos niveles de compuestos fenólicos y bajos niveles (o ausencia) de PPO. Se ha observado que tras el daño producido por impacto mecánico hay redistribución subcelular de PPO, lo que coincide con la pérdida de la integridad de las membranas celulares (Partington, *et al.*, 1999). De otro lado, la generación de heridas es acompañada por la expresión activa del gen y adicionales síntesis de proteína y reparación de tejidos. En manzana madura, donde las vacuolas ocupan la mayor parte del espacio celular, las PPO han sido detectadas inmunquímicamente cerca de las paredes celulares con el uso de anticuerpo anti-PPO de manzana (Murata, *et al.*, 1997).

## 2.11. Localización de las PPO en los tejidos

En papa la actividad PPO es alta en flores en desarrollo, hojas en desarrollo, tubérculos y raíces en desarrollo. De otro lado, los niveles más altos de mRNA de PPO son encontrados en flores en desarrollo, tubérculos en desarrollo y hojas jóvenes. Esto concuerda con estudios previos que indicaron que la expresión de genes *ppo* es más alta en tejidos en desarrollo y regiones meristemáticas y que los niveles de expresión declinan en la medida en que transcurre el desarrollo. Para el caso de papa, los genes *pot32* y *pot33* son expresados predominantemente en tubérculo, siendo *pot32* la principal forma detectada en todas las partes del tubérculo y a lo largo de su desarrollo (también es la principal forma expresada en raíz).

La expresión de *pot33* está confinada a la corteza externa del tubérculo y también a lo largo del desarrollo del mismo, aunque en menor grado que *pot32*. La expresión de *pot72* es apenas detectable en tubérculo y parece ser casi exclusivamente expresado en raíz pero a un nivel más bajo que *pot32*. Se podría considerar que los genes *pot32*, *pot33* y *pot72* son expresados en tejidos no fotosintéticos.

El gen *p1* detectado en hoja de papa mas no en tubérculo muestra una identidad del 95% con *nor333*, un gen expresado en tubérculo (Hunt, *et al.*, 1993). Este último sólo se expresa tempranamente en el desarrollo del tubérculo y de manera específica en la corteza exterior. El gen *nor333* también es fuertemente expresado en hojas muy jóvenes y a medida que la edad de la hoja aumenta, la expresión decrece. La expresión de *nor333* en flores jóvenes es muy elevada frente a la de los demás genes, justificando su descripción como un gen floral más que como gen foliar; *nor333* es fuertemente expresado en brotes de flor pero virtualmente ausente en flores abiertas, lo que resulta consistente con los reportes previos. Dentro de la flor, la expresión más alta se detecta en anteras,

ovario y pétalos; la más baja en sépalos. Esto es consistente con la elevada actividad PPO presente en los tejidos reproductivos (Thygesen, *et al.*, 1995).

## **2.12. Inactivación de la expresión de PPO mediante silenciamiento de genes**

El silenciamiento de genes mediante la técnica de RNA antisentido consiste en insertar en la planta que se pretende modificar un gen de interés, en sentido contrario al que dicho gen presenta normalmente en el genoma del cual proviene. Tras el proceso de transcripción tanto del gen que se halla insertado en el genoma como del gen insertado en el vector plasmídico, se generan moléculas de RNA mensajero que interactúan formando moléculas de mRNA de doble cadena, las cuales generalmente presentan extremos de cadena sencilla que son degradados por las nucleasas de la célula. Esta degradación se produce debido a que la célula vegetal asume que los mRNA de doble cadena son parte del mecanismo de infección empleado por cierto tipo de virus (Baulcombe, 1996).

Algunos trabajos señalan que no existen diferencias estadísticas entre la habilidad de diversos genes *ppo* en orientación sentido o antisentido para suprimir la expresión de PPO en papa, ni tampoco diferencias con respecto al tamaño de la sección del gen *ppo* utilizado para tal fin en los constructos (Bachem, *et al.*, 1994). Sin embargo, algunos estudios sobre la disminución del pardeamiento en plantas de papa (variedad Russet Burbank) que expresan un gen *ppo* de tomate insertado en orientación sentido y antisentido, indican que el primer caso es más efectivo (Coetzer, *et al.*, 2001). De manera contrastante, las líneas transformadas con el gen *ppo* de papa en orientación antisentido produjeron tubérculos que no mostraron el menor grado de disminución

del pardeamiento. Este estudio es el primer reporte de cosupresión de la expresión de PPO en papa por un RNA heterólogo de tomate.

Bachem y colaboradores (1994) transformaron plantas de papa de las variedades Diamant y Van Gogh (que se caracterizan por presentar buenos niveles de resistencia al pardeamiento) con genes *ppo* de papa en orientación antisentido para evaluar si esta aproximación podía incrementar la resistencia al fenómeno antes mencionado. En los vectores para transformación que se construyeron, los genes *ppo* estaban bajo el control de un promotor fuerte como el 35S de CaMV y de promotores que dirigen la expresión directamente al tubérculo, como GBSS y Patatina I. Los vectores utilizados como control de transformación (y a la vez como control negativo respecto al silenciamiento de la expresión de PPO), portaban el gen reportero GUS en lugar de gen *ppo*. En promedio, el 73% de los transformantes antisentido generados en los estudios realizados mostraron actividad enzimática PPO más baja que los controles transformados con GUS. Sin embargo, el pardeamiento producido por la acción de las PPO no fue suprimido totalmente. En brotes de manzana transgénica portadores de un gen *ppo* en orientación antisentido se observó claramente el decrecimiento en la expresión de la PPO endógena y una disminución importante en la actividad enzimática medida a través de la cuantificación de los productos de reacción de PPO y también de la cantidad de sustrato específico residual en el ensayo (Murata, *et al.*, 2000).

Se ha propuesto que la expresión temprana de genes *ppo* endógenos durante la organogénesis, tomada junto con la larga vida media de la PPO, pueden permitir que suficiente enzima sea acumulada durante la formación del tubérculo para dar una alta actividad promedio en las líneas antisentido controladas por promotores fuertes (CaMV y GBSS) en las que se esperaría una ausencia total de pardeamiento enzimático (Coetzer, *et al.*, 2001).

Con el fin de evaluar la función de las PPO en las plantas, se ha utilizado la tecnología del silenciamiento sentido/antisentido para generar dos tipos de plantas transgénicas de tomate: plantas en las que la expresión de PPO ha sido suprimida (gen *ppo* antisentido) y plantas en las que PPO se sobreexpresa (gen *ppo* sentido). Thipyapong y colaboradores (2007) demostraron que las líneas transgénicas A14-6 y A19-3 presentaban actividad PPO reducida entre 2 y 40 veces, mientras que las líneas transgénicas S-18 y S-28 presentaban actividad PPO incrementada entre 2 y 10 veces. La alteración de la actividad PPO no tuvo efecto en el crecimiento y desarrollo de la planta. Los porcentajes de germinación, tasas de crecimiento, área foliar total, peso seco de raíces y brotes y número de semillas por fruto no fueron estadísticamente diferentes entre los dos tipos de plantas modificadas y los controles no transformados. Además, las plantas transformadas presentaron morfología y vigor similares a los controles, lo que significa que bajo condiciones de crecimiento de invernadero, las PPO no juegan un papel determinante en el metabolismo, crecimiento o desarrollo de las plantas.

### **2.13. PPO y resistencia a patógenos**

Los trabajos de Thipyapong y Steffens (1997) han proporcionado evidencia respecto a que la supresión de la expresión de las PPO constitutivas e inducibles mediante el uso de genes introducidos en orientación antisentido resulta en una hipersusceptibilidad a patógenos, lo que sugiere un papel importante de la oxidación fenólica mediada por PPO en los mecanismos de defensa. Sin embargo, la naturaleza y el grado de esta contribución a la resistencia no son muy claros aún. De manera concordante, Li y Steffens (2002) desarrollaron plantas transgénicas de tomate que sobreexpresaban una PPO de papa gracias al uso de un promotor fuerte como el 35S de CaMV. Estas plantas expresaron hasta 30 veces más transcritos de PPO y mostraron incrementos en la actividad PPO entre 5 y 10 veces. La evaluación de la

interacción de algunas de estas líneas transgénicas con el patógeno *Pseudomonas syringae* (van Hall) evidenció un gran incremento en la resistencia al patógeno. Comparadas con los controles, exhibieron menos severidad en los síntomas de la enfermedad, con 15 veces menos lesiones y 100 veces menos crecimiento de la bacteria en las hojas infectadas. Dado que la evidencia experimental demuestra que el silenciamiento antisentido permite obtener plantas transgénicas que manifiestan una reducción en la expresión de PPO (Thipyapong, et al., 2007) pero susceptibles al ataque de patógenos (Thipyapong y Steffens, 1997), M. Lobo (comunicación personal, 15 de mayo, 2009) propone que para desarrollar variedades de un especie que sean resistentes a patógenos y que además muestren bajos niveles de pardeamiento se podrían implementar programas de mejoramiento convencional en los que se utilicen como materiales de partida las líneas transgénicas antes referidas junto con variedades naturalmente resistentes a enfermedades.

#### **2.14. Pardeamiento enzimático y su relación con la agroindustria**

El pardeamiento enzimático es el principal causante del deterioro del color de la pulpa y la corteza en la gran mayoría de frutas y verduras de importancia agrícola y económica, hecho que limita de manera significativa la posibilidad de comercialización del producto, ya sea para el consumo en fresco o para el procesamiento industrial (McEvily, *et al.*, 1992). Además de afectar los productos cosechados, el pardeamiento de productos procesados como jugos y pulpa requiere del uso de diversos aditivos químicos. Aunque el pardeamiento enzimático en papa no se asocia con daño visible del tejido, puede ser la causa de enormes pérdidas en las cosechas durante la clasificación del producto para almacenamiento (en fresco) o para la preparación de productos congelados (Gray y Hughes, 1978).

El método más ampliamente utilizado para controlar el pardeamiento enzimático de los productos alimenticios es la adición de agentes químicos reductores tales como el bisulfito de sodio, compuestos tiólicos (Martínez y Whitaker, 1995), la tropolona y el ácido salicilhidroxámico (Fuerst, *et al.*, 2006). Estas moléculas actúan inhibiendo la actividad de las PPO y reduciendo a sus compuestos difenólicos originales las quinonas que se producen por la acción de la enzima.

Los estudios de Fuerst y colaboradores (2006) revelaron que un nivel substancial de pardeamiento puede ocurrir aún a nivel de actividad PPO igual a cero; por lo tanto, proponen que el pardeamiento en trigo es debido a los niveles de actividad PPO específicos de la variedad analizada y a la presencia de al menos un mecanismo adicional. Sin embargo los estudios efectuados por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) han demostrado que dichas sustancias representan un riesgo para la salud humana (Timbo, *et al.*, 2004). Por tal razón, la búsqueda de alternativas de naturaleza biotecnológica a éste problema ha cobrado gran importancia a nivel mundial.

En lulo (*Solanum quitoense* Lam.) se observa un fenómeno cuyas características son muy similares a las del pardeamiento enzimático estudiado en otras especies vegetales económicamente importantes. Sin embargo, hasta la fecha ningún grupo de investigación nacional o extranjero ha corroborado que dicho fenómeno sea pardeamiento enzimático producido por la acción de polifenol oxidasas ni tampoco ha reportado la presencia de genes *ppo* en la especie. El desconocimiento de la existencia de genes que codifiquen polifenol oxidasas en lulo se constituyó en el principal vacío de conocimiento que se pretendía superar mediante la realización de esta investigación. Para aislar y caracterizar desde el punto de vista molecular al menos un gen que codifique una

polifenol oxidasa en esta especie frutal andina se emplearon aproximaciones experimentales similares a las reportadas en estudios previos realizados con papa, tomate, manzana y otros vegetales.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Material vegetal**

El material vegetal empleado en este estudio se obtuvo de plantas de lulo (*Solanum quitoense* Lam., accesión ILS 388) y papa (*Solanum tuberosum* L., var. Millenia). Semillas de lulo provenientes del banco de germoplasma de CORPOICA se sembraron en macetas con turba como sustrato; tanto la germinación de las semillas como el desarrollo de las plántulas se dieron bajo condiciones de invernadero. El material vegetal de papa se colectó de plantas pertenecientes a la Colección Central Colombiana que se encontraban en el campo. El Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural ha asignado a CORPOICA las tareas de administrar el banco de germoplasma de la nación y de realizar investigación con los recursos genéticos allí conservados. Por lo anterior, los investigadores de CORPOICA tienen acceso directo a tales recursos.

#### **3.2. Extracción y purificación de DNAs genómicos**

##### **3.2.1. DNA de lulo y papa**

El DNA genómico de lulo y papa se aisló a partir de hojas jóvenes empleando el protocolo reportado por Doyle y Doyle (1990) (Anexo 1).

##### **3.2.2. DNA de *Escherichia coli* (Migula) cepa DH5 $\alpha$**

El DNA genómico de *E. coli* se aisló empleando el protocolo de extracción reportado por Chen y Kuo (1993) (Anexo 2).

### **3.3. Evaluación de la integridad y cuantificación de los DNAs genómicos**

Una alícuota de cada uno de los DNAs genómicos purificados se sometió a electroforesis en gel de agarosa 1% (buffer TAE 1X, 85 voltios, 40 minutos) con el fin de verificar su integridad. Finalizada la electroforesis, el gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) durante 10 minutos y se observó bajo luz ultravioleta (L.U.V.). Para determinar la concentración de los DNAs, alícuotas de cada uno de ellos y de un marcador de masa molecular (High DNA Mass Ladder, Invitrogen, USA) se sometieron a electroforesis bajo las condiciones antes referidas, el gel se fotografió con el sistema de documentación de imágenes InGenius LHR (Syngene, USA) y la imagen se analizó con el programa GeneTools versión 4.01 (Syngene, USA).

### **3.4. Diseño de iniciadores para PCR**

Las secuencias de los genes *ppo* previamente reportadas en tomate (*Solanum lycopersicum* L.), papa (*Solanum tuberosum* L.), tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), batata (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), durazno (*Prunus persica* (L.) Batsch), manzana (*Malus pumila* Mill.), pera (*Pyrus communis* L.) y haba (*Vicia faba* L.) se alinearon utilizando el programa ClustalX versión 2.0.9 (<http://www.clustal.org/download/current/>) (Larkin *et al.*, 2007). Una vez identificadas las regiones (hacia los extremos 5' y 3') en las que había mayor conservación en las secuencias, se utilizaron el gen *ppo-F* de tomate (como gen de referencia) y el programa Oligo versión 6.71 (<http://www.oligo.net/downloads/html>) (Rychlik y Rhoads, 1989; Rychlik, *et al.*, 1990) (Molecular Biology Insights, Inc., USA) para diseñar dos parejas de iniciadores. La primera pareja se diseñó con el fin de amplificar un fragmento de entre 915 y 965 pb. (fragmento 1) correspondiente a la mitad del gen *ppo* hacia el extremo 5' y la segunda para amplificar un fragmento de entre 880 y 910 pb. (fragmento 2)

correspondiente a la mitad del gen hacia el extremo 3'. La especificidad del anillaje de los iniciadores en los sitios previamente definidos del gen utilizado como referencia se verificó mediante análisis con el programa BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (NCBI, USA).

### **3.5. Amplificación por PCR de los fragmentos 1 y 2 del candidato a gen *ppo* de lulo**

Para determinar las condiciones que permitieran una amplificación óptima de los fragmentos 1 y 2 del gen *ppo* de lulo se ensayaron diferentes concentraciones de iniciadores, sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>) y DNA; de otro lado se evaluaron programas de amplificación con diferentes temperaturas de anillaje y períodos de extensión. Una vez estandarizadas las condiciones de amplificación óptimas, los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa 1% (buffer TAE 1X, 85 voltios, 45 minutos) para verificar el tamaño de los fragmentos y la especificidad de la amplificación.

### **3.6. Purificación de los fragmentos 1 y 2**

Los fragmentos amplificados mediante PCR fueron purificados empleando el sistema Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA) y cuantificados siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

### **3.7. Secuenciación de los fragmentos 1 y 2**

Los fragmentos 1 y 2 se secuenciaron (Macrogen, USA) empleando el sistema automatizado ABIPrism 310 (Applied Biosystems, USA) y el método de terminación de cadena con dideoxinucleótidos (Sanger, *et al.*, 1977). Para tal fin se emplearon los mismos iniciadores utilizados en la generación mediante PCR de los fragmentos.

Los fragmentos se secuenciaron dos veces por ambos extremos con el fin de corroborar las secuencias obtenidas.

### **3.8. Determinación de secuencias consenso para los fragmentos 1 y 2 y obtención de la secuencia parcial del candidato a gen *ppo* de lulo**

Las secuencias correspondientes tanto a la hebra positiva como a la negativa de cada fragmento se alinearon empleando el programa Codon CodeAligner versión 2.0.4 (<http://www.codoncode.com/aligner/download.htm>) (CodonCode Corporation, USA) con el fin de generar una secuencia consenso para cada fragmento. Posteriormente las dos secuencias consenso se ensamblaron para generar la secuencia parcial del gen *ppo*.

### **3.9. Análisis de hibridación Southern**

#### **3.9.1. Digestión de los DNAs genómicos**

15 µg de DNA genómico de lulo, papa y *Escherichi coli* fueron sometidos a doble digestión con combinaciones de las enzimas de restricción Bam HI, Xba I y Pst I. El corte de restricción con cada enzima se llevó a cabo durante 7 horas, a 37 °C y utilizando 8 unidades de enzima por cada microgramo de DNA. Los DNA's digeridos enzimáticamente fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa 0.8% (buffer TAE 1X, 60 V, 7 horas). Una vez finalizada la electroforesis, el gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) durante 15 minutos y se observó bajo luz violeta para verificar la calidad de la digestión del DNA.

### **3.9.2. Transferencia Southern**

Una vez finalizada la electroforesis, el gel se trató con una solución ácida (0.25 N HCl, 25 minutos) para depurinar el DNA y después se lavó con agua destilada durante 2 minutos. A continuación, el DNA se denaturó incubando el gel en una solución básica (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl, 35 minutos); para retirar los excesos de solución denaturante se hizo un lavado con agua destilada por 2 minutos. Finalmente el gel se neutralizó empleando una solución salina (1M Tris/HCl pH=8.0, 1.5 M NaCl, 35 minutos).

Para el montaje de la transferencia capilar neutra (con flujo hacia arriba) se utilizó una membrana de Nylon Hybond N<sup>+</sup> (# cat. RPN 225B, Amersham Life Science, USA) y se siguieron las recomendaciones de Sambrook y Russell (2001); el procedimiento transcurrió durante 16 horas y se utilizó SSC 20X (pH= 7.0) como solución de transferencia. Finalizada la transferencia, la membrana se lavó durante 15 minutos con SSC 20X y se colocó sobre papel filtro por 15 minutos hasta que se secó por completo. Para fijar el DNA a la membrana, ésta fue irradiada con luz UV (254 nm) durante 3 minutos por cada lado.

### **3.9.3. Generación de una sonda para el análisis Southern**

A partir de DNA genómico de papa y empleando los iniciadores InfPPO-F y PPO-Rv (diseñados para amplificar el fragmento 2 del gen *ppo* de lulo), se generó mediante PCR un fragmento de aproximadamente 920 pb con el fin de utilizarlo como sonda en el análisis de hibridación Southern. El producto de PCR fue purificado y cuantificado utilizando los métodos descritos previamente para los fragmentos 1 y 2 de lulo.

### **3.9.4. Marcaje del fragmento de 920 pb con Biotina**

160 ng del fragmento generado mediante PCR a partir de DNA genómico de papa fueron marcados con Biotina utilizando el sistema Detector Random Primer DNA Biotinylation Kit (KPL, USA) (Anexo 3).

### **3.9.5. Determinación de la actividad específica relativa de la sonda biotinilada**

Para determinar la cantidad de DNA biotinilado que se generó durante el proceso de marcaje, se preparó una dilución 1/200 de la sonda biotinilada y a partir de ésta se prepararon diluciones seriadas 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512. Sobre una membrana de Nylon (Immobilon-Ny<sup>+</sup>, Millipore, USA) se sembró 1 µL de cada dilución de la sonda biotinilada. Para detectar la sonda, se utilizó el sistema Detector AP Chemiluminescent Blotting Kit (KPL, USA). La membrana se incubó con el conjugado Alkaline Phosphatase - Streptavidin (AP-SA) diluido 1/10.000, se lavó tres veces con Phosphatase Wash Buffer 1X, 2 veces con Phosphatase Assay Buffer 1X y enseguida se incubó durante 5 minutos con CDP Star Chemiluminescent Substrate. Finalmente la membrana se expuso a la película radiográfica durante 5 minutos y se reveló (Anexo 4).

### **3.9.6 Hibridación *Southern***

La membrana portadora del DNA objetivo se colocó en una botella de hibridación, se adicionaron 35 mL de Prehybridization Solution (la cual contenía DNA de esperma de salmón (100 µg/mL) predenaturado mediante calentamiento a 95 °C por 5 minutos) y se incubó (1 hora, 42 °C, agitación) en el horno de hibridación. Una vez finalizada la prehibridación, se agregó 1 µL de la sonda biotinilada (predenaturada mediante calentamiento a 95 °C por 10 minutos) y se incubó (16 horas, 42 °C,

agitación). Con el fin de lograr los resultados más específicos posibles se realizaron cuatro lavados poshibridación en los que se evaluaron diferentes concentración de SDS y SSC, temperaturas de incubación y tiempos de lavado. Para la detección de la sonda biotinilada se utilizó el sistema Detector AP Chemiluminescent Blotting Kit (KPL, USA) (Anexo 5).

### **3.10. Análisis de la secuencia determinada en lulo**

#### **3.10.1. Similitud de la secuencia nucleotídica de lulo con genes *ppo* de otras especies**

La comparación entre la secuencia nucleotídica identificada en lulo y los genes *ppo* reportados en otras especies se hizo utilizando el programa BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (NCBI, USA).

#### **3.10.2. Mapas de restricción para los genes *ppo***

La ubicación de los sitios de corte para enzimas de restricción en los genes *ppo* de papa, tomate, tabaco, batata, haba, durazno, manzana y la secuencia identificada en lulo se determinó mediante el uso del programa Webcutter 2.0 (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>). Con el fin de comparar el estado de conservación de los mismos en todos los genes analizados, se construyeron mapas de restricción mediante el uso del programa NEBcutter versión 2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>) (Vincze, *et al.*, 2003).

#### **3.10.3. Identificación de marcos de lectura abiertos**

Mediante el uso del programa ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) (NCBI, USA) se identificaron los marcos de lectura abiertos existentes y la secuencia de aminoácidos de las proteínas hipotéticas deducidas de la secuencia nucleotídica identificada en lulo.

#### **3.10.4. Similitud de la proteína hipotética deducida del gen *ppo* de lulo con proteínas PPO de otras especies**

La comparación entre la proteína hipotética deducida de la secuencia nucleotídica identificada en lulo con proteínas PPO reportados en otras especies se hizo utilizando el programa BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (NCBI, USA).

#### **3.10.5. Análisis de relación filogenética de la proteína PPO hipotética de lulo con otras PPO**

Utilizando el programa Mesquite versión 2.5 (<http://mesquiteproject.org/mesquite/mesquite.html>) y las secuencias de aminoácidos de las PPOs previamente reportadas se construyó un cladograma que permitiera evidenciar el nivel de cercanía filogenética de las PPOs existentes en otras especies con la proteína hipotética deducida de la secuencia de DNA identificada en lulo.

#### **3.10.6. Identificación de dominios conservados en la proteína hipotética de lulo**

La presencia en la proteína hipotética deducida de la secuencia identificada en lulo de módulos o dominios cuyo origen, estructura o función se encuentren conservados a lo largo de la historia evolutiva de los organismos se determinó mediante el uso del programa CDD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi>) (Marchler-Bauer, *et al.*, 2007) (NCBI, USA), que permite establecer comparaciones con proteínas que han sido exhaustivamente caracterizadas.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Iniciadores para PCR

Los genes *ppo* previamente identificados en numerosas especies vegetales presentan un tamaño que oscila entre 1700 y 2000 pares de bases (Cary, *et al.*, 1992; Boss, *et al.*, 1995; Goldman, *et al.*, 1998; Haruta, *et al.*, 1998; Demeke y Morris, 2002). Con el fin de amplificar mediante PCR dos fragmentos de DNA que permitieran cubrir la totalidad de la secuencia codificante de un gen *ppo* de lulo y que tuvieran un tamaño apropiado para ser secuenciados, se diseñaron cuatro oligonucleótidos.

Los trabajos sobre la estructura de los genes *ppo* en papa (Hunt, *et al.*, 1993) y tomate (Newman, *et al.*, 1993) revelan que el tamaño de estos genes varía entre especies y que las secuencias que flanquean los extremos 5' y 3' muestran un alto grado de divergencia incluso entre genes pertenecientes a la misma especie. Considerando la variabilidad existente en los extremos de las regiones que se pretendía amplificar y buscando iniciadores cuyas características permitieran un anillaje altamente específico en los sitios previamente determinados, se diseñaron oligonucleótidos con degeneración en varias posiciones (Tabla 1).

Para amplificar la mitad del gen hacia el extremo 5' (fragmento 1) se diseñaron los oligonucleótidos SupPPO-F (directo) (5'– CTCCTAY WCCAYCYCCTGATCT –3') y SupPPO-L (reverso) (5'– CAGAAYTCN GAGTTCAACCAATC –3'). Para amplificar la mitad del gen hacia el extremo 3' (fragmento 2) se diseñaron los oligonucleótidos InfPPO-F (directo) (5'– CAAWTGRTNACTAAKGCTCC –3') y PPO-Rv (reverso) (5'– TTAACAATCCKCAAGCTTGAT –3'). Teniendo en cuenta las particularidades de los genes *ppo* anteriormente referidas, el iniciador directo SupPPO-F fue diseñado para que anillara aproximadamente a 260

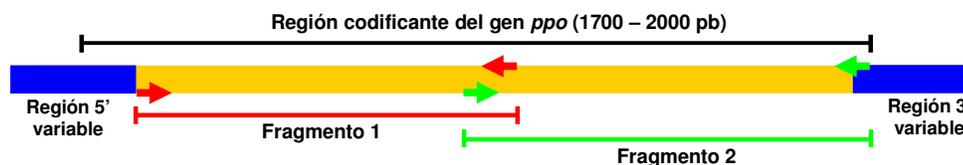
pares de bases del sitio de inicio de la secuencia codificante (Figura 2). El diseño de estos iniciadores se basó en la identificación de las regiones de secuencia mejor conservadas hacia los extremos 5' y 3' de los genes *ppo*. Tales regiones fueron determinadas a partir de los alineamientos de secuencias correspondientes a genes *ppo* de diversas especies (Figuras 3 y 4).

**Tabla 1. Características de los iniciadores diseñados para la amplificación de fragmentos de un candidato a gen *ppo* en lulo.**

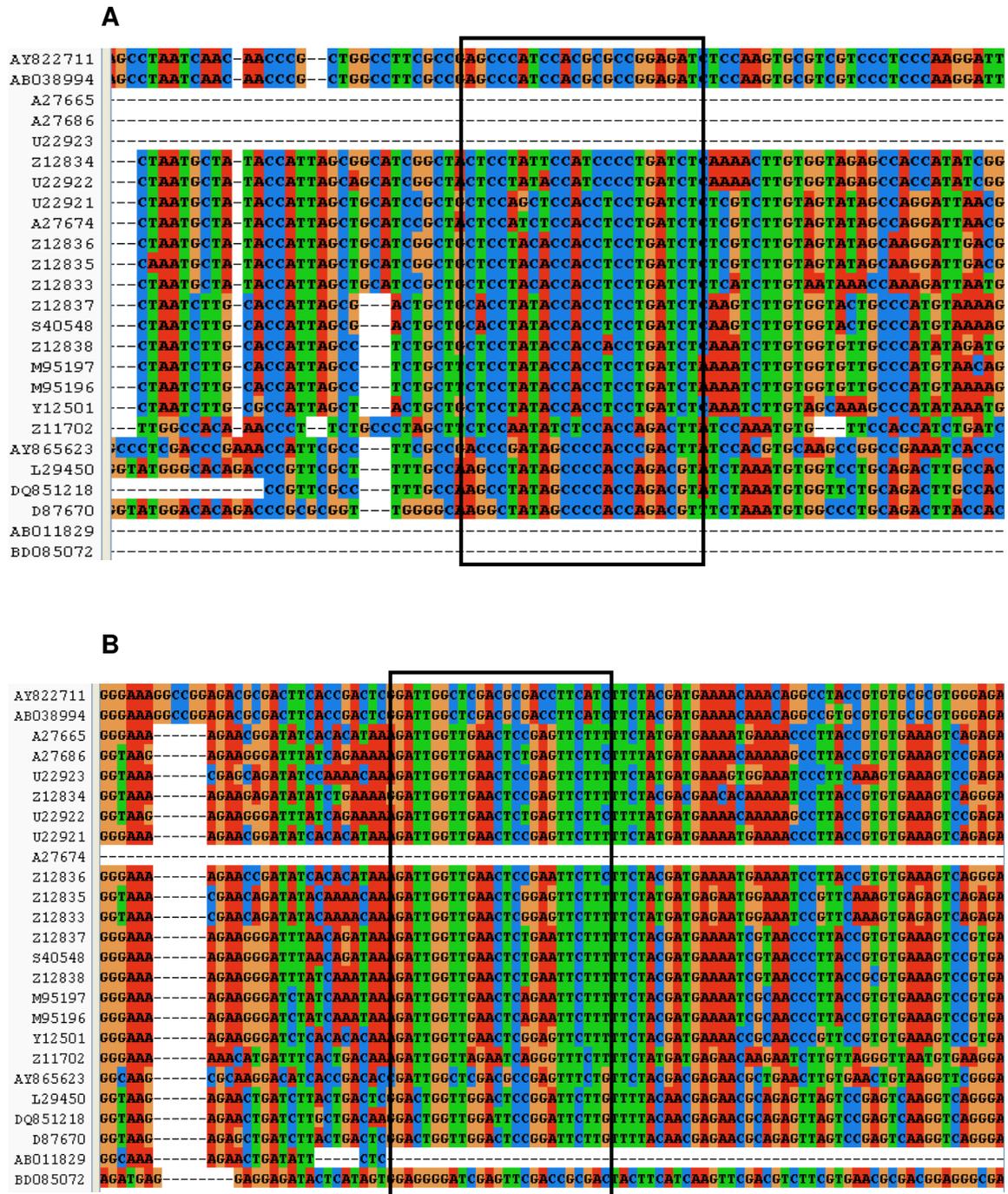
Iniciador	Longitud (pb)	Posición degenerada	% GC	Tm (°C)*
SupPPO-F	22	nucleótidos 7, 8, 12 y 14	45.5	66.6
SupPPO-L	23	nucleótidos 6 y 9	36.4	65.2
InfPPO-F	20	nucleótidos 4, 7, 9 y 15	36.4	63.5
PPO-Rv	21	nucleótido 11	38.0	67.0

\* Tm teórico calculado teniendo en cuenta la cantidad total de bases.

El análisis BLASTN realizado a las dos parejas de iniciadores para verificar la especificidad del anillaje en las regiones previamente establecidas del gen *ppo-F* de tomate (utilizado como referencia) permitió determinar las posiciones en las cuales estos anillan en genes *ppo* de diversas especies y el tamaño del producto de PCR que permitirían generar (Tabla 2).



**Figura 2. Ubicación de los iniciadores diseñados para amplificar los fragmentos 1 y 2 del gen *ppo* de lulo.** La línea negra señala los puntos en los que inicia y termina la región codificante del gen. Las líneas y las flechas rojas y verdes representan los fragmentos producto de PCR y los sitios donde anillan los iniciadores respectivamente.



**Figura 3. Alineamiento de secuencias de los genes *ppo* de diversas especies para el diseño de los iniciadores utilizados en la amplificación del fragmento 1. El rectángulo negro señala la región sobre la cual anilla el iniciador. A. Alineamiento correspondiente a SupPPO-F. B. Alineamiento correspondiente a SupPPO-L.**

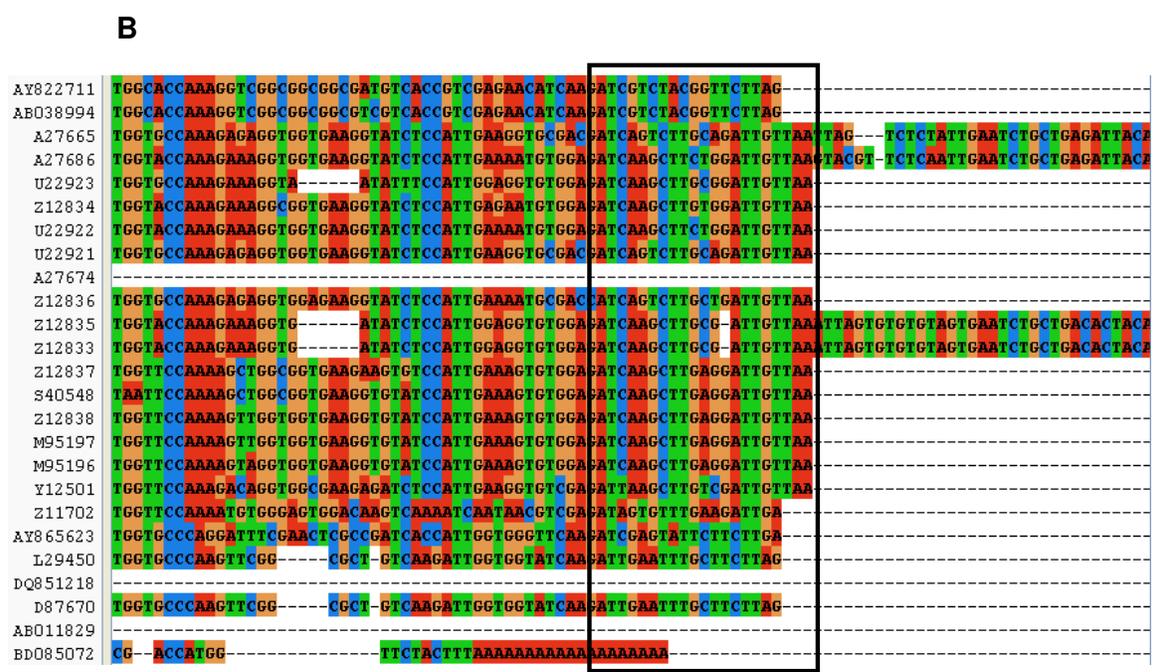
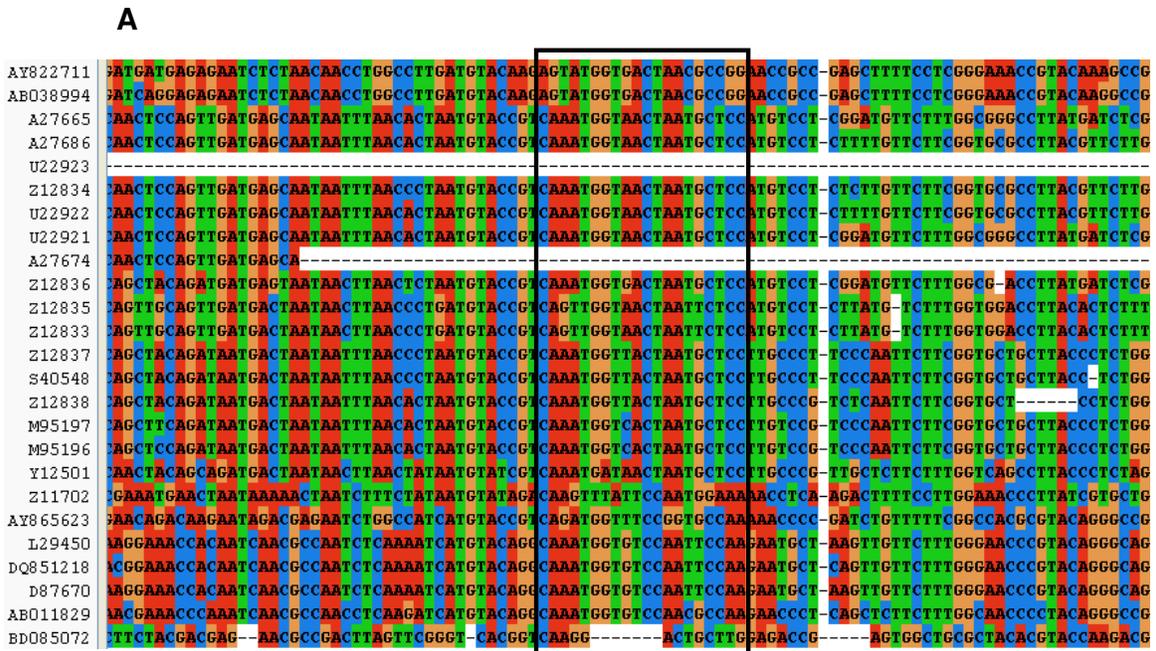


Figura 4. Alineamiento de secuencias de los genes *ppo* de diversas especies para el diseño de los iniciadores utilizados en la amplificación del fragmento 2. El rectángulo negro señala la región sobre la cual anilla el iniciador. A. Alineamiento correspondiente a InfPPO-F. B. Alineamiento correspondiente a PPO-Rv.

El hecho que los iniciadores diseñados para este estudio encuentren en el DNA de tomate, papa y tabaco entre otras, secuencias pertenecientes a genes *ppo* sobre las cuales puedan anillar de manera muy específica demuestra que el método utilizado para el diseño de éstos fue muy efectivo. Aunque la evidencia experimental sugiere que estos cuatro iniciadores permitieron la amplificación exclusiva de fragmentos correspondientes a genes *ppo* de lulo y surge la posibilidad de que pudieran ser utilizados con el mismo fin en especies de dicotiledóneas, de ninguna manera se propone el uso universal de ellos.

**Tabla 2. Sitios de anillaje sobre genes *ppo* de solanáceas y tamaño de los productos de PCR que permitirían generar los iniciadores diseñados para este estudio.**

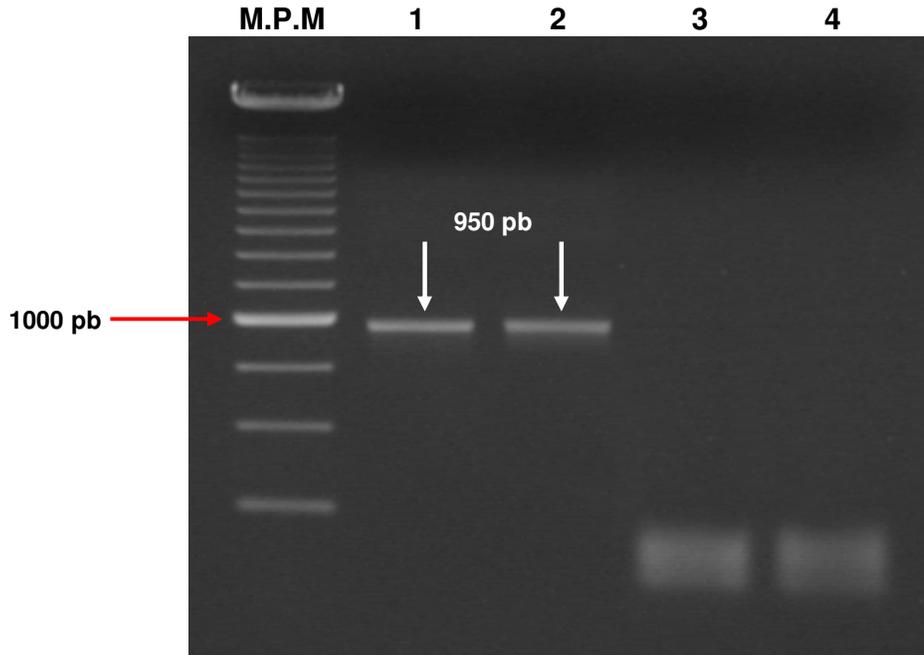
<b>Especie</b>	<b>Gen</b>	<b>Sitio anillaje primers fragmento 1</b>	<b>Tamaño producto PCR (pb.)</b>	<b>Sitio anillaje primers fragmento 2</b>	<b>Tamaño producto PCR (pb.)</b>
Tomate	<i>ppo</i> A	263 - 1180	939	881 - 1762	901
Tomate	<i>ppo</i> B	263 - 1183	942	884 - 1771	908
Tomate	<i>ppo</i> C	251 - 1168	939	869 - 1750	901
Tomate	<i>ppo</i> D	251 - 1168	939	869 - 1756	908
Tomate	<i>ppo</i> E	263 - 1159	918	878 - 1744	887
Tomate	<i>ppo</i> F	260 - 1153	915	878 - 1738	881
Papa	<i>pot</i> 32	242 - 1186	966	887 - 1774	908
Papa	<i>pot</i> 33	272 - 1192	942	893 - 1780	908
Papa	pSP32	??? - 574	----	275 - 1162	908
Papa	<i>ppo</i> A	251 - 1147	918	866 - 1732	887
Papa	<i>ppo</i> B	266 - 1162	918	881 - 1747	887
Papa	pSRP33	??? - 574	---	275 - 1162	908
Tabaco	<i>ppo</i>	271 - 1176	927	886 - 1761	896

#### **4.2. Amplificación por PCR de los fragmentos 1 y 2 del candidato a gen *ppo* de lulo**

En principio, la manera como fueron diseñados los iniciadores garantiza la amplificación altamente específica de los fragmentos 1 y 2 en lulo. El análisis BLASTN hecho para las dos parejas de iniciadores permitió establecer un rango de tamaños dentro del cual deberían estar ambos fragmentos. Según éste, el fragmento 1 debería presentar un tamaño entre 915 y 966 pb mientras que el fragmento 2 debería presentar un tamaño entre 880 y 910 pb. El análisis de los productos de amplificación mediante electroforesis mostró que los fragmentos 1 y 2 tenían un tamaño aproximado de 950 y 920 pb respectivamente.

En las figuras 5 y 6 se observa que tanto los iniciadores SupPPO-F y SupPPO-L como InfPPO-F y PPO-Rv permitieron amplificar fragmentos de los mismos tamaños (950 y 920 pb respectivamente) a partir de genoma de papa. Después de haber evaluado diferentes concentraciones de magnesio (1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 mM) con el propósito de optimizar la amplificación de los fragmentos 1 y 2, se determinó que los valores óptimos eran 1.5 y 2.0 mM respectivamente (Tablas 3 y 5).

Los ensayos de estandarización de la temperatura de anillaje cubrieron el rango entre 60 y 67°C para los iniciadores SupPPO-F y SupPPO-L (fragmento 1) y el rango entre 54 y 60°C para los iniciadores InfPPO-F y PPO-Rv (fragmento 2). Los mejores resultados se obtuvieron utilizando 65.5 y 58 °C respectivamente (Tablas 4 y 6).



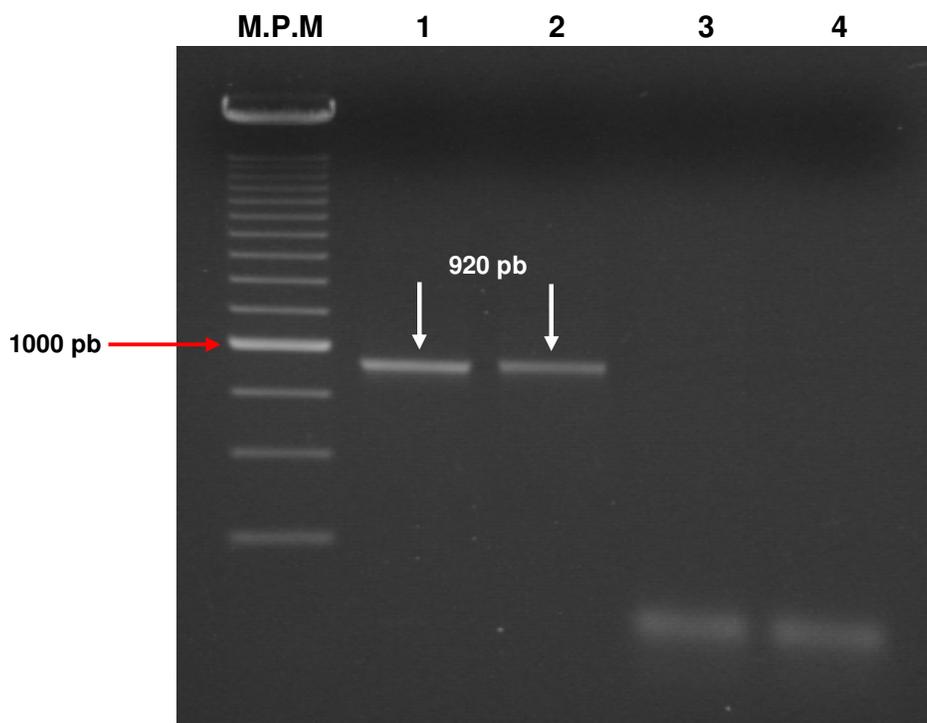
**Figura 5. Amplificación por PCR del fragmento 1 con los iniciadores SupPPO-F y SupPPO-L a partir de DNA genómico.** Las flechas blancas señalan las bandas de 950 pb. M.P.M: Marcador de peso molecular; Carril 1: DNA genómico de lulo; Carril 2: DNA genómico de papa (control positivo); Carril 3: DNA genómico de *E. coli* (control negativo); Carril 4: Blanco.

**Tabla 3. Condiciones de reacción utilizadas en la amplificación por PCR del fragmento 1 del candidato a gen *ppo* de lulo.**

Reactivo	Conc. Inicial	Conc. Final	Volumen/reacción
Agua	-	-	13.7 $\mu$ L
Buffer PCR	10X	1X	2.5 $\mu$ L
MgSO <sub>4</sub>	50 mM	1.5 mM	0.75 $\mu$ L
dNTP's	2.5 mM	0.2 mM	2.0 $\mu$ L
Primer SupPPO-F	10 $\mu$ M	0.4 $\mu$ M	1.0 $\mu$ L
Primer SupPPO-L	10 $\mu$ M	0.4 $\mu$ M	1.0 $\mu$ L
Taq DNA Polimerasa	5 U/ $\mu$ L	-	0.25 $\mu$ L
Platinum Hi-Fi			
DNA	20 ng/ $\mu$ L	-	3.8 $\mu$ L
<b>Volumen final</b>			<b>25.0 <math>\mu</math>L</b>

**Tabla 4. Programa de ciclaje utilizado para la amplificación por PCR del fragmento 1 del candidato a gen *ppo* de lulo.**

Etapa	Temperatura / Tiempo	# Ciclos
Denaturación Inicial	94 °C X 3 min.	1
Amplificación		45
Denaturación	94 °C X 1 min.	
Anillaje	65.5 °C X 45 seg.	
Extensión	72 °C X 75 seg.	
Extensión final	72 °C X 7 min.	1



**Figura 6. Amplificación por PCR del fragmento 2 con los iniciadores InfPPO-F y PPO-Rv a partir de DNA genómico. Las flechas blancas señalan las bandas de 920 pb. M.P.M: Marcador de peso molecular; Carril 1: DNA genómico de lulo; Carril 2: DNA genómico de papa (control positivo); Carril 3: DNA genómico de *E. coli* (control negativo); Carril 4: Blanco.**

**Tabla 5. Condiciones de reacción utilizadas en la amplificación por PCR del fragmento 2 del candidato a gen *ppo* de lulo.**

Reactivo	Conc. Inicial	Conc. Final	Volumen/reacción
Agua	-	-	13.45 $\mu$ L
Buffer PCR	10X	1X	2.5 $\mu$ L
MgSO <sub>4</sub>	50 mM	2 mM	1.0 $\mu$ L
dNTP's	2.5 mM	0.2 mM	2.0 $\mu$ L
Primer InfPPO-F	10 $\mu$ M	0.4 $\mu$ M	1.0 $\mu$ L
Primer PPO-Rv	10 $\mu$ M	0.4 $\mu$ M	1.0 $\mu$ L
Taq DNA Polimerasa	5 U/ $\mu$ L	-	0.25 $\mu$ L
Platinum Hi-Fi			
DNA	20 ng/ $\mu$ L	-	3.8 $\mu$ L
<b>Volumen final</b>			<b>25.0 <math>\mu</math>L</b>

**Tabla 6. Programa de ciclaje utilizado en la amplificación por PCR del fragmento 2 del candidato a gen *ppo* de lulo.**

Etapa	Temperatura / Tiempo	# Ciclos
Denaturación Inicial	94 °C X 3 min.	1
Amplificación		45
Denaturación	94 °C X 1 min.	
Anillaje	58 °C X 45 segundos	
Extensión	72 °C X 75 segundos	
Extensión final	72 °C X 7 min.	1

#### 4.3. Análisis de la secuencia del candidato a gen *ppo* de lulo

La caracterización molecular de los fragmentos 1 y 2 amplificados a partir de DNA genómico de lulo permitió determinar 843 y 800 pares de bases respectivamente. El ensamblaje de los dos fragmentos produjo una secuencia de 1430 pb (Figura 7). Teniendo en cuenta la divergencia en la secuencia del extremo 5' en los genes *ppo* de tomate, papa, tabaco y otras especies, el iniciador directo (diseñado con base en la secuencia del gen *ppo*-F de tomate) utilizado para amplificar el fragmento 1 se sintetizó de forma que anillara a 260 pb del sitio de inicio de la secuencia codificante. El alineamiento de los genes *ppo* de tomate y papa con el segmento de 1430 pb identificado en lulo permitió precisar que hacia el

extremo 5' de éste hay un fragmento de aproximadamente 280 pb cuya secuencia aún está por determinar. Este hecho coincide con lo presupuestado inicialmente en el diseño de los iniciadores. La diferencia observada puede ser la consecuencia de la inserción en el fragmento de lulo o la delección en los genes de tomate y papa de 20 pb; todo ello concuerda con las observaciones sobre la notable variabilidad de la secuencia en esta región de los genes *ppo* (Newman, *et al.*, 1993). Aunque el iniciador PPO-Rv utilizado para secuenciar el fragmento 2 se diseñó para que anillara justamente sobre el final de la secuencia codificante del gen, las primeras 51 pares de bases no se pudieron determinar con precisión dado que la técnica presenta dificultades para la identificación de fragmentos de DNA muy pequeños al inicio del procedimiento. Puesto que para determinar la secuencia codificante completa del candidato a gen *ppo* encontrado en lulo aún es necesario identificar alrededor de 330 pb., en el presente estudio se reporta una secuencia nucleotídica parcial.

```

1   gattaatct gtgtaaagcc catataaagc cagatacggg ggtgacatac agttgttgcc ctccgatacc
71   cgaagatac gacagcgttc ctactacaa gtcccctct atgactaac tccgcatccg gcccccctgt
141  caccgctgg atgaggagta tattgcaaaa taccaattgg ctactagtcg aatgagggga ctgataaag
211  accctttga ccctctggc tttaagcaac aagctaata tcaattgctc tattgtaatg gtgctataa
281  agttgggga aaagagttac aagtgcact ctctggcct tcttctct tcatagatg gtaactgtac
351  ttctacgaga gaatctggg atctctcatt aatgatcaa ctttcgctt gccatactgg aattgggacc
421  atccaaaagg catgctgata cctccatgt ttgatgtga aggtcatcc ctttacgatg aaaaacgtaa
491  ccaaaatcac cgaatggaa aaataattga tctcgcttt ttcgtaaaag aaaccctaac aactcaactc
561  caaacaatga cgaataactt aactcttatg taccgcaaa tgataactaa tgctcctgt ccttcgctgt
631  ttttcgtaa tccttaccct ctggaaccg atccaagtcc agaatgggc actatcgaaa atattctca
701  caatcggtc cagctctggg tgggtgacc acgacaacca aacggagagg acatgggtaa
761  ttttactca tccggtctag aaccggctt ctttgccac cactccaatg tggaccgaat gtggaatgaa
831  tggaaagcaa tcggtgggaa aagaagagat ctaccgaca aagattggt gaacacagaa ttcctttct
901  acgacgaaaa tcgcaagctg ttcgctgga gagtccgaga ctggtggac agtaagaaaa tgggattcga
971  ttaccgacca atgcccactc catggcgtaa ttttaacca tcaatcagaa agacaacagc agggaaactg
1041 aataccagtt ccattccacc ggttccaag gtcttcca tcctaaact agacagaccg atttcgctt
1111 ccatcaatag accagcttcg tcaaggactc aagctgagaa aatgaacaa gaggagatgc
1171 taacattcca caagatacaa cacaatgata gactgtactg gagattgat gtttctga atgtggacaa
1241 gactgtgaat gcgttgagc ttgaccagcc agattcgca gggagctata ctacgtacc gcatgtcat
1311 ggagatgata agcccatgc tacgagtgc acattatgc tggcgataac agaattgtg gaggataata
1381 acctggaaga tgaagagact attgtgtaa ctctggtcc aaaagtaggt

```

**Figura 7. Secuencia de nucleótidos correspondiente al candidato a gen *ppo* identificado en lulo (1430 pb).** La información aparece registrada en la base de datos de nucleótidos de **GenBank** bajo el número de **accesión FJ573257**.

El fragmento de 1430 pb está constituido por 428 adeninas (29.93%), 319 citosinas (22.30%), 303 guaninas (21.20%) y 380 timinas (26.57%). El contenido de guaninas-citosinas (%GC) para este fragmento es 43.5%, valor que se encuentra dentro del rango que ha sido determinado previamente para los genomas de algunas solanáceas, el cual oscila entre 40 y 45% (Carels, *et al.*, 1998; Rensink, *et al.*, 2005). El %GC en genes que codifican para *ppo* (Tabla 7) en tomate y papa oscila entre 41.83% y 43.64%; en tabaco es 44.80%, valor levemente superior al mostrado en las dos especies anteriores, y para el caso de especies como manzana, pera, durazno y batata (las tres primeras pertenecientes a la familia Rosaceae y la última a la familia Convolvulaceae) los valores se encuentran entre 52.24 y 56.76% respectivamente. El valor más bajo encontrado en la comparación corresponde a haba (37.94%), especie perteneciente a la familia Fabaceae.

La comparación de la secuencia de 1430 pb encontrada en lulo con los genes *ppo* de otras especies (mediante el uso del programa BLASTN) reveló valores de identidad elevados no sólo con los genes de especies pertenecientes a la familia Solanaceae sino con los de familias filogenéticamente distantes (Tabla 8). El porcentaje de identidad que arroja el análisis BLAST, definido como el grado de invariabilidad que presentan dos secuencias (de nucleótidos o proteínas) al ser comparadas, puede ser asumido como una medida de la similitud existente entre las mismas (Altschul, *et al.*, 1997).

En función del grado de semejanza de sus secuencias nucleotídicas con la secuencia del fragmento de lulo caracterizado, se identificaron dos grupos de genes *ppo*. El primero presentó similitudes que oscilaron entre 78 y 83% mientras que el segundo mostró valores entre 76 y 63%.

**Tabla 7. Contenido de nucleótidos y porcentaje de guaninas y citosinas (%GC) en genes *ppo* de algunas especies.**

Especie	Gen	Tamaño gen (pb)	A	C	G	T	% G+C
<b>Lulo</b>		<b>1430</b>	<b>428</b>	<b>319</b>	<b>303</b>	<b>380</b>	<b>43.50</b>
Tomate	ppo-A	1893	530	379	420	564	42.20
Tomate	ppo-B	1791	519	370	399	503	42.94
Tomate	ppo-C	1881	529	365	437	550	42.63
Tomate	ppo-D	1776	513	366	409	488	43.64
Tomate	ppo-E	1764	498	379	374	513	42.69
Tomate	ppo-F	1758	491	365	382	520	42.49
Papa	pot 32	1794	517	366	401	510	42.75
Papa	pot 33	1800	537	376	377	510	41.83
Papa	pSP32	1325	375	251	311	388	42.41
Papa	ppo-A	1752	501	367	378	506	42.52
Papa	ppo-B	1767	507	367	377	516	42.10
Tabaco	ppo	1781	491	409	389	492	44.80
Batata	ppo	1767	420	523	475	349	56.48
Batata	ppo-1	1767	419	525	478	345	56.76
Durazno	ppo	1794	485	512	437	360	52.90
Pera	ppo	1359	350	351	367	291	52.83
Haba	ppo-1	1821	602	353	338	528	37.94
Manzana	ppo-1	1782	463	462	475	382	52.58
Manzana	ppo-2	1782	462	472	459	389	52.24

La secuencia identificada en lulo exhibió similitudes del 83% con los genes *ppo* A y B de papa y *ppo* de caqui (*Diospyros kaki* L.), especie frutal de la familia Ebenaceae; del 82% con el gen *ppo*-E de tomate y el gen *ppo* del arbusto *Dasiphora fruticosa* (L.) Rydb., de la familia Rosaceae; del 81% con el gen *ppo* de tabaco, el gen *ppo*-POT33 de papa y el gen *ppo*-B de tomate; del 80% con los genes *ppo* F y D de tomate y del 78% con los genes *ppo* de los álamos de California (*Populus trichocarpa* Torr. & A. Gray) y Ontario (*Populus balsamífera* L.), de la familia Salicaceae (Wang y Constabel, 2004) y el gen *ppo* del chaparro (*Larrea tridentata* (DC.) Coville), especie perteneciente a la familia Zygophyllaceae. Este último codifica para una PPO que cumple un papel

central en la biosíntesis de lignanos (metabolitos secundarios de las plantas), sustancias polifenólicas cuyos representantes tales como el ácido nordihidroguaiarético y sus congéneres tienen potentes propiedades antivirales, anticancerígenas y antioxidantes (Cho, *et al.*, 2003). El análisis reveló que los genes *ppo* POT 32 y POT 72 de papa, *ppo* A y C de tomate y el gen que codifica para una proteína similar a PPO en berenjena (*Solanum melongena* L.) (Nagasawa, *et al.*, 2001) son los menos parecidos al fragmento encontrado en lulo; sus valores de similitud se encuentran entre 75 y 71%.

**Tabla 8. Niveles de similitud entre la secuencia nucleotídica identificada en lulo y los genes *ppo* de otras especies.**

Descripción del gen	Valor E	% Identidad
<i>ppo</i> -A papa ( <i>Solanum tuberosum</i> )	0.0	83%
<i>ppo</i> -B papa ( <i>Solanum tuberosum</i> )	0.0	83%
<i>ppo</i> -E tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	0.0	82%
<i>ppo</i> caqui ( <i>Diospyros kaki</i> )	0.0	83%
<i>ppo</i> tabaco ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	0.0	81%
<i>ppo</i> -F tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	0.0	80%
<i>ppo</i> alelo POT33 papa ( <i>Solanum tuberosum</i> )	1e-127	81%
<i>ppo</i> -B tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	7e-126	81%
<i>ppo</i> -D tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	5e-117	80%
<i>ppo</i> chaparro ( <i>Larrea tridentata</i> )	8e-26	78%
<i>ppo</i> álamo California ( <i>Populus trichocarpa</i> )	1e-23	78%
<i>ppo</i> álamo de Ontario ( <i>Populus balsamifera</i> )	1e-23	78%
<i>ppo</i> <i>Dasiphora fruticosa</i>	2e-16	82%

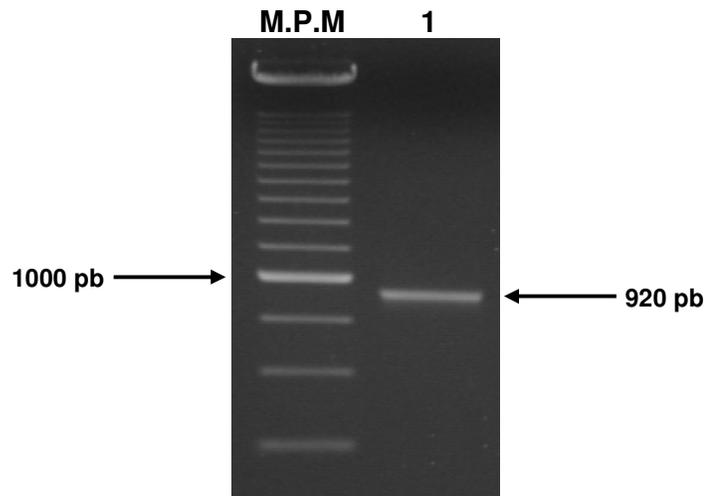
Dentro de los genes *ppo* del segundo grupo (similitudes que oscilan entre 76 y 63%) se encuentran los pertenecientes a especies de la familia Fabaceae como soya (*Glycine max* (L.) Merr.), haba (*Vicia faba* L.), alfalfa (*Medicago sativa* L.) (que se expresan en las flores y en las vainas en las que se alojan las semillas) y trébol rojo (*Trifolium pratense* L.) (Sullivan, *et*

*al.*, 2004); Rosaceae como manzana (*Malus pumila* Mill.), albaricoque (*Prunus armeniaca* L.) (Chevalier, *et al.*, 1999), ciruela del Japón (*Prunus salicina* Lindl.), ciruela mexicana (*Prunus mexicana* S. Watson) (Potter, *et al.*, 2007) y pera común (*Pyrus communis* L.); Papaveraceae como la dormidera (*Papaver somniferum* L.); Vitaceae como la uva (*Vitis vinifera* L.); Theaceae como el té (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze); Amaranthaceae como la espinaca (*Spinacia oleracea* L.) (Hind, *et al.*, 1995); Rhamnaceae (*Frangula californica* (Eschsch.) A. Gray) y Convolvulaceae como la batata (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). Chang y colaboradores (2007) reportaron la existencia de dos intrones en algunos de los miembros de la familia de genes *ppo* de trigo (*Triticum aestivum* L.). Este hallazgo permite explicar el bajo porcentaje de similitud que existe entre los genes *ppo* de solanáceas y otras familias de dicotiledóneas con monocotiledóneas como el trigo.

En la tabla 8 se observa que los valores E se presentan en orden numérico ascendente mientras que los porcentajes de identidad se muestran en desorden. Esto se debe a que el valor E representa el número de alineamientos que se puede esperar que ocurran por azar entre la secuencia en estudio y cualquiera otra de las existentes en una base de datos. Por lo tanto, entre más cercano a cero sea el valor E, más significativo es el alineamiento entre la secuencia que se analiza y la secuencia relacionada (Altschul, *et al.*, 1997). Los valores E más bajos que arrojó el análisis BLAST corresponden a los alineamientos con los genes *ppo* de papa, tomate y tabaco, especies estrechamente relacionadas con lulo. Vale la pena destacar que se presentó un valor E de cero (0.0) para el caqui, especie perteneciente a una familia que hace parte del orden Ericales. Esto concuerda con la filogenia de las angiospermas aceptada en la actualidad, en la que el orden Ericales es mucho más cercano al orden Solanales (dentro del cual se encuentra la familia Solanaceae) que a los órdenes a los que pertenecen las especies antes referidas que mostraron similitudes inferiores al 76%.

#### 4.4 Análisis de hibridación *Southern*

En la mayoría de especies vegetales superiores se ha determinado que los genes *ppo* se encuentran haciendo parte de familias multigénicas, como en el caso de tomate (Newman, *et al.*, 1993; Thipyapong, *et al.*, 1997), papa (Thygesen, *et al.*, 1995), haba (Cary, *et al.*, 1992) y trigo (Jukanti, *et al.*, 2004) entre otras. Para el análisis de hibridación *Southern* del genoma de lulo, a partir de DNA genómico de papa se generó por PCR un fragmento de 920 pb que se utilizó como sonda (Tablas 9 y 10). Este segmento corresponde al extremo 3' de uno de sus genes *ppo* (Figura 8).



**Figura 8. Producto de PCR utilizado como sonda para el análisis *Southern* del genoma de lulo.** M.P.M: Marcador de peso molecular; Carril 1: fragmento de 920 pb obtenido a partir de DNA genómico de papa.

El análisis *Southern* (Figura 9) reveló la presencia de señales de hibridación de aproximadamente 12 kb en los carriles 2, 3 y 4 correspondientes al DNA genómico de lulo digerido simultáneamente con las enzimas de restricción BamHI-PstI, BamHI-XbaI y XbaI-PstI respectivamente.

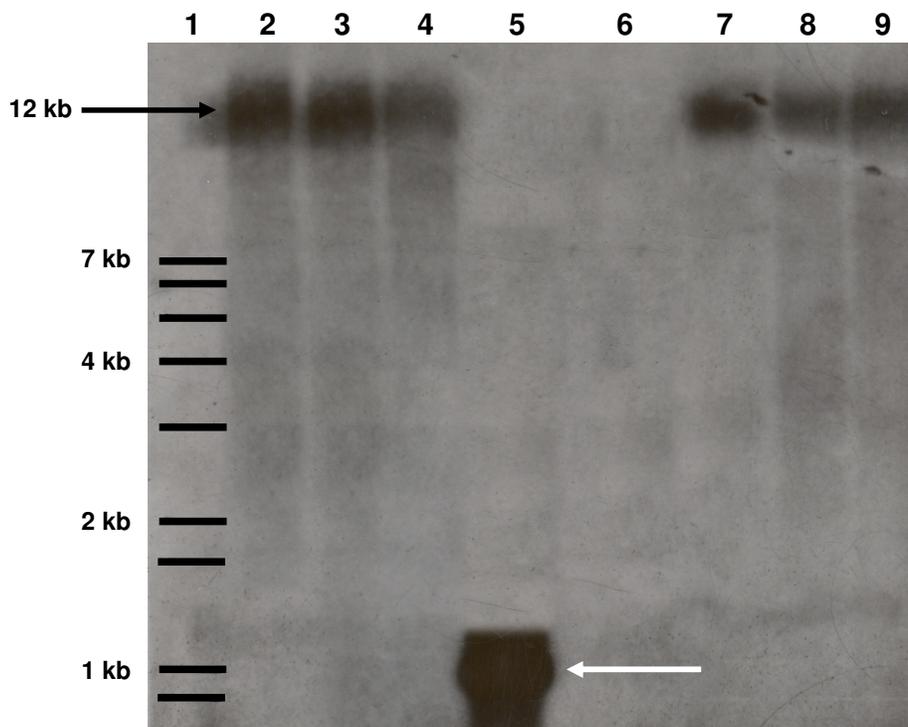
**Tabla 9. Condiciones de reacción utilizadas para la amplificación por PCR del fragmento de 920 bp utilizado como sonda en el análisis de hibridación *Southern* del genoma de lulo.**

Reactivo	Conc. Inicial	Conc. Final	Volumen/Reacción
Agua	-	-	13.70 µL
Buffer PCR	10X	1X	2.50 µL
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1.5 mM	0.75 µL
dNTP's	2.5 mM	0.2 mM	2.0 µL
Iniciador InfPPO-F	10 µM	0.4 µM	1.0 µL
Iniciador PPO-Rv	10 µM	0.4 µM	1.0 µL
Taq DNA Polimerasa	5 U/µL	-	0.25 µL
DNA Papa	20 ng/µL	-	3.80 µL
<b>Volumen final</b>			<b>25.0 µL</b>

**Tabla 10. Programa de ciclaje utilizado para la amplificación por PCR del fragmento de 920 bp utilizado como sonda en el análisis de hibridación *Southern* del genoma de lulo.**

Etapa	Temperatura/Tiempo	# Ciclos
Denaturación Inicial	94 °C X 4 min.	1
Amplificación		45
Denaturación	94 °C X 1 min.	
Anillaje	55.5 °C X 45 seg.	
Extensión	72 °C X 75 seg.	
Extensión final	72 °C X 7 min.	1

En el carril 5, correspondiente al fragmento generado a partir de DNA de papa y utilizado como sonda, como era de esperarse se observó una señal muy intensa y bien enfocada entre 900 y 1000 pb. Tal como en el caso del DNA de lulo, se observaron señales de hibridación de aproximadamente 12 kb en los carriles 7, 8 y 9 correspondientes al DNA genómico de papa digerido con las enzimas Bam HI - Pst I, Bam HI - Xba I y Xba I - Pst I. Estos resultados se lograron después de estandarizar las condiciones de temperatura, tiempo y concentración de sales para los lavados posthibridación (Tabla 11). Los resultados del análisis Southern coinciden con los observados en flor de tabaco por Goldman y colaboradores (1998) en el que se obtuvo una señal de hibridación de 11.5 kb para el DNA cortado con Bam HI.



**Figura 9. Análisis de hibridación Southern.** La flecha negra indica las señales de hibridación de aproximadamente 12 kb. Como sonda se utilizó un fragmento de 920 pb amplificado por PCR a partir de DNA genómico de papa (flecha blanca). Carril 1: Marcador de peso molecular; Carriles 2, 3 y 4: DNA genómico de lulo cortado con las combinaciones de enzimas BamHI-PstI, BamHI-XbaI y XbaI-PstI; Carril 5: Sonda (920 pb); Carril 6: Blanco; Carriles 7, 8 y 9: DNA genómico de papa cortado con las mismas combinaciones de enzimas usadas para lulo.

**Tabla 11. Concentración de sales, temperatura y tiempo empleados en los lavados poshibridación *Southern*.**

Lavado	Soluciones de lavado	Temperatura	Tiempo (min)
1	2X SSC + 0.5% SDS	Ambiente	15
2	1X SSC + 0.5% SDS	55 °C	15
3	1X SSC + 0.5% SDS	55 °C	15
4	0.1X SSC	Ambiente	15

De otro lado, los experimentos de mapeo por RFLPs realizados para determinar la organización de la familia de genes *ppo* en tomate revelaron que los genes *ppo-E* y *ppo-F* están localizados juntos dentro de una región de 12.4 kb mientras que los genes *ppo A*, *B* y *D* están localizados dentro de una segunda región de 12.4 kb. (Newman, *et al.*, 1993). En monocotiledóneas como el trigo se ha observado algo similar: los seis genes *ppo* que se conocen en la especie se encuentran organizados en dos agrupamientos independientes, cada uno cuenta con tres de estos genes (Jukanti, *et al.*, 2004).

Los cortes de restricción dobles que se hicieron en este estudio tenían la finalidad de generar fragmentos de DNA genómico mucho más pequeños que facilitarían la determinación del número de copias de la secuencia aquí reportada existentes en el genoma de lulo; los resultados obtenidos podrían deberse a que una de las enzimas utilizada para los cortes dobles del genoma no actuó apropiadamente, hecho que generó fragmentos de DNA de gran tamaño. Puesto que los resultados obtenidos no permitieron lograr la determinación propuesta, una primera alternativa consiste en digerir el genoma de lulo con una serie de enzimas diferentes que produzcan al menos un corte dentro de la secuencia del candidato a gen *ppo* presentado en esta investigación; esto permitiría que la sonda hibride con alguno de los dos fragmentos del gen cortado, de manera que se pueda obtener un patrón de señales de hibridación que permita establecer con claridad el número de genes *ppo* en la especie.

De otro lado, los resultados anteriormente presentados coinciden con el siguiente fenómeno: la existencia de genes significativamente conservados en las especies de solanáceas se encuentra estrechamente asociada al hecho de que su posición en el cromosoma y sus relaciones de posición con otros genes también lo están. Empleando marcadores moleculares desarrollados a partir de tomate, Bonierbale y colaboradores

(1988) y Tanksley y colaboradores (1992) demostraron un fuerte grado de colinealidad entre papa y tomate. Utilizando la misma aproximación, se identificaron 18 bloques de ligación homólogos entre pimiento y tomate (Livingstone, *et al.*, 1999). De igual modo, marcadores de tomate utilizados en berenjena revelaron regiones sinténicas entre estos (Doganlar, *et al.*, 2002).

#### **4.5 Análisis de conservación de sitios de restricción en genes *ppo***

Las secuencias de los genes *ppo* de tomate, papa, tabaco, batata, haba, durazno, manzana y el fragmento de 1430 pb identificado en lulo se analizaron con el programa Webcutter versión 2.0 (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>) para determinar la presencia de sitios de restricción comunes a todos ellos (Tabla 12). Se identificaron 50 enzimas que cortan a todos los genes *ppo* analizados; 9 que cortan a todos los genes *ppo* de las solanáceas consideradas en el estudio; 2 que cortan a todos los genes *ppo* de las solanáceas excepto al fragmento identificado en lulo; 21 que cortan a todos los genes analizados excepto al gen *ppo* de haba; 13 que cortan a los genes *ppo* de las solanáceas excepto al fragmento de lulo, a los genes *ppo* E y F de tomate, A y B de papa y al presente en tabaco; 5 que dentro del grupo de genes *ppo* de las solanáceas cortan solamente al fragmento de lulo, a los genes *ppo* E y F de tomate y al gen POT32 de papa; 3 que cortan a todos los genes *ppo* analizados excepto el fragmento de lulo; 9 que cortan a todos los genes *ppo* de solanáceas excepto el fragmento de lulo y el gen *ppo* D de tomate; 2 que cortan a todos los genes analizados excepto al fragmento de lulo y los genes *ppo* B de tomate y *ppo* 1 de batata y finalmente 6 que cortan todos los genes analizados excepto el fragmento de lulo, los genes *ppo* A y B de papa y el gen de haba.

La notable conservación (en términos de la presencia y localización en la secuencia) de los sitios de restricción que se observa en el

fragmento identificado en lulo, los genes *ppo* E y F de tomate y A y B papa es un claro reflejo del grado de similitud (a nivel de secuencia de nucleótidos) existente entre ellos, hecho que concuerda con los elevados

**Tabla 12. Enzimas de restricción que cortan a los genes *ppo* analizados.**

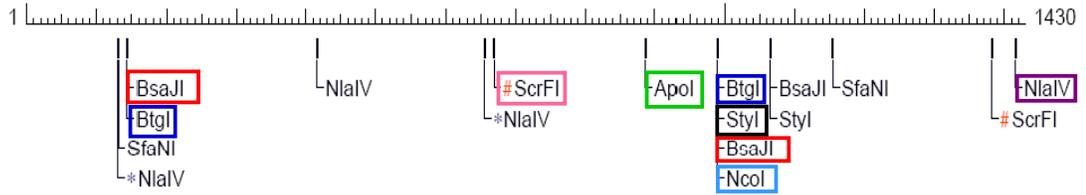
Enzima	Genes que corta
Aci I, AclW I, Afa I, Alu I, Alw I, BsaJ I, Bsc4 I, BseD I, BsiY I, Bsl I, Bsp143 I, BssT1 I, BstDE I, Cac8 I, Csp6 I, CviJ I, Dde I, Dpn I, Dpn II, Eco130 I, EcoT14 I, Erh I, Hinf I, Hph I, Hsp92 II, Kzo9 I, Mae II, Mae III, Mbo I, Mbo II, Mnl I, Mse I, MspR9 I, Mwo I, Nde II, Nla III, Nla IV, PspN4 I, Rsa I, Sau3A I, ScrF I, Sse9 I, Sty I, Taq I, Tru1 I, Tru9 I, Tsp45 I, Tsp509 I, TspE I, TthHB8 I.	Todos los genes analizados.
Acs I, Apo I, Bfa I, Bsp19 I, BstDS I, Dsa I, Mae I, Nco I, SfaN I. BsrD I, Fau I.	Todos los genes de las solanáceas. Todos los genes de las solanáceas excepto el de lulo.
AspS9 I, Asu I, Ava II, Bme18 I, Bse1 I, BseN I, BseR I, BsiS I, Bsr I, BsrS I, BstF5 I, Cfr13 I, Eco47 I, Fok I, Hap II, HgiE I, Hpa II, Msl I, Msp I, Sau 96 I, Sin I. AccB7 I, Acc II, BsaA I, BsaM I, Bsm I.	Todos los genes analizados excepto haba. Dentro del grupo de solanáceas cortan solamente a lulo, tomate (E y F) y papa (POT 32).
AccB1 I, Afl III, Ama87 I, Ava I, Ban I, Bco I, BshN I, BsoB I, BspLU11 I, Eco64 I, Eco88 I, MspA1 I, NspB II.	Todos los genes de solanáceas excepto lulo, tomate (E y F), papa (A y B) y tabaco.
BsoF I, Fsp4H I, Ita I.	Todos los genes analizados excepto lulo.
Ban III, Bsc I, BseC I, Bsp106 I, BspD I, BspX I, Bsu15 I, Cla I, Hind III.	Todos los genes de solanáceas excepto lulo y tomate D.
Bbv I, Bst71 I.	Todos los genes analizados excepto lulo, tomate B y batata 1.
AspLE I, Cfo I, Hha I, Hin6 I, HinP1 I, HspA I.	Todo los genes analizados excepto lulo, papa A y B y haba.

porcentajes de identidad obtenidos a partir del análisis BLAST en el que se comparó la secuencia encontrada en lulo con los genes *ppo* previamente reportados. Sin embargo, la comparación de los mapas de restricción de los genes *ppo* de solanáceas evidenció que aunque numerosos sitios de corte se conservan, en algunos casos la posición de los mismos varía (Figura 10). Ello responde al hecho que existen diferencias en el tamaño de los genes.

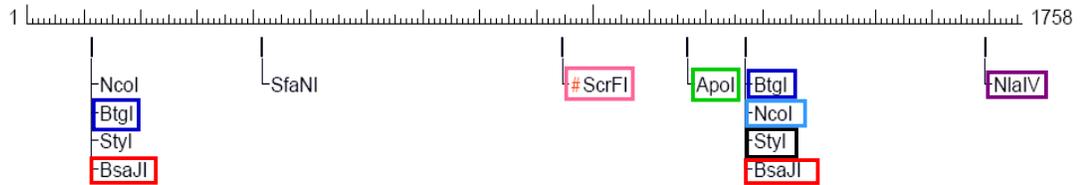
#### **4.6 Análisis de la proteína PPO deducida a partir del candidato a gen *ppo* de lulo**

El programa ORF Finder de NCBI permitió determinar que dentro de la secuencia nucleotídica identificada hay 10 marcos de lectura: cinco en la cadena positiva y cinco en la negativa. El más largo se encontró en la cadena positiva; presenta un tamaño de 1422 nucleótidos, se inicia en la posición 9 y se extiende hasta la posición 1430 (Tabla 13). La proteína hipotética deducida de este marco de lectura tiene 474 aminoácidos (Figura 11). El análisis BLASTP que permitió comparar la secuencia de aminoácidos deducida del fragmento encontrado en lulo con la base datos de proteínas mostró resultados que coinciden con lo observado en el análisis de la secuencia de nucleótidos presentado anteriormente. Los valores E de cero (0.0) corresponden a las proteínas PPO de papa, tomate y tabaco (Tabla 14). Tal como se observó en el análisis de la secuencia de nucleótidos, la PPO del caqui presentó un valor E igual al que mostraron las solanáceas antes referidas. El valor inmediatamente superior ( $1 \times 10^{-126}$ ) correspondió a la PPO de batata, especie perteneciente a la familia Convolvulaceae, que está estrechamente relacionada con las solanáceas puesto que ambas familias pertenecen al orden Solanales. Los órdenes Ericales (al cual pertenece la familia del caqui) y Solanales son filogenéticamente muy cercanos puesto que se originaron por divergencia de la subclase Asteridae (Soltis, *et al.*, 2008).

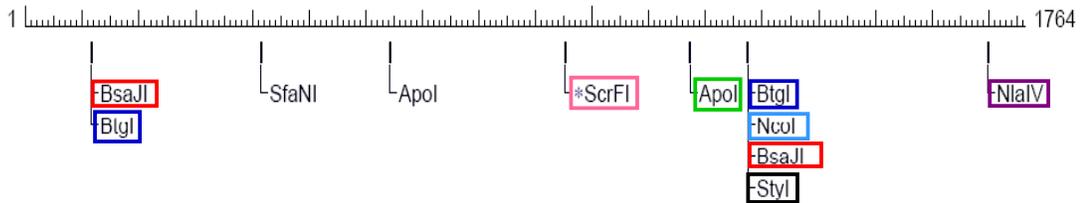
### Lulo PPO



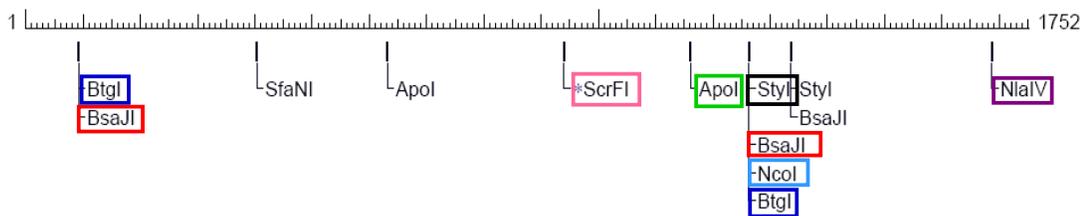
### Tomate F



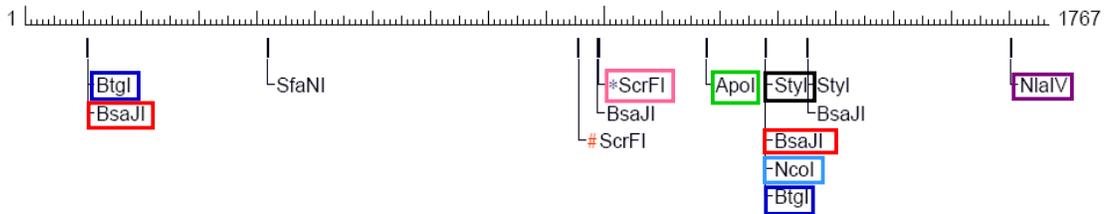
### Tomate E



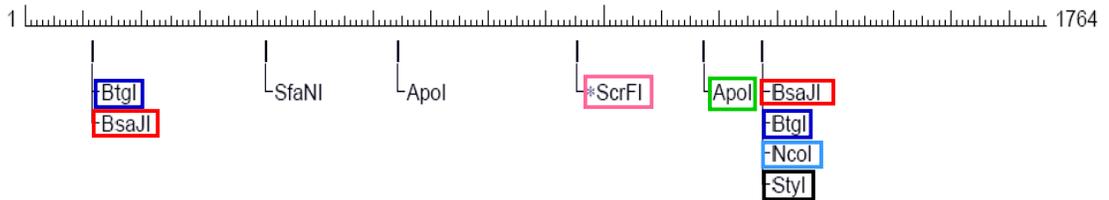
### Papa A



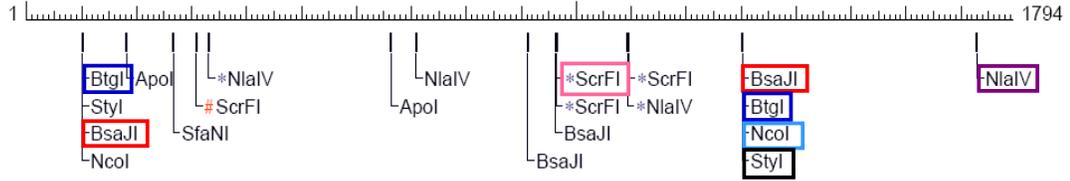
### Papa B



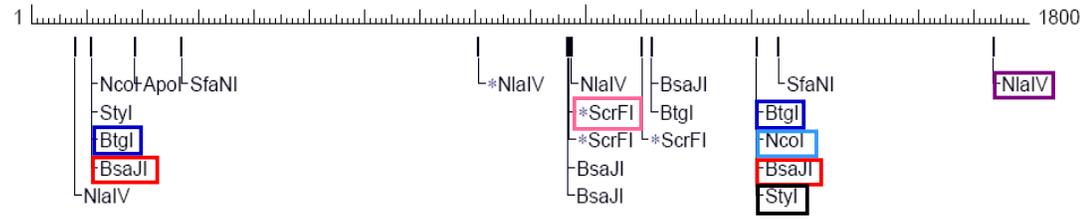
### Tomate P2



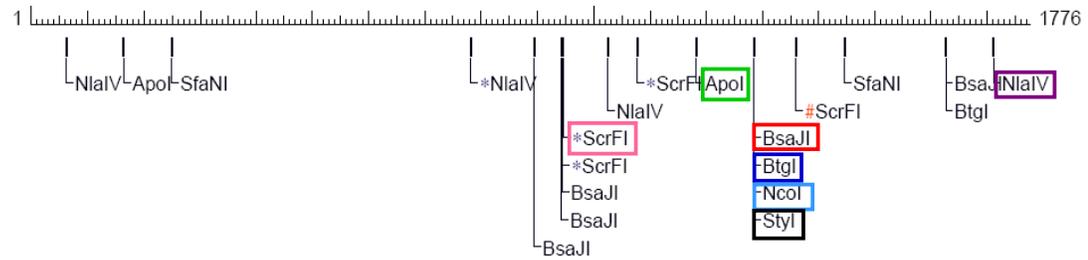
### Papa POT 32



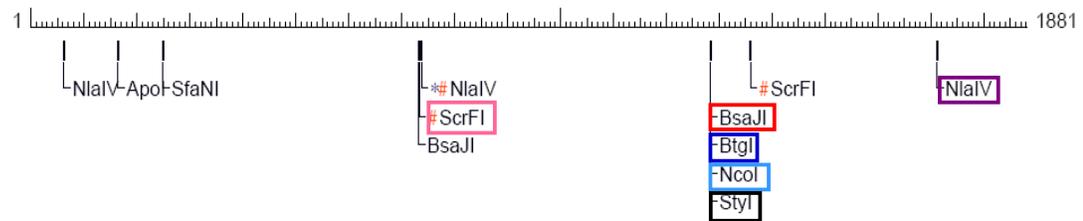
### Papa POT 33



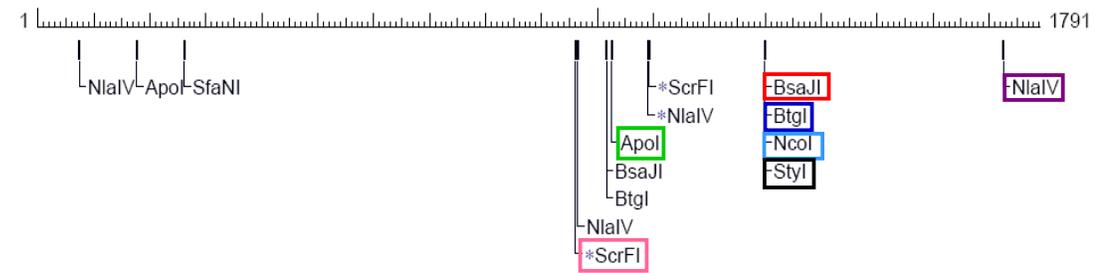
### Tomate D



### Tomate C



### Tomate B





**Tabla 13. Marcos de lectura identificados en la secuencia de lulo de 1430 pares de bases.**

Marco de lectura	Pos. Inicio	Pos. Finalización	Longitud	Aminoácidos
+3	9	1430	1422	474
+2	830	955	126	41
+1	268	516	249	82
+1	610	780	171	56
+1	1249	1359	111	36
-3	682	993	312	103
-2	971	1114	144	47
-2	1325	1429	105	34
-1	3	254	252	83
-1	297	422	126	41

1 LCKAHIKPDTEVTYSCPPIPEDIDSVPYKFPSTKLRIRPPAHAVDEEYIAK  
55 YQLATSRMRGLDKDPFDPLGFKQQANIHCAYCNGAYKVGKELQVHFSW  
104 LFFPFHRWYLYFYERILGSLINDPTFALPYWNWDHPKGMRIPPMFDVEGS  
154 SLYDEKRNQNHNRNGKIIDLGGFKETQTTQLQTMNNLTLMYRQMITNAP  
204 CPSLFFGNPYPLGTDPSPGMGTIENIPHNAVHVWVGDPRQPNGEDMGN  
252 FYSSGLEPAFFCHHSNVDRMWNEWKAIGGKRRDLADKDWLNTEFLFYD  
300 ENRKLFRVRVRDCLDSKMGFDYAPMPTPWRNFKPSIRKTTAGKLNSTSS  
349 IPPVSKVFPKLDLRPISFSINRPASSRTQAEKNEQEEMLTFFHKIQHNDRLY  
401 VRFDVFLNVDKTVNALELDQPEFAGSYTSLPHVHGDDKPHATSATLSLAIT  
452 ELLEDNNLEDEETIVVTLVPKVG

**Figura 11. Secuencia de aminoácidos deducida del fragmento identificado en lulo (474 a.a). Número de acceso en GeneBank: ACN78382.**

De las PPO con las cuales la proteína deducida de la secuencia identificada en lulo mostró similitud, un número considerable corresponde a especies de la familia Rosaceae y otras pertenecen a especies de las familias Salicaceae, Fabaceae, Vitaceae, Theaceae, Zygophyllaceae, Asteraceae, Juglandaceae, Scrophulariaceae y Phytolaccaceae. Vale la pena destacar que la comparación permitió encontrar similitudes con las PPO de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.), arroz (*Oryza sativa* L., *Oryza alta* Swallen, *Oryza rufipogon* Griffiths y *Oryza nivara* S.D. Sharma & Shastry) y trigo (*Triticum monococcum* L., *Triticum urartu* Thumanian ex Gandilyan, *Triticum turgidum* L. y *Triticum aestivum* L.) (He, et al., 2007), monocotiledóneas de la familia Bromeliaceae (en el primer caso) y

Poaceae (en los casos restantes) que guardan una considerable relación dado que las dos familias pertenecen al orden Poales.

La gran mayoría de las PPO que presentaron similitud con la proteína hipotética derivada de la secuencia nucleotídica identificada en lulo se localizan en tejidos fotosintéticos donde los plastidios están en forma de cloroplastos; las únicas dos excepciones son la aureusidin sintasa homóloga a PPO de *Antirrhinum majus* L. (Scrophulariaceae) la cual es expresada en pétalos y la proteína similar a PPO de berenjena (*Solanum melongena* L.), expresada en ovario y fruto.

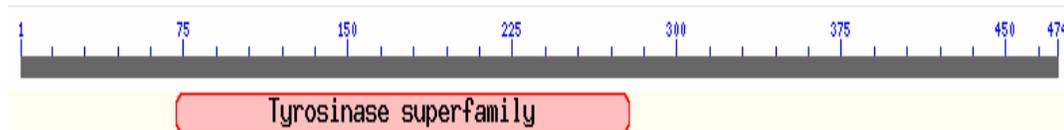
**Tabla 14. Valores de identidad de la proteína hipotética deducida del fragmento identificado en lulo respecto a las PPO de otras especies vegetales.**

<b>Especie</b>	<b>Proteína</b>	<b>Localización</b>	<b>Valor E</b>	<b>% Identidad</b>
<i>S. lycopersicum</i>	PPO - E	Cloroplasto	0.0	83
<i>S. tuberosum</i>	PPO - B	Cloroplasto	0.0	82
<i>S. tuberosum</i>	PPO - A		0.0	82
<i>N. tabacum</i>	PPO		0.0	81
<i>S. lycopersicum</i>	PPO - F	Cloroplasto	0.0	80
<i>S. tuberosum</i>	PPO POT 33		0.0	72
<i>S. lycopersicum</i>	PPO - B	Cloroplasto	0.0	71
<i>D. kaki</i>	PPO		0.0	83
<i>S. tuberosum</i>	PPO POT 32		0.0	68
<i>S. lycopersicum</i>	PPO - D	Cloroplasto	0.0	68
<i>S. lycopersicum</i>	PPO - A	Cloroplasto	0.0	68
<i>S. lycopersicum</i>	PPO - C	Cloroplasto	0.0	67
<i>I. batatas</i>	PPO - 1	Cloroplasto	1e-126	49
<i>C. nitidissima</i>	PPO		8e-126	47
<i>C. oblonga</i>	PPO		4e-125	48

#### **4.7. Conservación del dominio funcional de las Tirosinasas en la PPO hipotética de lulo**

Los dominios pueden ser definidos como unidades estructurales y/o funcionales distintas en una proteína. A menudo se observa que la región de una determinada cadena polipeptídica que muestra un plegamiento particular también ejecuta una función específica. Desde el punto de vista de la naturaleza de su secuencia, los dominios se definen como regiones altamente conservadas evolutivamente que adquieren mayor relevancia si son descritos como módulos móviles, es decir, presentes en diferentes familias de proteínas con arquitectura diversa (Marchler-Bauer, *et al.*, 2007).

Los dominios conservados contienen patrones de secuencia conservados o motivos, los cuales permiten su detección en la secuencia de polipéptidos. Sin embargo, la distinción entre dominio y motivo no es clara, especialmente en el caso de las unidades repetitivas cortas. Los motivos funcionales también están presentes fuera del alcance de los dominios conservados estructuralmente (Marchler-Bauer, *et al.*, 2007). El análisis realizado con la herramienta CDD reveló que la proteína deducida de la secuencia nucleotídica encontrada en lulo posee un dominio que es característico de las tirosinasas, familia de proteínas dentro de la cual se encuentran las polifenol oxidasas de las plantas y que está estrechamente relacionada con la familia de las hemocianinas presentes en moluscos y artrópodos. Las tirosinasas poseen dos iones de cobre (denominados CuA y CuB) cada uno de los cuales se encuentra asociado a la proteína gracias a la presencia de tres residuos de histidina (Jackman, *et al.*, 1991). La región de la PPO hipotética de lulo en la que se ubicaría el dominio común a todas las tirosinasas se extiende desde la Prolina 72 hasta la Isoleucina 278 (Figura 12). Como era de esperarse, los seis residuos de histidina involucrados en la coordinación con los dos iones de cobre se encuentran dentro del dominio conservado.



**Figura 12. Localización del dominio funcional de las tirosinasas en la PPO hipotética de lulo** (rectángulo rojo). Se extiende desde la Prolina 72 hasta la Isoleucina 278.

Halaouli y colaboradores (2006) sostienen que se puede asumir que el dominio central que comparten todos los miembros de la familia de las tirosinasas (tirosinasas, hemocianinas y polifenoloxidasas) presenta rasgos estructurales y funcionales similares considerando las siguientes características estudiadas en muchas de ellas: 1) valencia y cambio conformacional comparable durante el proceso de unión del oxígeno, 2) propiedades espectroscópicas comparables, y 3) similitud en la secuencia primaria. Los aminoácidos involucrados en la coordinación con los iones de cobre denominados  $H_{A1}$ ,  $H_{A2}$ ,  $H_{A3}$  (para el cobre A) y  $H_{B1}$ ,  $H_{B2}$ ,  $H_{B3}$  (para el cobre B) siguen la regla general  $H_{A1} - x(n) - H_{A2} - x(8) - H_{A3}$  y  $H_{B1} - x(3) - H_{B2} - x(n) - H_{B3}$  respectivamente, donde  $n$  es un número variable de aminoácidos (García-Borrón y Solano, 2002). Las histidinas que interactuarían con los dos iones de cobre identificadas por comparación de secuencias en la PPO deducida de la secuencia encontrada en lulo se ajustan a esta distribución. En el caso del sitio de cobre A, entre los residuos primero y segundo (His 82 e His 100) hay 17 aminoácidos y entre el segundo y el tercero (His 100 e His 109) hay 8. Para el caso del sitio de cobre B, entre los residuos primero y segundo (His 231 e His 235) hay 3 residuos mientras que entre el segundo y el tercero (His 235 e His 265) hay 29 (Figuras 13A y 13B).

García-Borrón y Solano (2002) describieron el sitio activo de las tirosinasas como una esfera hidrofílica delimitada por un haz de cuatro hélices alfa en el que se encuentran incluidas las seis histidinas. Esta esfera hidrofílica estaría localizada dentro de un caparazón hidrofóbico formado por aminoácidos aromáticos y constituido por residuos altamente

conservados. Las fuerzas de unión no covalentes que mantienen la estructura del sitio activo de la proteína son el resultado de interacciones entre varios residuos localizados en la proximidad del centro de dicobre. La estructura que ellos proponen es la siguiente:  $\Phi_{(HA1-7)}$ , Arg<sub>(HA3+1)</sub>,  $\Phi_{(HA3+3)}$ ,  $\Phi_{(HA3+7)}$ , Glu<sub>(HA3+8)</sub>, Asp<sub>(HB3-7)</sub>, Asp<sub>(HB3+4)</sub>,  $\Phi_{(HB3+7)}$  y Trp<sub>(HB3+10)</sub> ( $\Phi$  representa un residuo aromático). La comparación de la estructura primaria de las tirosinasas en hongos mostró la conservación de los siguientes aminoácidos:  $\Phi_{(HA1-7)}$  ( $\Phi$  corresponde a Phe o Tyr), Arg<sub>(HA3+1)</sub>,  $\Phi_{(HA3+3)}$  ( $\Phi$  corresponde a Tyr), Glu<sub>(HA3+8)</sub>, Asp<sub>(HB3-7)</sub>, Asp<sub>(HB3+4)</sub> y Trp<sub>(HB3+10)</sub>. La PPO hipotética de lulo conserva los siguientes residuos:  $\Phi_{(HA1-7)}$  ( $\Phi$  corresponde a Phe), Arg<sub>(HA3+1)</sub>,  $\Phi_{(HA3+3)}$  ( $\Phi$  corresponde a Tyr),  $\Phi_{(HA3+7)}$  ( $\Phi$  corresponde a Tyr), Glu<sub>(HA3+8)</sub>, Asp<sub>(HB3+4)</sub>,  $\Phi_{(HB3+7)}$  ( $\Phi$  corresponde a Trp) y Trp<sub>(HB3+10)</sub>. La posición Asp<sub>(HB3-7)</sub> conservada en las demás especies de solanáceas consideradas en la comparación se encuentra substituida por Glu<sub>(HB3-7)</sub> (cambio conservativo) (Figuras 14 A y 14 B). Respecto a las PPO en plantas, las tirosinasas de hongos no conservan las posiciones  $\Phi_{(HA3+7)}$  y  $\Phi_{(HB3+7)}$ .

Otro rasgo que distingue al centro de dicobre propio de las tirosinasas de hongos es la presencia de un residuo de cisteína ( $C_{(HA2-2)}$ ) altamente conservado, el cual está involucrado en una unión covalente tioéter con la segunda histidina conservada del sitio de cobre A. En las PPO de solanáceas esta cisteína (Cys 86) también está muy bien conservada. Klabunde y colaboradores (1998) sugieren la posibilidad que esta estructura (el puente tioéter) optimice el potencial redox del centro de dicobre para la oxidación hasta orto-difenol, teniendo en cuenta una rápida transferencia de electrones en el proceso.



**A**

	:* . * *** :***** . . : :*** *****:*
Tomate A	PDNPIGFKQQAN-IHCAYCNG----GYSIDGKVLQVHNSWLFFPFHRAWLYFYERILG
Tomate C	PDNPIGFKQQAN-IHCAYCNG----GYSIDGKVLQVHNSWLFFPFHRAWLYFYERILG
Tomate D	PLNPIGFKQQAN-IHCAYCNG----AYRIGGKELQVHNSWLFFPFHRAWLYFYESNAG
Papa POT 32	PLNPIGFKQQAN-IHCAYCNG----AYRIGGKELQVHNSWLFFPFHRAWLYFHERIVG
Tomate B	PLNPLGFKQQAN-IHCAYCNG----AYIIGGKELQVHNSWLFFPFHRAWLYFYERILG
Papa POT 33	PLNPLGFKQQAN-IHCAYCNG----AYIIGGKELQVHNSWLFFPFHRAWLYFYERILG
Papa A	SFDPLGFKQQAN-IHCAYCNG----AYKVGKELQVHFSWLFFPFHRAWLYFYERILG
Papa B	SFDPLGFKQQAN-IHCAYCNG----AYKVGKELQVHFSWLFFPFHRAWLYFYERILG
Tomate E	PFDPLGFKQQAN-IHCAYCNG----AYKVGKELQVHFSWLFFPFHRAWLYFYERILG
Tomate P2	PFDPLGFKQQAN-IHCAYCNG----AYKVGKELQVHFSWLFFPFHRAWLYFYERILG
Tomate F	PFDPLGFKQQAN-IHCAYCNG----AYKIGGKELQVHFSWLFFPFHRAWLYFYERILG
Tabaco	PFDPLGFKQQAN-IHCAYCNG----AYKIGGKELQVHFSWLFFPFHRAWLYFYERILG
Batata	--DPRNFYQQAL-VHCAYCNGG-YDQVNFDPQEIQVHNSWLFFPFHRAWLYFYERILG
Lulo	PFDPLGFKQQAN-IHCAYCNG----AYKVGKELQVHFSWLFFPFHRAWLYFYERILG

**B**

	*:***:* : *:.**.****** *: .**
Tomate A	MGNFYSAGLDP--LFYCHHSNVD RMWNEWKATGGK
Tomate C	MGNFYSAGLDP--LFYCHHSNVD RMWNEWKATGGK
Tomate D	YGHFYSAGLDP--VFFCHHSNVD RMWSEWKATGGK
Papa POT 32	MGHFYSAGLDP--VFFCHHSNVD RMWSEWKATGGK
Tomate B	MGNFYSAGLDP--VFYCHHGNVD RMWNEWKAIIGGK
Papa POT 33	MGNFYSAGLDP--VFYCHHGNVD RMWNEWKAIIGGK
Papa A	MGNFYSAGLDP--LFYCHHANVD RMWDEWKLIIGGK
Papa B	MGNFYSAGLDP--IFYCHHANVD RMWDEWKLIIGGK
Tomate E	MGNFYSAGLDP--IFYCHHANVD RMWNEWKLIIGGK
Tomate P2	MGNFYSAGLDP--IFYCHHANVD RMWNEWKLIIGGK
Tomate F	MGNFYSAGLDP--LFYCHHANVD RMWNEWKLIIGGK
Tabaco	MGNFYSAGLDP--LFYSHHANVD RMWSEWKALGGK
Batata	MGNFYSAGRDI--AFYCHHSNVD RMWTIWQQLAGK
Lulo	MGNFYSSGLEP--AFFCHHSNVD RMWNEWKAIIGGK

**Figura 14. Conservación de aminoácidos en la periferia del sitio activo de la PPO hipotética de lulo.** Las regiones cercanas tanto al sitio de cobre A como al B presentan aminoácidos conservados que siguen la regla de distribución establecida por García-Borrón y Solano (2002). A. Residuos conservados en la región cercana al sitio de cobre A. B. Residuos conservados en la región cercana al sitio de cobre B.

Todas las PPO poseen un péptido señal ubicado hacia el extremo N terminal, cuya función es transportar la proteína hacia el lumen del tilacoide. Estos péptidos señal en las PPO de tomate presentan tamaños que oscilan entre 83 y 87 aminoácidos. El alineamiento de las PPO de tomate con la proteína derivada de la secuencia de lulo hecho con el programa Clustal W permitió determinar que ésta última no presenta la secuencia de aminoácidos correspondiente al péptido señal ni los 10 primeros residuos correspondientes a la parte N-terminal de la proteína madura. Esto era previsible puesto que el iniciador directo utilizado para amplificar el fragmento 1 anilló a 280 pares de bases del sitio de inicio de la secuencia codificante.

Las regiones de la proteína que interactúan con los átomos de cobre muestran un alto grado de conservación. El alineamiento de las PPO de tomate, papa, tabaco y batata con la proteína hipotética derivada del fragmento encontrado en lulo permitió identificar por similitud de secuencias dichos sitios. El sitio de cobre A estaría ubicado entre la histidina 100 y el triptofano 136. En la posición 101 la proteína hipotética de lulo posee una fenilalanina que también se encuentra en las proteínas PPO-E y PPO-F de tomate, PPO-A y PPO-B de papa y PPO de tabaco mientras que en las proteínas PPO-A, PPO-B, PPO-C, PPO-D de tomate y las PPO POT32 y POT33 de papa hay una asparagina (substitución no conservativa). En la posición 116 todas las PPO comparten una tirosina excepto la PPO POT32 de papa, que tiene una histidina (substitución conservativa). En las posiciones 118, 119 y 120 en donde todas muestran arginina, isoleucina y leucina respectivamente, la PPO-D de tomate presenta serina, asparagina y alanina mientras que la PPO POT32 conserva las posiciones 118 y 119 pero en la posición 120 tiene una valina (substitución no conservativa). En la posición 122 la mayoría comparte la presencia de una serina mientras que las PPO POT32 y POT33 de papa y las PPO-B y PPO-D de tomate presentan una lisina (substitución conservativa). En la posición 123 todas muestran una lisina

excepto la PPO POT32 de papa que posee una fenilalanina (substitución conservativa). En la posición 125 la PPO de lulo tiene una asparagina que en las PPO A, B, C y D en tomate y en POT32 y POT33 de papa ha sido substituida por aspartato (substitución conservativa). En la posición 130 la alanina ha sido substituida por glicina en la PPO de tabaco y en las PPO A y C de tomate (substitución conservativa). La tirosina de la posición 133 ha sido reemplazada por fenilalanina en las PPO A y C de tomate (substitución conservativa). Esta comparación muestra que el sitio de cobre A en la PPO hipotética de lulo (deducido por similitud de secuencias) es más parecido al de las PPO E y F de tomate y PPO A y B de papa que a las demás proteínas consideradas en la comparación.

En la PPO hipotética de lulo el sitio de cobre B estaría localizado entre la histidina 231 y el aspartato 284. El alineamiento muestra que este es mucho menos conservado que el sitio de cobre A. En la posición 232 la PPO de lulo tiene una asparagina mientras que en las demás hay treonina, serina, glicina o isoleucina. En la posición 233 todas las PPO incluidas en la comparación presentan una prolina excepto la PPO de lulo que posee una alanina (substitución conservativa). El aspartato 240 se conserva en la PPO de lulo, las PPO A y B de papa y las PPO E y F de tomate, mientras que en la PPO de tabaco hay una serina y en las demás hay una treonina. Los residuos en las posiciones 241 a 249 son conservados en la PPO de lulo, las PPO A y B de papa y las PPO E y F de tomate. La asparagina 251 se conserva en todas las PPO excepto en la PPO-D de tomate y la PPO POT 32 de papa, en las que hay una histidina. La alanina 255 conservada en todas las PPO se ha substituido por una serina en la proteína de lulo. Con el aspartato 258 ocurre algo muy similar, en la proteína de lulo se observa una substitución por glutamato. La tirosina 262 ha sido substituida por fenilalanina en la PPO de lulo, PPO-D de tomate y en la PPO POT32 de papa. La arginina 283 ha sido substituida por treonina en las PPO A, C y D de tomate y en la PPO POT32 de papa.

Tal como en el caso del sitio de unión a cobre A, el sitio de unión a cobre B de la proteína hipotética de lulo es más parecido al observado en las PPO E y F de tomate y en las PPO A y B de papa.

Los estudios que permitieron determinar la estructura tridimensional de la PPO de batata revelaron que cada uno de los dos sitios de unión a cobre está coordinado por tres residuos de histidina localizados en las cuatro hélices que conforman esa región de la proteína. El sitio de cobre A está coordinado con His 88, His 109 e His 118. El sitio de cobre B está coordinado con His 240, His 244 e His 274 (Klabunde, *et al.*, 1998). El alineamiento de las PPO pertenecientes a especies de la familia Solanaceae (incluida la de lulo) mostró que las seis histidinas antes mencionadas se encuentran perfectamente conservadas en todas ellas. Para el caso de la PPO de lulo, el átomo de cobre del sitio A estaría coordinado con His 82, His 100 e His 109 mientras que el átomo de cobre del sitio B estaría coordinado con His 231, His 235 e His 265. En la PPO de batata existe una unión covalente entre el carbono épsilon de la His 109 y el átomo de azufre perteneciente a la Cys 92.

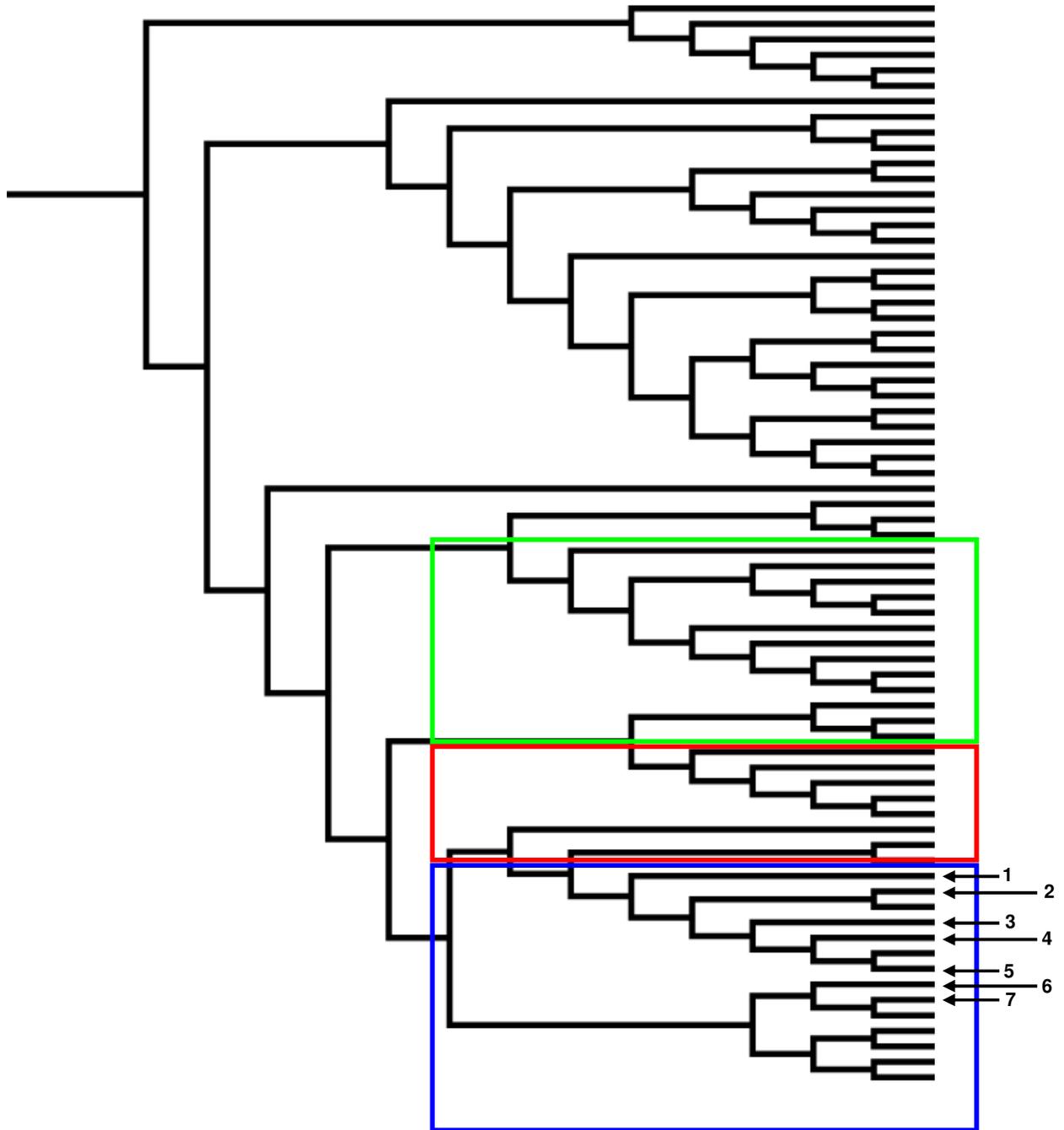
Los análisis cristalográficos de esta proteína revelaron que dicho enlace covalente confiere restricciones estructurales adicionales a la región de la molécula que conforma el centro de cobre A (Klabunde, *et al.*, 1998). Al igual que las histidinas antes referidas, esta cisteína se encuentra perfectamente conservada en todas las PPO de solanáceas; en la PPO de lulo ocupa la posición 86 (Cys 86). La diferencia en la posición de las histidinas que intervienen en la coordinación con los átomos de cobre se puede explicar en función de la diferencia en la longitud de estas dos proteínas; mientras que la PPO de batata utilizada para los estudios de espectroscopía realizados por Eicken y colaboradores (1998) tiene 496 aminoácidos, la PPO deducida del fragmento de DNA de lulo tiene 474 aminoácidos.

Tal como ocurre en las polifenol oxidasas previamente estudiadas, las regiones de la PPO hipotética de lulo en las que se acoplarían los dos átomos de cobre son asimétricas en términos de constitución de aminoácidos. De manera contrastante, en las hemocianinas ocurre lo contrario; los dos iones de cobre se coordinan en regiones que presentan secuencias idénticas (Eicken, *et al.*, 1998).

#### **4.8. Análisis filogenético de la PPO hipotética deducida de la secuencia identificada en lulo**

Con el propósito de determinar el nivel de cercanía filogenética de la PPO hipotética deducida de la secuencia encontrada en lulo con otras PPOs ya estudiadas, las secuencias de aminoácidos de las PPOs reportadas en las bases de datos fueron utilizadas para construir un cladograma empleando el programa Mesquite (Figura 15).

El análisis de relación filogenética produjo un cladograma en el que se observan dos grandes grupos: en el primero se encuentran las PPOs de monocotiledóneas y en el segundo las PPOs de dicotiledóneas. En este último se identificó un grupo en el que están reunidas las PPOs pertenecientes a las especies de la familia Solanaceae (papa, tomate, tabaco y berenjena) incluyendo a la PPO deducida de la secuencia nucleotídica de lulo. Tal como lo habían mostrado los análisis de similitud de nucleótidos y de aminoácidos, la PPO hipotética de lulo es muy cercana a las PPO E y F de tomate, a las PPO A y B de papa y a la PPO de tabaco. En este clado se encuentra incluida la PPO perteneciente a caqui (*D. kaki* L.), especie perteneciente a la familia Ebenaceae, del orden Ericales.



**Figura 15. Relación filogenética entre las PPO de diversas especies vegetales.** Se presenta la sección del cladograma correspondiente a las familias de dicotiledóneas. Cuadro verde: Clado de las fabáceas; Cuadro rojo: Clado de las convolvuláceas; Cuadro azul: Clado de las solanáceas; 1.Lulo; 2.Tabaco; 3.Tomate (F); 4.Tomate (E); 5.Caqui; 6. Papa (A); 7. Papa (B).

Inmediatamente en seguida del grupo descrito anteriormente se encuentra el conjunto de las PPO de batata, especie perteneciente a la familia Convolvulaceae. La cercanía de estos dos grupos se puede explicar en función de la estrecha relación existente entre solanáceas y convolvuláceas; las dos familias pertenecen al orden de las solanales. Enseguida se sitúan las PPOs pertenecientes a las especies de la familia Fabaceae tales como trébol, alfalfa y haba.

Aunque en el cladograma se observa también un agrupamiento correspondiente a las PPOs de rosáceas, y a pesar de la cercanía existente entre rosáceas y fabáceas, dado que hacen parte de los órdenes Rosales y Fabales respectivamente que en la actualidad son considerados grupos “hermanos” que surgieron tras la diversificación de la subclase Rosidae, dichos clados no son consecutivos; entre ellos se ubicó el grupo de las PPOs de musgos como *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp., de la familia Funariaceae. El cladograma sugiere que las PPO de estos briófitos serían más cercanas a las PPOs de algunas familias de dicotiledóneas que a las de monocotiledóneas. Finalmente se observa al grupo de las monocotiledóneas, que se hallan representadas por especies de la familia Poaceae (gramíneas).

## 5. CONCLUSIONES

Los oligonucleótidos para PCR diseñados en este estudio permitieron amplificar de manera específica fragmentos de una secuencia candidata a gen *ppo* de lulo. Los análisis realizados a estos iniciadores sugieren que podrían ser utilizados para amplificar fragmentos de genes *ppo* en otras especies de dicotiledóneas.

El contenido de guaninas-citosinas, los significativos niveles de similitud con los genes *ppo* de papa, tomate y tabaco y la notable conservación de los sitios de corte para las enzimas de restricción que comparte con los genes antes mencionados son evidencia de que el fragmento de DNA analizado pertenece a la familia de genes *ppo*.

Los valores de similitud considerablemente elevados de la PPO hipotética deducida de la secuencia nucleotídica encontrada en lulo con las PPO de tomate, papa y tabaco, la presencia de el dominio funcional característico de las tirosinasas y la significativa conservación de las regiones de la proteína hipotética en la que se encuentran los aminoácidos clave para la conformación de los sitios de unión a cobre son evidencia de que el fragmento aislado y caracterizado puede codificar para una PPO.

El análisis de relación filogenética ubicó a la PPO hipotética de lulo en el mismo grupo en el que se encuentran las PPOs de las solanáceas, muy cerca de las PPO E y F de tomate, A y B de papa y PPO de tabaco, hecho que concuerda con los análisis de similitud de nucleótidos y de proteínas antes mencionados.

Todas las anteriores evidencias, derivadas de la fase experimental y del análisis de resultados de este trabajo permiten postular al fragmento de 1430 pb aquí reportado como candidato a gen *ppo* en lulo, el cual podría ser de gran utilidad en estudios de silenciamiento de la expresión de las PPO en los que se pretenda emplear la técnica de RNA antisentido.

## 6. RECOMENDACIONES

Para continuar con el trabajo de búsqueda y caracterización de genes *ppo* en lulo y otras especies potencialmente importantes para el país y utilizarlos como materia prima para la implementación de estrategias que permitan el silenciamiento de la expresión de las polifenol oxidadasas, se propone:

Aislar y caracterizar el extremo 5' del candidato a gen *ppo* de lulo para completar toda la secuencia codificante y además buscar otros genes *ppo* en la especie. Hay dos aproximaciones experimentales que permitirían lograr tal objetivo: la primera consiste en construir una librería genómica de lulo y someterla a *screening* utilizando como sonda un segmento de la secuencia de 1430 pb caracterizada en este trabajo para posteriormente aislar los clones portadores de los genes *ppo* y determinar su secuencia. La segunda consiste en aislar el RNAm a partir de hojas de lulo jóvenes (en las que se expresan mayoritariamente los genes *ppo*) y utilizarlo como molde en la producción de moléculas de cDNA que puedan ser secuenciadas para obtener la información de toda la región codificante de los genes *ppo*.

Expresar en bacterias o levaduras sólo la región del fragmento de 1430 pb reportado en este estudio que codifica para el dominio funcional de la PPO, purificar el fragmento de proteína y evaluar su actividad sobre sustratos específicos con el fin de confirmar de manera definitiva su función como polifenol oxidasa.

Utilizar un segmento de éste candidato a gen *ppo* para clonarlo en un vector que permita insertarlo en el genoma de plantas de lulo y evaluar su efecto en el silenciamiento de los genes *ppo* de la planta.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Arias, F., Tamara, L. y Arbeláez, F. 2006. Apuesta exportadora agropecuaria 2006-2020. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, República de Colombia. 119 p.
- Bachem, C., Speckmann, G., van der Linde, P., Verheggen, F., Hunt, M.D., Steffens, J.C. and Zabeau, M. 1994. Antisense expression of polyphenol oxidase genes inhibits enzymatic browning in potato tubers. *Biotechnology* 12:1101-1105.
- Baulcombe, D.C. 1996. Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell* 8: 1833-1844.
- Bonierbale, M.W., Plaisted, R.L., and Tanksley, S.D. 1988. RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. *Genetics* 120: 1095-1103.
- Boss, P.K., Gardner, R.C., Janssen, B.J. and Ross, G.S. 1995. An apple polyphenol oxidase cDNA is up-regulated in wounded tissues. *Plant Mol. Biol.* 27: 429-433.
- Carels, N., Hatey, P., Jabbari, K., and Bernardi, G. 1998. Compositional properties of homologous coding sequences from plants. *J. Mol. Evol.* 46: 45-53.
- Cary, J.W., Lax, A.R. and Flurkey, W.H. 1992. Cloning and characterization of cDNAs coding for *Vicia faba* polyphenol oxidase. *Plant Mol. Biol.* 20: 245-253.
- Chang, C., Zhang, H., Xu, J., You, M., Li, B. and Liu, G. 2007. Variation in two PPO genes associated with polyphenol oxidase activity in seeds of common wheat. *Euphytica* 154: 181-193.
- Chen, W. and Kuo, T. 1993. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial DNA. *Nucl. Acids Res.* 21:2260.
- Chevalier, T., de Rigal, D., Mbeguie-A-Mbeguie, D., Gaillard, F., Richard-Forget, F. and Fils-Lycaon, B.R. 1999. Molecular cloning and characterization of apricot fruit polyphenol oxidase. *Plant Physiol.* 119:1261-1270.

- Cho, M.H., Moinuddin, S.G., Helms, G.L., Hishiyama, S., Eichinger, D., Davin, L.B. and Lewis, N.G. 2003. (+)-Larreatricin hydroxylase, an enantio-specific polyphenol oxidase from the creosote bush (*Larrea tridentata*). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100:10641-10646.
- Claus, H., and Decker, H. 2006. Bacterial tyrosinases. Syst. Appl. Microbiol. 29: 3 -14.
- Coetzer, C., Corsini, D., Love, S., Pavsek, J. and Tumer, N. 2001. Control of enzymatic browning in potato (*Solanum tuberosum* L.) by sense and antisense RNA from tomato polyphenol oxidase. J. Agric. Food Chem. 49: 652-657.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y. and Hsu, L. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 69: 2110-2114.
- Corporación Colombia Internacional (CCI). 2006. Perfil del producto, inteligencia de mercados: lulo. En: <http://www.cci.org.co>, 15 p.; consulta: julio de 2009.
- Cuff, M.E., Miller, K.I., van Holde, K.E. and Hendrickson, W.A. 1998. Crystal structure of a functional unit from octopus hemocyanin. J. Mol. Biol. 278: 855-870.
- Dagert, M. and Ehrlich, S.D. 1979. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. Gene 6: 23-28.
- Decker, H., Schweikardt, T., Nillius, D., Salzbrunn, U., Jaenicke, E., and Tuczek, F. 2007. Similar enzyme activation and catalysis in hemocyanins and tyrosinases. Gene 398: 183-191.
- Demeke, T. and Morris, C.F. 2002. Molecular characterization of wheat polyphenol oxidase (PPO). Theor. Appl. Genet. 104: 813-818.
- Dervall, B.J. 1961. Phenolase and pectic enzyme activity in the chocolate spot disease of beans. Nature 189: 311.
- Doganlar, S., Frary, A., Daunay, M.C., Lester, R.N., and Tanksley, S.D. 2002. A comparative genetic linkage map of eggplant (*Solanum melongena*) and its implications for genome evolution in the solanaceae. Genetics 161: 1697-1711.
- Doyle, M. and Doyle, A. 1990. Isolation of DNA from small amounts of plant tissues. BRL Focus 12:13 -15.

- Dry, I.B. and Robinson, S.P. 1994. Molecular cloning and characterization of grape berry polyphenol oxidase. *Plant Mol. Biol.* 26:495-502.
- Eicken, C., Zippel, F., Buldt-Karentzopoulos, K. and Krebs, B. 1998. Biochemical and spectroscopic characterization of catechol oxidase from sweet potatoes (*Ipomoea batatas*) containing a type-3 dicopper center. *FEBS Lett.* 436: 293-299.
- el-Shimi, N.M. 1993. Control of enzymatic browning in apple slices by using ascorbic acid under different conditions. *Plant Foods Hum. Nutr.* 43: 71-76.
- Espin, J.C., Tudela J. and García-Canovas, F. 1998. 4-hydroxyanisole: the most suitable monophenolic substrate for determining spectrophotometrically the monophenolase activity of polyphenol oxidase from fruits and vegetables. *Anal. Biochem.* 259: 118-126.
- Fuerst, E.P., Anderson, J.V., and Morris, C.F. 2006. Delineating the role of Polyphenol Oxidase in the darkening of alkaline wheat noodles. *J. Agric. Food Chem.* 54: 2378-2384.
- Galvis, J.A. y Herrera, A. 1999. El lulo (*Solanum quitoense*). Manejo postcosecha. Convenio SENA – Universidad Nacional – Instituto Colombiano de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Santafé de Bogotá, Colombia. 59 p.
- Gandía-Herrero, F., Jiménez-Atiéndzar, M., Cabanes, J., Escribano, J., and García-Carmona, F. 2009. Fluorescence detection of tyrosinase activity on dopamine-beta-xanthin purified from *Portulaca oleracea* (common purslane) flowers. *J. Agric. Food Chem.* 57: 2523-2528.
- García-Borrón, J.C. and Solano, F. 2002. Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res.* 15: 162-173.
- Gielens, C., De Geest, N., Xin, X.Q., Devreese, B., Van Beeumen, J., and Preaux, G. 1997. Evidence for a cysteine-histidine thioether bridge in functional units of molluscan haemocyanins and location of the disulfide bridges in functional units d and g of the betaC-haemocyanin of *Helix pomatia*. *Eur. J. Biochem.* 248:879-888.
- Golbeck, J.H. and Cammarata, K.V. 1981. Spinach thylakoid polyphenol oxidase. Isolation, activation and properties of the native chloroplast enzyme. *Plant Physiol.* 67: 977-984.

- Goldman, M.H., Seurinck, J., Marins, M., Goldman, G.H. and Mariani, C. 1998. A tobacco flower-specific gene encodes a polyphenol oxidase. *Plant Mol. Biol.* 36: 479-485.
- Gómez, L.E., Miranda, D., Barragán, E., Rivera, J.J., Ramírez, L.E., Caicedo, G., Sánchez, M.Y., Mendoza, L.A., y Prada, R. 1999. Manejo integrado del cultivo del lulo. Serie modular para la capacitación en tecnologías agropecuarias. Corpoica-Plante-Sena. Ibagué, Colombia. 96 p.
- Gray, D.C. and Hughes, H.C. 1978. Tuber quality In: *The potato crop: The scientific bases for improvement*. Harris, P.M. (Ed.) Chapman and Hall, London, England. pp. 504-539.
- Halaouli, S., Asther, M., Sigoillot, J.C., Hamdi, M and Lomascolo, A. 2006. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. *J. Appl. Microbiol.* 100: 219-232.
- Haruta, M., Murata, M., Hiraide, A., Kadokura, H., Yamasaki, M., Sakuta, M., Shimizu, S. and Homma, S. 1998. Cloning genomic DNA encoding apple polyphenol oxidase and comparison of the gene product in *Escherichia coli* and in apple. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 358-362.
- Haruta, M., Murata, M., Kadokura, H. and Homma, S. 1999. Immunological and molecular comparison of polyphenol oxidase in Rosaceae fruit trees. *Phytochemistry* 50: 1021-1025.
- He, X.Y., He, Z.H., Zhang, L.P., Sun, D.J., Morris, C.F., Fuerst, E.P. and Xia, X.C. (2007). Allelic variation of polyphenol oxidase (PPO) genes located on chromosomes 2A and 2D and development of functional markers for the PPO genes in common wheat. *Theor. Appl. Genet.* 115 1:47-58.
- Heiser, C.B. 1972. The relationships of the naranjilla, *Solanum quitoense*. *Biotropica* 4: 77-84.
- Heiser, C.B. 1985. Ethnobotany of the Naranjilla (*Solanum quitoense*) and its relatives. *Econ. Bot.* 39: 4-11.
- Hind, G., Marshak, D.R. and Coughlan, S.J. 1995. Spinach thylakoid polyphenol oxidase: cloning, characterization and relation to a putative protein kinase. *Biochemistry* 34: 8157-8164.

- Hunt, M.D., Eannetta, N.T., Yu, H., Newman, S.M. and Steffens, J.C. 1993. cDNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase. *Plant Mol. Biol.* 21: 59-68.
- Hutcheson, S.W., Buchanan, B.B. and Montalbini, P. 1980. Polyphenol oxidation by *Vicia faba* chloroplast membranes. Studies on the latent membrane-bound polyphenol oxidase and on the mechanism of photochemical polyphenol oxidation. *Plant Physiol.* 66: 1150-1154.
- Ito, N., Phillips, S.E., Stevens, C., Ogel, Z.B., McPherson, M.J., Keen, J.N., Yadav, K.D., and Knowles, P.F. 1991. Novel thioether bond revealed by a 1.7 Å crystal structure of galactose oxidase. *Nature* 350: 87-90.
- Jackman, M.P., Hajnal, A., Lerch, K. 1991. Albino mutants of *Streptomyces glaucescens* tyrosinase. *Biochem J.* 274: 707-13.
- Jaenicke, E., y Decker H. 2004. Functional changes in the family of type 3 copper proteins during evolution. *Chembiochem* 5: 163-169.
- Jeong, S.H., Ryu, Y.B., Curtis-Long, M.J., Ryu, H.W., Baek, Y.S., Kang, J.E., Lee, W.S., and Park, K.H. 2009. Tyrosinase inhibitory polyphenols from roots of *Morus ihou*. *J. Agric. Food Chem.* 57:1195-1203.
- Jukanti, A.K., Bruckner, P.L., and Fischer, A.M. 2004. Evaluation of wheat polyphenol oxidase genes. *Cereal Chem.* 81: 481-485.
- Keegstra, K., Olsen, L.J., and Theg, S.M. 1989. Chloroplastic precursors and their transport across the envelop membranes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 471-501.
- Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J.C. and Krebs, B. 1998. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat. Struct. Biol.* 5: 1084-1090.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., López, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., and Higgins, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Lerch, K. 1982. Primary structure of tyrosinase from *Neurospora crassa*. Complete amino acid sequence and chemical structure of a tripeptide containing an unusual thioether. *J. Biol. Chem.* 257: 6414-6419.

- Lerch, K. 1983. *Neurospora* tyrosinase: structural, spectroscopic and catalytic properties. *Mol. Cell. Biochem.* 52: 125-138.
- Li, L. and Steffens, J.C. 2002. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta* 215: 239-247.
- Lieberei, R., Biehl, B. and Voigt, J. 1981. Serological studies on phenolase from spinach leaves. *Phytochemistry* 20: 2109-2116.
- Liu, J., Goh, C., Loh, C., Liu, P. and Pua, E. 1998. A method for isolation of total RNA from fruit tissues of banana. *Plant Mol. Biol. Rep.* 16: 1-6.
- Livingston, K.D., Lackney, V.K., Blauth, J.R, van Wijk, R., and Jahn, M.K. 1999. Genome mapping in capsicum and the evolution of genome structure in the solanaceae. *Genetics* 152: 1183-1202.
- Malkin, B.D., Thickman, K.R., Markworth, C. J., Wilcox, D. E. and Kull, F. J. 2001. Inhibition of potato polyphenol oxidase by anions and activity in various carboxylate buffers (pH= 4.8) at constant ionic strength. *J. Enzyme Inhib.* 16: 135-145.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J.B., Derbyshire, M.K., DeWeese-Scott, C., González, N.R., Gwadz, M., Hao, L., He, S., Hurwitz, D.I., Jackson, J.D., Ke, Z., Krylov, D., Lanczycki, C.J., Liebert, C.A., Liu, C., Lu, F., Lu, S., Marchler, G.H., Mullokandov, M., Song, J.S., Thanki, N., Yamashita, R.A., Yin, J.J., Zhang, D., Bryant, S.H. 2007. *CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis*. *Nucl. Acids Res.* 35: D237-40.
- Mari, S., Marques, L., Breton, F., Karamanos, Y. and Macheix, J.J. 1998. Unfolding and refolding of active apple polyphenol oxidase. *Phytochemistry* 49: 1213-1217.
- Martínez, M.V. and Whitaker, J.R. 1995. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci. Technol.* 6: 195-200.
- Marusek, C.M., Trobaugh, N.M., Flurkey, W.H., and Inlow, J.K. 2006. Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *J. Inorg. Biochem.* 100: 108-123.
- Matoba, Y., Kumagai, T., Yamamoto, A., Yoshitsu, H., Sugiyama, M. 2006. Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. *J. Biol. Chem.* 281: 8981-8990.

- Mayer, A.M. and Harel, E. 1979. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* 18: 193-215.
- McEvily, A.J., Iyengar, R., and Otwell, W.S. 1992. Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32: 253-273.
- Meneses, H.A. 1988. Ecofenología, propagación y manejo del cultivo del lulo; situación actual. Secretaría de Agricultura de Antioquia. Medellín, Colombia. 75 p.
- Miller, K.I., Cuff, M.E., Lang, W.F., Varga-Weisz, P., Field, K.G., and van Holde, K.E. 1998. Sequence of the *Octopus dofleini* hemocyanin subunit: structural and evolutionary implications. *J. Mol. Biol.* 278: 827-842.
- Miranda, D., Peláez, L., Figueroa, L. y Parra, M.E. 1999. Procesos productivos agropecuarios del departamento del Huila: estructura y función. Convenio Corpoica-Sena. Ibagué, Colombia. 121 p.
- Murata, M., Kurokami, C. and Homma, S. 1992. Purification and some properties of chlorogenic acid oxidase from apple (*Malus pumila*). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56: 1705-1710.
- Murata, M., Kurokami, C., Homma, S. and Matsushashi, C. 1993. Immunochemical and immunohistochemical study of apple chlorogenic acid oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 41: 1385-1390.
- Murata, M., Tsurutani, M., Hagiwara, S. and Homma, S. 1997. Subcellular location of polyphenol oxidase in apple. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61: 1495-1499.
- Murata, M., Haruta, M., Murai, N., Tanikawa, N., Nishimura, M., Homma, S. and Itoh, Y. 2000. Transgenic apple (*Malus x domestica*) shoot showing low browning potential. *J. Agric. Food. Chem.* 48: 5243-5248.
- Nagasawa, M., Sugiyama, A., Mori, H., Shiratake, K. and Yamaki, S. 2001. Analysis of genes preferentially expressed in early stage of pollinated and parthenocarpic fruit in eggplant. *J. Plant Physiol.* 158: 235-240.
- Newman, S.M., Eannetta, N.T., Yu, H., Prince, J.P., de Vicente, M.C., Tanksley, S.D. and Steffens, J.C. 1993. Organisation of the tomato polyphenol oxidase gene family. *Plant Mol. Biol.* 21: 1035-1051.

- Partington, J.C., Smith, C. and Bolwell, G.P. 1999. Changes in the location of polyphenol oxidase in potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber during cell death in response to impact injury: comparison with wound tissue. *Planta* 207: 449-460.
- Potter, D., Eriksson, T., Evans, R.C., Oh, S., Smedmark, J.E., Morgan, D.R., Kerr, M., Robertson, K.R., Arsenault, M., Dickinson, T.A. and Campbell, C.S. 2007. Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant Syst. Evol.* 266: 5-43.
- Reed, K.C and Mann, D.A. 1985. Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nucl. Acids Res.* 13: 7207-7221.
- Rensink, W.A., Lee, Y., Liu, J., Iobst, S., Ouyang, S., and Buell, R. 2005. Comparative analyses of six solanaceous transcriptomes reveal a high degree of sequence conservation and species-specific transcripts. *BMC Genomics* 6: 124-130.
- Rojas-Graü, M.A., Soliva-Fortuny, R., and Niartrín-Belloso, O. 2008. Effect of natural antibrowning agents on color and related enzymes in fresh-cut Fuji apples as an alternative to the use of ascorbic acid. *J. Food Sci.* 78:S267-272.
- Rychlik, W., and Rhoads, R.E. 1989. A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and *in vitro* amplification of DNA. *Nucl. Acids Res.* 17: 8543 – 8551.
- Rychlik, W., Spencer, W.J., and Rhoads, R.E. 1990. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucl. Acids Res.* 18: 6409 – 6412.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Vol. 1, 2, 3. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 5463 – 5467.
- Shahar, T., Hennig, N., Gutfinger, T., Hareven, D. and Lifschitz, E. 1992. The tomato 66.3 kD polyphenol oxidase gene: molecular identification and developmental expression. *Plant Cell* 4: 135-147.
- Selinheimo, E., NiEidhin, D., Steffensen, C., Nielsen, J., Lomascolo, A., Halaouli, S., Record, E., O'Beirne, D., Buchert, J., and Kruus, K. 2007. Comparison of the characteristics of fungal and plant tyrosinases. *J. Biotechnol.* 130: 471-480.

- Solomon, E.I., Sundaram, U.M. and Machonkin, T.E. 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* 96: 2563-2605.
- Soltis, D. E., Bell, C. D., Kim, S. and Soltis, P. S. 2008. Origin and early evolution of angiosperms. *Ann. New York Acad. Sci.* 1133: 3-25.
- Sommer, A., Ne'eman, E., Steffens, J.C., Mayer, A.M. and Harel, E. 1994. Import, targeting and processing of a plant polyphenol oxidase. *Plant Physiol.* 105: 1301-1311.
- Sullivan, M.L., Hatfield, R.D., Thoma, S.L. and Samac, D.A. 2004. Cloning and characterization of red clover polyphenol oxidase cDNAs and expression of active protein in *Escherichia coli* and transgenic alfalfa. *Plant Physiol.* 136:3234-3244.
- Tanksley, S.D., Ganai, M.W., Prince, J.P., de Vicente, M.C., Bonierbale, M.W., Broun, P., Fulton, T.M., Giovannoni, J.J., Grandillo, S., and Martin, G.B. 1992. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132: 1141-1160.
- Thipyapong, P., Joel, M.D. and Steffens, J.C. 1997a. Differential expression and turnover of the tomato polyphenol oxidase gene family during vegetative and reproductive development. *Plant Physiol.* 113: 707-718.
- Thipyapong, P. and Steffens, J.C. 1997b. Tomato polyphenol oxidase : differential response of the polyphenol oxidase F promoter to injuries and wound signals. *Plant Physiol.* 115: 409-418.
- Thipyapong, P., Stout, M.J., and Attajarusit, J. 2007. Functional analysis of polyphenol oxidase by antisense/sense technology. *Molecules* 12:1569-1595.
- Thygesen, P.W., Dry, I.A. and Robinson, S.P. 1995. Polyphenol Oxidase in potato. A multigene family that exhibits differential expression patterns. *Plant Physiol.* 109: 525-531.
- Timbo, B., Koehler, K.M., Wolyniak, C., and Klontz, K.C. 2004. Sulfites: a food and drug administration review of recalls and reported adverse events. *J. Food Prot.* 67: 1806-1811.

- Torres, A. 2002. Inteligencia de mercados para lulo, mora y uchuva. pp. 326-330. En: Giraldo, M.J. y J.P. Higuera (eds.). Memorias IV Seminario de frutales de clima frío moderado. Corpoica. Universidad Pontificia Bolivariana, Centro de Desarrollo Tecnológico de Frutales, Medellín.
- Vaughn, K.C. and Duke, S.O. 1981. Tentoxin-induced loss of plastidic polyphenol oxidase. *Physiol. Plant.* 53: 421-428.
- Vaughn, K.C. and Duke, S.O. 1984. Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiol. Plant.* 60: 106-112.
- Vaughn, K.C., Lax, A.R. and Duke, S.O. 1988. Polyphenol oxidase: The chloroplast oxidase with no established function. *Physiol. Plant.* 72: 659-665.
- Vincze, T., Posfai, J., Roberts, R.J. 2003. NEBcutter. A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucl. Acids Res.* 31: 3688 – 3691.
- Wang, J. and Constabel, C.P. 2004. Three polyphenol oxidases from hybrid poplar are differentially expressed during development and after wounding and elicitor treatment. *Physiol. Plantarum* 122: 344-353.
- Whalen, M.D., Costick, D.E. and Heiser, C.B. 1981. Taxonomy of *Solanum* section *Lasiocarpa*. *Gentes Herb.* 12: 41-129.
- Whalen, M.D. and Caruso, E.E. 1983. Phylogeny of *Solanum* section *Lasiocarpa* (Solanaceae): congruence of morphological and molecular data. *Syst. Bot.* 8: 369-380.
- Yu, Y., Tang, T., Qian, Q., Wang, Y., Yan, M., Zeng, D., Han, B., Wu, C.I., Shi, S., and Li, J. 2008. Independent losses of function in a polyphenol oxidase in rice: differentiation in grain discoloration between subspecies and the role of positive selection under domestication. *Plant Cell* 20: 2946-2959.
- Zuluaga, M.L. 1994. El cultivo del lulo (*Solanum quitoense* Lam.) En: Frutas tropicales: Memorias curso regional de actualización en frutas tropicales. ICA-Corpoica. Espinal, Colombia. pag. 197-208.

## 8. ANEXOS

### **Anexo 1. Protocolo para la extracción y purificación de DNA genómico de lulo y papa.**

1. Macerar el tejido vegetal con nitrógeno líquido en morteros previamente enfriados y transferirlo a un tubo estéril de 50 mL pre-enfriado.
2. Pesar 100 mg. de material vegetal macerado y transferirlo a un tubo de 1.5 mL pre-enfriado. Adicionar 700  $\mu$ L de solución CTAB 2X y 5  $\mu$ L de  $\beta$ -Mercaptoetanol. Homogeneizar la mezcla mediante vórtex.
3. Incubar a 65 °C durante 45 minutos agitando mediante vórtex cada 15 minutos.
4. Enfriar las muestras a temperatura ambiente durante 3 minutos. Añadir 700  $\mu$ L de Fenol-Cloroformo (1:1) y aplicar vórtex.
5. Centrifugar (14.000 rpm., temperatura ambiente, 5 minutos) y transferir el sobrenadante a un tubo de 1.5 mL limpio. Evite absorber la interfase.
6. Adicionar 8  $\mu$ L de RNAsa (10 mg/mL) e incubar a 37 °C durante 1 hora.
7. Adicionar 700  $\mu$ L de Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1) y agitar mediante vórtex.
8. Centrifugar (14.000 rpm., temperatura ambiente, 5 minutos) y transferir el sobrenadante a un tubo limpio. Evite absorber la interfase.
9. Adicionar 50  $\mu$ L de CTAB 10% e incubar a 65 °C durante 3 – 5 minutos (agitando por inversión) hasta obtener una mezcla uniforme.
10. Repetir los pasos 7 y 8 dos veces.
11. Adicionar 1 mL de isopropanol absoluto frío y mezclar por inversión hasta que aparezca el precipitado de DNA.
12. Decantar el precipitado de DNA y retirar el isopropanol.
13. Adicionar 1 mL de etanol 70% y agitar por inversión suavemente varias veces. Decantar el precipitado de DNA y retirar el etanol. Repetir este lavado una vez más.
14. Secar el precipitado de DNA al vacío durante 3 minutos o a temperatura ambiente durante 2-3 horas. Resuspender el DNA en 50  $\mu$ L

de agua (si es necesario, incubar a 55-60 °C durante períodos de 3-5 minutos).

15. Almacenar el DNA a  $-20$  °C.

## **Anexo 2. Protocolo para la extracción y purificación de DNA genómico de *Escherichia coli***

1. Centrifugar (12.000 rpm., temperatura ambiente, 5 minutos) 1.5 mL de cultivo bacteriano crecido durante la noche anterior. Descartar el sobrenadante.
2. Resuspender el pellet bacteriano en 200  $\mu$ L de solución de lisis aplicando vórtex.
3. Adicionar 66  $\mu$ L de 5M NaCl y agitar aplicando vórtex.
4. Centrifugar (12.000 rpm., 4 °C, 10 minutos) y transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
5. Adicionar 5  $\mu$ L de RNAsa (10 mg/mL) e incubar a 37 °C durante 1 hora.
6. Adicionar un volumen de Cloroformo – Alcohol Isoamílico (24:1) y agitar aplicando vórtex hasta obtener una emulsión blanca.
7. Centrifugar (12.000 rpm., 4 °C, 5 minutos) y transferir el sobrenadante a un tubo limpio. Repetir los pasos 6 y 7.
8. Adicionar 1 mL de etanol absoluto frío y mezclar por inversión varias veces.
9. Centrifugar (12.000 rpm., 4 °C, 5 minutos) y descartar el sobrenadante (etanol).
10. Adicionar 1 mL de etanol 70% y agitar mediante vórtex. Centrifugar tal como en el paso anterior y descartar el sobrenadante. Repetir el lavado una vez más.
11. Secar al vacío durante 3 minutos o a temperatura ambiente durante 2-3 horas. Resuspender el precipitado de DNA en 50  $\mu$ L de agua (si es necesario, incubar a 55-60 °C durante períodos de 3-5 minutos).
12. Almacenar el DNA a -20 °C.

### **Anexo 3. Protocolo para el marcaje de sondas con Biotina**

Para marcar la sonda se utiliza el sistema Detector Random Primer DNA Biotinylation Kit (KPL, USA).

1. Disolver 50-300 ng del DNA a marcar en un volumen final de 24  $\mu\text{L}$  de agua tratada con DEPC.
2. Añadir 20  $\mu\text{L}$  de Random Primer Solution 2.5 X.
3. Desnaturalizar la solución de DNA calentando a 95  $^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Enfriar la muestra inmediatamente en hielo.
4. Adicionar 5  $\mu\text{L}$  de 10X dNTP's y 1  $\mu\text{L}$  de Polimerasa Klenow para completar un volumen total de 50  $\mu\text{L}$ . Mezclar suavemente.
5. Incubar a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche.
6. Adicionar 5  $\mu\text{L}$  de Stop Buffer y mezclar.

#### **Anexo 4. Protocolo para la determinación de la actividad específica relativa de sondas biotiniladas**

Para la detección de la sonda biotinilada se utiliza el sistema Detector AP Chemiluminescent Blotting Kit (KPL, USA).

1. Preparar una dilución 1/200 de la sonda marcada (en solución 2X SSC+0.1% SDS). Partiendo de la dilución 1/200 inicial, preparar 50  $\mu$ L de las diluciones 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 (utilizando la misma solución diluyente).
2. Sembrar 1  $\mu$ L de cada dilución de la sonda biotinilada en una membrana de Nylon (Immobilon-Ny<sup>+</sup>, Millipore, USA) previamente tratada con solución 5X SSC y dejar secar durante 10 minutos. Para fijar el DNA a la membrana, someterla a luz UV (254 nm) durante 2 minutos por cada lado.
3. Sumergir la membrana con las muestras de la sonda diluida en 8 mL de Detector Blocking Solution 1X + 0.2% Detector Block Powder. Incubar (37 °C, 30 minutos, agitación).
4. Descartar la solución de bloqueo, agregar 8 mL de Detector Blocking Solution 1X + 0.2% Detector Block Powder con conjugado Alkaline Phosphatase-Streptavidin (AP-SA) diluido 1/10.000 e incubar (37 °C, 30 minutos, agitación).
5. Lavar la membrana con 15 mL de Phosphatase Wash Buffer 1X tres veces (5 minutos cada lavado) a temperatura ambiente.
6. Lavar la membrana 2 veces (2 minutos cada lavado) con Phosphatase Assay Buffer 1X (agitación suave, temperatura ambiente). Descartar la solución.
7. Agregar 3 mL de CDP Star Chemiluminescent Substrate e incubar durante 5 minutos.
8. Exponer la membrana a la película radiográfica durante 5 minutos y revelar.

9. Para determinar la actividad específica relativa de la sonda marcada se utiliza el DNA standard biotinilado para cuantificación incluido en el kit de marcaje. Seguir las recomendaciones del fabricante.

### **Anexo 5. Protocolo para la detección de sondas biotiniladas hibridadas con DNA genómico de lulo**

1. Una vez finalizados los lavados post-hibridación, incubar la membrana de Nylon en 20 mL de Detector Blocking Solution 1X + 0.2% Detector Block Powder (45 minutos, 20 °C, agitación).
4. Descartar la solución de bloqueo, agregar 20 mL de Detector Blocking Solution 1X + 0.2% Detector Block Powder con conjugado Alkaline-Phosphatase - Streptavidin (AP-SA) diluido 1/10.000 e incubar (45 minutos, 20 °C, agitación).
5. Lavar la membrana con 20 mL de Phosphatase Wash Buffer 1X tres veces (5 minutos cada lavado) a temperatura ambiente.
6. Lavar la membrana 2 veces (2 minutos cada lavado) con Phosphatase Assay Buffer 1X (agitación suave, temperatura ambiente). Descartar la solución.
7. Agregar 6 mL de CDP Star Chemiluminescent Substrate e incubar durante 5 minutos.
8. Exponer la membrana a la película radiográfica durante 75 minutos y revelar.