



Universidad Michoacana de San  
Nicolás de Hidalgo



Instituto de Investigaciones Químico - Biológicas

Programa Institucional de Doctorado en Ciencias  
Biológicas

Opción Biología Experimental

Análisis de la composición  
de lípidos y de la oleosina  
del oleosoma del mesocarpio  
de aguacate nativo  
mexicano (*Persea americana*  
var. *drymifolia*)

Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias

que presenta:

**M.C. Fernando Sánchez Albarrán**

Directores:

D.C. Rodolfo López Gómez

D.C. Rafael Salgado Garciglia

Morelia, Michoacán

Marzo 2019



# Índice

<b>Índice de Figuras</b>	<b>III</b>
<b>Índice de Tablas</b>	<b>v</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>vi</b>
<b>Dedicatoria</b>	<b>viii</b>
<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Abstract</b>	<b>2</b>
<b>1 Introducción General</b>	<b>3</b>
1.1 Aguacate . . . . .	3
1.2 Síntesis y almacenamiento de aceites . . . . .	4
1.3 Oleosoma y Oleosina . . . . .	7
<b>2 Antecedentes</b>	<b>11</b>
2.1 Oleosomas en el fruto de aguacate . . . . .	11
2.2 Transcriptoma en mesocarpio de <i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i> . . . . .	11
<b>3 Justificación</b>	<b>13</b>
<b>4 Hipótesis</b>	<b>14</b>
<b>5 Objetivos</b>	<b>15</b>
5.1 Objetivo general . . . . .	15
5.2 Objetivos particulares . . . . .	15
<b>6 Estrategia Experimental</b>	<b>16</b>
<b>7 Resultados</b>	<b>17</b>
7.1 Descripción del contenido y composición de los oleosomas del mesocarpio de <i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i> . . . . .	17
7.1.1 Resumen . . . . .	17
7.1.2 Abstract . . . . .	17
7.1.3 Introducción . . . . .	18
7.1.4 Materiales y métodos . . . . .	19
7.1.5 Resultados y Discusión . . . . .	22
7.1.6 Conclusiones . . . . .	32
7.2 Análisis de las características moleculares y de expresión de la proteína y del gen de la oleosina del mesocarpio de <i>P. americana</i> var. <i>drymifolia</i> . . . . .	33
7.2.1 Resumen . . . . .	33
7.2.2 Abstract . . . . .	33
7.2.3 Introducción . . . . .	34

7.2.4 Materiales y Métodos . . . . .	36
7.2.5 Resultados y discusión . . . . .	39
7.2.6 Conclusión . . . . .	52
<b>8 Discusión general</b>	<b>53</b>
<b>9 Conclusión general</b>	<b>55</b>
<b>10 Anexos</b>	<b>56</b>
10.1 Artículo de divulgación científica. . . . .	56
10.2 Capítulo de libro. . . . .	56
10.3 Artículo científico. . . . .	56
<b>11 Bibliografía</b>	<b>89</b>

## Índice de figuras

1.1	Comparativa de los frutos de aguacate y su contenido de aceite, de izquierda a derecha: <i>Persea americana</i> var. americana, <i>P. americana</i> var. guatemalensis y <i>P. americana</i> var. drymifolia. Modificado de Barientos and López (1998). . . . .	4
1.2	Ruta de la Malonil coenzima-A para la biosíntesis de los ácidos grasos. Modificada de Ohlrogge and Browse (1995). . . . .	6
1.3	Biosíntesis de DAG y TAG. Retículo Endoplásmico (RE); Ácido Fosfatídico (PA), Fosfatidil Etanolamida (PE), Fosfatidil Colina (PC), Fosfolinositol (PI), Fosfatidil Glicerol (PG), Monogalactosil Diacilglicerol (MGDG), DiGalactosil Diacilglicerol (DGDG), Diacilglicerol (DAG), Triacilglicerol (TAG). . . . .	7
1.4	Esquema general de un oleosoma, con información de Huang (1996). . . . .	9
1.5	Esquema estructural de una oleosina, se observa la horquilla hidrofóbica anclada en la matriz de TAGs, se marcan las prolinas que conforman el nudo. Modificada de Huang (1996). . . . .	10
7.1	Micrografías de los oleosomas de las diferentes variedades: A (americana), B (drymifolia), C (Hass), D (gráfica comparativa de tamaño (Ferret) contra rendimiento (yield); amer ( <i>Persea americana</i> var. americana), drym ( <i>P. americana</i> var. drymifolia), Hass ( <i>P. americana</i> var. Hass). . . . .	23
7.2	TLC para lípidos no polares en aceite de <i>Persea americana</i> var. drymifolia; La banda superior (Rf 0.87) corresponde a lípidos neutros (TAG), la banda intermedia (Rf 0.39) a fosfolípidos (DAG). 1) aceite de pulpa verde, 2) aceite de pulpa verde-maduro, 3) aceite de pulpa maduro, 4) aceite de oleosoma verde, 5) aceite de oleosoma verde-maduro, 6) aceite de oleosoma maduro. . . . .	25
7.3	RP-TLC para muestras de aceites y su respectivo perfil de señal. 1) <i>Persea americana</i> cv. Hass, 2) <i>P. americana</i> var. drymifolia, 3) <i>P. americana</i> var. americana, 4) Aceite de oliva, 5) Aceite de aguacate. . . . .	26
7.4	Composición de ácidos grasos de aguacate Hass reportado por: Meyer and Terry (2008); Takenaga <i>et al.</i> (2008); Villa-Rodríguez (2011); Kilaru <i>et al.</i> (2015) y medido por el método ácido. Los ácidos grasos: ole (oleico), pal (palmítico), lin (linoleico), lnl (linolénico) y est (esteárico). . . . .	28
7.5	Composición de ácidos grasos del aceite de las diferentes variedades; amer ( <i>Persea americana</i> var. americana), drym ( <i>P. americana</i> var. drymifolia), Hass ( <i>P. americana</i> cv. Hass); pulpa (mesocarpio), oleos (oleosoma), y los ácidos oleico (ole), palmítico (pal), palmitoleico (pol), linoleico (lin) y esteárico (est). . . . .	29
7.6	Perfil de saturación del aceite de aguacate de las diferentes variedades; amer ( <i>Persea americana</i> var. americana), drym ( <i>P. americana</i> var. drymifolia), Hass ( <i>P. americana</i> cv. Hass); pulpa (mesocarpio), oleos (oleosoma), AGS (ácidos grasos saturados), AGMI (ácidos grasos monoinsaturados), AGPI (ácidos grasos polinsaturados). . . . .	31

7.7	Alineamiento de oleosinas de la familia <i>Lauraceae</i> , Las oleosinas de <i>Persea</i> , <i>Litsea</i> y <i>Lindera</i> fueron obtenidas de Huang and Huang (2016) y usadas como referencia para la expresión en tejido; mesocarpio (M), universal (U), semilla bajo peso molecular (SL), semilla alto peso molecular (SH), el corchete muestra la región usada en el diseño de anticuerpos. . . . .	40
7.8	Cladograma obtenido mediante Neighbor Joining y bootstrap de 1000 réplicas a partir de las oleosinas de la familia <i>Lauraceae</i> , Las oleosinas de <i>Persea</i> , <i>Litsea</i> y <i>Lindera</i> fueron obtenidas de Huang and Huang (2016) y usadas como referencia para la expresión en tejido:mesocarpio (M), universal (U), semilla bajo peso molecular (SL), semilla alto peso molecular (SH). Se agregan las secuencias de <i>Spirogyra grevilleana</i> (Sgr), <i>Cocos nucifera</i> (Cnu), <i>Olea europaea</i> (Oeu) y <i>Elaeis guineensis</i> (Egu). . . . .	42
7.9	Modelo tridimensional de la oleosina, en color magenta las $\alpha$ -hélices y en azul las vueltas (coil), la flecha horizontal señala el nudo de prolinas. . . . .	43
7.10	Gel de poliacrilamida al 13 % teñido con azul de Coomassie que muestra el marcador de tamaño molecular y la proteína total de mesocarpio maduro de <i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i> , así como el respectivo Western-blot, el recuadro rojo marca la región cortada y enviada a secuenciar. . . . .	44
7.11	Western blot en proteínas de <i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i> en diversos tejidos: hoja, raíz, semilla, pericarpio (cáscara), mesocarpio verde-maduro (vema) y mesocarpio maduro. Se utilizó actina como referencia. . . . .	45
7.12	Western blot A) en proteínas de mesocarpio e inmunolocalización B) de la oleosina en oleosomas aislados de <i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i> ; verde, verde-maduro (vema), maduro; <i>P. americana</i> cv. Hass y <i>P. americana</i> var. <i>americana</i> (amer). . . . .	46
7.13	Citometría de flujo de oleosomas sin anticuerpo, A) Distribución de tamaños y fluorescencia basal en los espectros verde B), naranja C) y rojo D) de los oleosomas medido en el citómetro de flujo BD Accuri™ C6 flow cytometer. . . . .	47
7.14	Citometría de flujo de los oleosomas tratados con los anticuerpos anti-PaOLE y anti-Rabbit-Fluoresceína, se mide la fluorescencia en los canales A) rojo y verde B) para los oleosomas aislados de mesocarpio verde, verde-maduro y maduro. . . . .	49
7.15	Expresión genética en tejidos A) flor (F), embrión (E), cotiledón (C), y mesocarpio verde (V), verde maduro (VM) y maduro (D) de <i>Persea americana</i> var. <i>drymifolia</i> , así como mesocarpio maduro B) de <i>P. americana</i> var. <i>americana</i> (A) y <i>P. americana</i> cv. Hass (H). Letras diferentes indican valores significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) calculados para cada gen. . . . .	51

## Índice de tablas

7.1 Rendimiento y composición del aceite de pulpa de aguacate y oleosoma.(a,b,c,d grupos con diferencias significativas $p < 0.05$ ) . . . . .	27
7.2 Oligonucleótidos para los genes utilizados en PCR semicuantitativo . . . . .	37
7.3 Características de las oleosinas localizadas en mesocarpio de aguacate nativo mexicano . . . . .	39
7.4 Expresión (RPKM) de los unigenes correspondientes a las oleosinas reportadas, con datos de Ibarra-Laclette <i>et al.</i> (2015). . . . .	52

## **Agradecimientos**

Agradezco a todos los que me apoyaron en la realización de este trabajo:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo a través de la beca número 239236.

A la Coordinación de la Investigación Científica (CIC) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) que financió una parte de este trabajo.

Al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas (IIQB) y al Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas (PIDCB), por la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado.

A mis directores de tesis D.C. Rodolfo López Gómez y D.C. Rafael Salgado Garciglia y a mi comité tutorial D.C. Rosa Elva Norma del Rio, D. C. Hector Eduardo Martínez Flores, D.C. Jorge Molina Torres por su supervisión, sus consejos y su apoyo en esta etapa de mi formación.

Al Laboratorio de Fitobioquímica del departamento de biotecnología y Bioquímica del centro de investigaciones y estudios avanzados (Cinvestav-IPN) a cargo del D.C. Jorge Molina Torres y al técnico responsable del laboratorio M.C. Enrique Ramírez-Chávez, por la oportunidad de hacer parte de mi trabajo en una estancia en sus instalaciones.

Al laboratorio de Eco-Fisiología Animal del Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales (INIRENA) de la UMSNH a cargo de la D.C. Esperanza Meléndez Herrera y a Edel Pineda López por el apoyo con las técnicas de microscopía y tinción presentadas en este trabajo.

A Libier Magaña Ruiz por su apoyo en la realización de los cortes y tinciones para las microscopías

Al D.C. Joel Edmundo López Meza del Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la UMSNH. Por su apoyo en la realización de la citometría de flujo.

Al D.C. León Francisco Ruíz Herrera por su apoyo con las imágenes de la microscopia Confocal.

Al laboratorio de Biotecnología Vegetal y a su responsable el D.C. Rafael Salgado Garciglia que me apoyó en la realización y publicación de mi primer artículo de divulgación y de mi primer artículo científico.

Al Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas (FMP) a cargo del D.C. Rodolfo López Gómez y al M.C. Luis Ma. Suárez Rodríguez por su constante apoyo y supervisión a lo largo de mis estudios de maestría y doctorado.

A los compañeros de laboratorio de FMP que me apoyaron y acompañaron a lo largo de estos años, a Luis Ma. S.R., Huber L.C., Christopher C.H., Cinthya L.A., Rosa I.S.E., Libier M.R. y a todos los que mi corta memoria olvida mencionar.

Y un agradecimiento especial a mi familia; a mis abuelos Elvira V.G., Salomón A.G., María Guadalupe Q.P. y Lino S.C. que ya se fueron pero me enseñaron lo que el esfuerzo y el trabajo duro pueden lograr. A mis padres Susana A. V. y Santiago S. Q. que siempre me animaron a seguir adelante convenciéndome de que ningún reto es imposible. A mis hermanos Vania S. A. y Santiago S. A., mis tí@s y prim@s que me soportaron y siempre me han mostrado que, sin importar cuánto se complique la vida, siempre tendremos a la familia.

## **Dedicatoria**

Las personas somos el fruto de un trabajo social, del esfuerzo colectivo de hombres y mujeres que influyen directa o indirectamente en nuestra formación, la familia: los abuelos, padres, hermanos, tíos, tías, primas y primos con los que crecemos y que son nuestros primeros ejemplos a seguir; los profesores y compañeros en la escuela, que se convierten en una segunda familia y nos acompañan durante nuestras primeras incursiones al mundo; y los amigos, que son la familia que escogemos y con quienes aprendemos que siempre habrá otro punto de vista que aporte y enriquezca nuestras ideas y proyectos.

El día de hoy les dedico mi trabajo a todos ellos, a los que están y a los que se fueron, y espero algún día poder retribuir un poco de todo lo que han hecho por mí.

## Resumen

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es un árbol domesticado en la época prehispánica en la región de Mesoamérica. Su fruto rico en aceites es altamente valorado por sus propiedades nutricionales, cosméticas y medicinales. La mayoría de los estudios sobre estos frutos, se han realizado en cultivares comerciales como son: Hass, Fuerte y Bacon. Las variedades *drymifolia*, *americana* y *guatemalensis* no han sido completamente estudiadas, a pesar de que han sido la fuente genética de los cultivares comerciales y en ellas pueden encontrarse genes que pudiesen utilizarse para seleccionar nuevas características del fruto o mejorar las ya existentes. El entender la forma en que los frutos de aguacate almacenan lípidos durante su desarrollo hasta llegar a la maduración es de una gran importancia. En este trabajo se analiza la localización y composición de los oleosomas, además de la expresión de un gen que codifica una oleosina, principal proteína que compone esta estructura celular en frutos de aguacate Nativo Mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*). Utilizando la cromatografía de capa fina (TLC) y de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) se analizó el contenido lipídico de la pulpa, así como el de los oleosomas aislados, obteniendo que el oleosoma posee aproximadamente un 95 % de triacilglicerol, el mayor rendimiento se observó en la variedad *drymifolia* (13 % peso fresco) y los aceites de las variedades *drymifolia* y *americana* presentan entre otras menor contenido en ácido oleico ( $\approx 42\%$ ) y mayor de ácido palmítico ( $\approx 38\%$ ) comparado con el aceite del cultivar Hass ( $>60\%$  oleico y  $<15\%$  palmítico). Con respecto a la oleosina, mediante bioinformática y PCR-semicuantitativo se demostró la presencia de dos genes que codifican oleosinas (PaOLE y PaOLEII) en el mesocarpio del fruto de la variedad *drymifolia*, el gen que codifica PaOLE se expresa mayoritariamente en mesocarpio verde. Con el uso de Western-blot e inmunolocalización, se detectó que la proteína PaOLE está asociada con los oleosomas de mesocarpio y los cubre completamente, aunque el anticuerpo utilizado detecta una menor cantidad de proteína en el fruto en estadio verde-maduro (preclimático) en comparación con el inmaduro (verde de 6 meses post antesis) y el maduro (postclimático).

**Palabras clave:** Aguacate, Aceites, Oleosomas, Oleosina.

## Abstract

Avocado (*Persea americana* Mill.) Is a tree that was domesticated in pre-Hispanic times in Mesoamerica. Its fruit rich in oils is highly valued for its nutritional, cosmetic and medicinal properties. Most of the studies on these fruits, have been made in commercial cultivars such as: Hass, Fuerte and Bacon. Drymifolia, americana and guatemalensis varieties have not been fully studied, although they have been the genetic source of commercial cultivars and they can possess genes that could be used to select new traits for the fruit or improve existing ones. Understanding the way in which avocado fruits store lipids during their development until they reach maturity is of great importance. In this work, the location and composition of oleosomes is analyzed, as well as the expression of a gene that encodes an oleosin, the main protein that makes up this cellular structure in Mexican Native avocado fruits (*Persea americana* var. drymifolia). Using thin layer chromatography (TLC) and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) the lipid content of the pulp was analyzed, as well as that of the isolated oleosomes, obtaining that the oleosome has approximately 95 % triacylglycerols, the highest yield was observed in the variety drymifolia (13 % fresh weight) and the oils of the drymifolia and americana varieties have, among others, lower oleic acid content ( $\approx 42\%$ ) and higher palmitic acid ( $\approx 38\%$ ) compared to Hass cultivar oil ( $> 60\%$  oleic and  $<15\%$  palmitic). With respect to oleosin, bioinformatics and semiquantitative PCR demonstrated the presence of two genes encoding oleosins (PaOLE and PaOLEII) in the mesocarp of the fruit of the drymifolia variety, the gene that encodes PaOLE is expressed mostly in green mesocarp. With the use of Western-blot and immunolocalization, it was determined that the PaOLE protein is associated with the mesocarp oleosomes and covers them completely, although the antibody used detects a lower amount of protein in the green-ripe (preclimacteric) stage of the fruit in comparison with the immature (green of 6 months post anthesis) and mature (postclimacteric).

**Keywords:** Avocado, Oil, Oleosome, Oleosin

# 1. Introducción General

## 1.1. Aguacate

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es un árbol de más de 10 m de altura, domesticado en la época prehispánica en la región denominada Mesoamérica; posee hojas lanceoladas cerosas en el haz y pubescentes en el envés que pueden o no presentar aroma anisado, su fruto es una baya de mesocarpio (pulpa) oleosa que puede contener desde un 8-30 % de aceite, presenta una semilla grande sin endospermo que llega a constituir más de 30 % del peso del fruto y consta de dos enormes cotiledones que protegen al embrión; posee además una cáscara que puede ser delgada y comestible o gruesa y corchosa y de un color verde, pardo-rojiza o incluso púrpura oscuro. El fruto del aguacate es apreciado mundialmente por sus aplicaciones cosméticas y alimenticias, posee un enorme valor nutricional debido a su balance de ácidos mono y poliinsaturados. México es el principal productor a nivel mundial de este fruto con una producción media en los últimos 5 años de 1'214,088.27 toneladas de aguacate, mientras que el estado de Michoacán en México es el principal productor y exportador a nivel mundial, alcanzando una producción de 1,889,353.60 toneladas en el 2016 (Cummings and Schroeder, 1942; Barrientos-Priego *et al.*, 1996; Ibarra-Laclette *et al.*, 2015; SAGARPA-SIAP, 2016; FAO, 2017).

Existen tres variedades de aguacate (figura 1.1): *Persea americana* var. antillana, la cual proviene de la región de Nicaragua y las Antillas, que produce un fruto de gran tamaño, pero con un bajo contenido lipídico que va de 2.5 % hasta el 8 %, presenta una cáscara delgada de color verde que se torna parduzca al madurar, es conocido comúnmente como “palta” y está adaptada a un clima cálido y tropical; *Persea americana* var. guatemalensis, que se cultiva en la región comprendida entre Guatemala y el sur de México (Edo. de Chiapas), esta variedad produce un fruto más pequeño pero con una cáscara gruesa y resistente, su contenido de lípidos alcanza hasta un 13 % y es una de las variedades con mejores condiciones para el mecanizado por la resistencia que aporta su cáscara corchosa, es un cultivo de clima subtropical; y finalmente *Persea americana* var. drymifolia, cultivada en la región centro - oriente de México, es denominado comúnmente como “aguacate criollo” siendo más correcto el uso del término “Aguacate Nativo Mexicano”, presenta una cáscara delgada y comestible que pasa de color verde a un púrpura oscuro al madurar además de poseer la mayor concentración de aceites alcanzando de 15-20 % en su mesocarpio, es la única variedad que tolera el clima templado-frío además de que es la única adaptada a altitudes de más de 2000 msnm

(Rodríguez Suppo, 1992; Barrientos and López, 1998; Lopez-Gomez et al., 2007).

Una de las características de mayor interés en el aguacate es el contenido de aceites en su pulpa, el cual es uno de los principales factores de calidad considerados para la comercialización de este fruto.

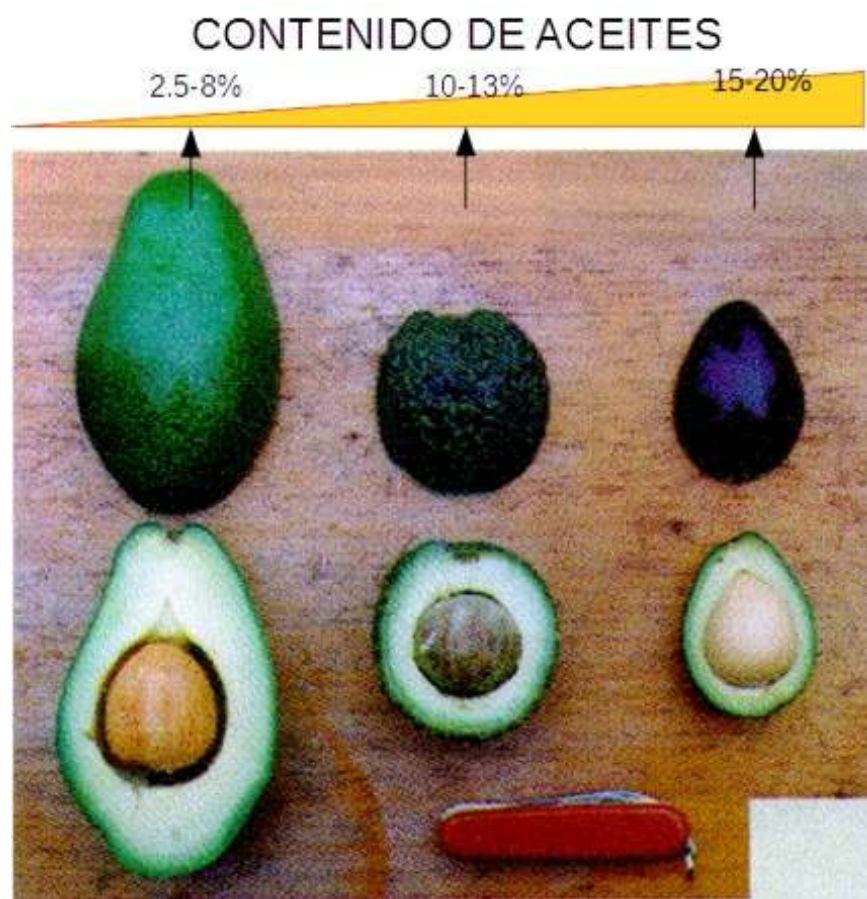


Figura 1.1: Comparativa de los frutos de aguacate y su contenido de aceite, de izquierda a derecha: *Persea americana* var. americana, *P. americana* var. guatemalensis y *P. americana* var. drymifolia. Modificado de Barrientos and López (1998).

## 1.2. Síntesis y almacenamiento de aceites

El aceite es un producto de origen vegetal que se obtiene de las reservas de energía de la planta, este se extrae principalmente de las semillas y consiste en la fracción lipídica extraída mediante medios mecánicos y/o mediante el uso de disolventes. Es uno de los productos comerciales más antiguos y ha sido valorado a través de la historia humana, tanto por

sus propiedades nutricionales y medicinales como tecnológicas y cosméticas. En los aceites podemos encontrar principalmente triacilgliceroles (TAG), pero también contiene pequeñas cantidades de otros componentes como mono y diacilgliceroles (DAG), ácidos grasos libres, esteroides, ésteres y trazas de colorantes y otros compuestos liposolubles.

Debido a que el principal componente del aceite son los triacilgliceroles y la base de estos son los ácidos grasos, se abordará la biosíntesis de ácidos grasos; esta ruta es idéntica en casi todos los eucariontes; sin embargo en las plantas hasta el 90 % de los ácidos grasos son sintetizados en los cloroplastos a través de la ruta de la malonil coenzima-A (malonil-CoA) que se observa en la figura 1.2. Esta ruta inicia con la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC) la cual cataliza la formación de la malonil-CoA, la proteína transportadora de acilos (Acil Carrier Protein ACP) sustituye a la CoA como transportador y posteriormente la cetoacil-ACP sintasa (KAS III) se encarga de la primera condensación del ciclo, la 3-cetoacil-ACP reductasa, la 3-hidroxiacil-ACP deshidratasa y la enoil-ACP reductasa se encargan de deshacerse del oxígeno del cetoacil para terminar con un nuevo acil-ACP listo para una nueva condensación y así repetir el ciclo; por este mecanismo se agregan dos carbonos por ciclo a la cadena en crecimiento, al final se producen principalmente los ácidos: palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0), en el mismo cloroplasto se encuentra una deshidrogenasa de ácido graso (fatty acid dehydrogenase, fad) que actúa específicamente en la posición 9 y transforma el ácido esteárico en oleico (C18:1), posteriormente los ácidos grasos pueden ser transportados hacia el retículo endoplásmico o permanecer en las membranas de los tilacoides, sea cual sea su destino una vez en las membranas se unen al glicerol para formar los fosfolípidos (figura 1.3), estos son el componente estructural de todas las membranas celulares y constan de dos moléculas de ácido graso unidos a una molécula de glicerol y este a su vez unido a un grupo polar; los fosfolípidos se integran en las membranas y posteriormente son sustrato para las enzimas fad que se encuentran embebidas en las mismas y las cuales pueden reducir los ácidos palmítico, esteárico y oleico para producir los ácidos palmitoleico (C16:1), oleico (18:1), linoleico (18:2), linolénico (18:3), entre otros (Ohlrogge and Browse, 1995; Zou *et al.*, 1995).

La enzima diacilglicerol aciltransferasa se encarga de la formación de triacilgliceroles a partir de un ácido fosfatídico y un acil-ACP, los triacilgliceroles (TAGs) son la reserva de energía y de carbono más utilizada por los seres vivos (Ohlrogge and Browse, 1995; Zou *et al.*, 1995).

Los triacilgliceroles se almacenan en el interior de las células en pequeñas estructuras denominadas "gotas intracelulares de lípidos" (lipid droplets), pequeñas gotas refringentes en el interior de las células vegetales, debido a su forma esférica se les denominó de manera genérica como esferosomas y fueron largamente olvidados; sin embargo, Yatsu *et al.* (1971)

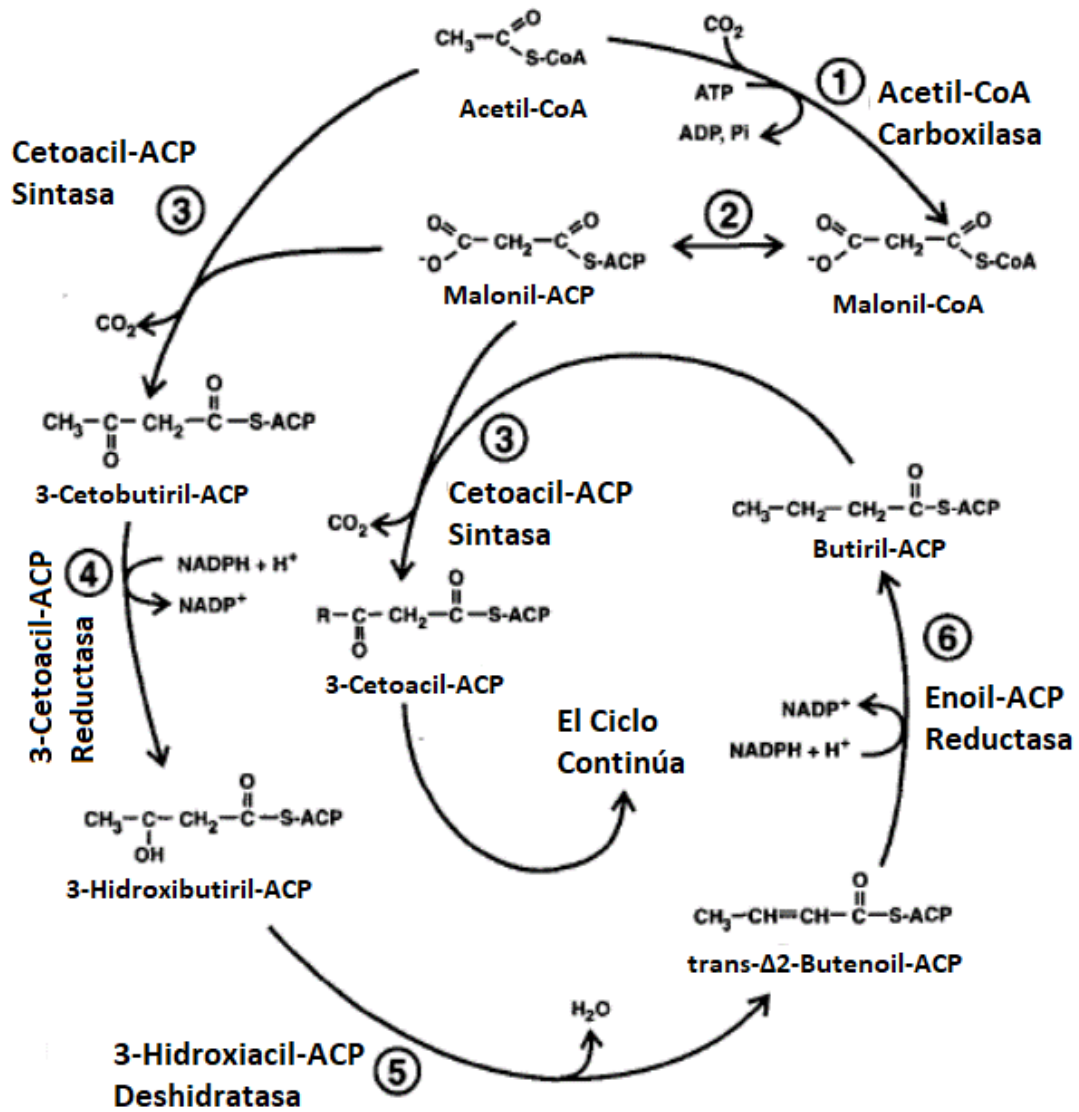


Figura 1.2: Ruta de la Malonil coenzima-A para la biosíntesis de los ácidos grasos. Modificada de Ohlogge and Browse (1995).

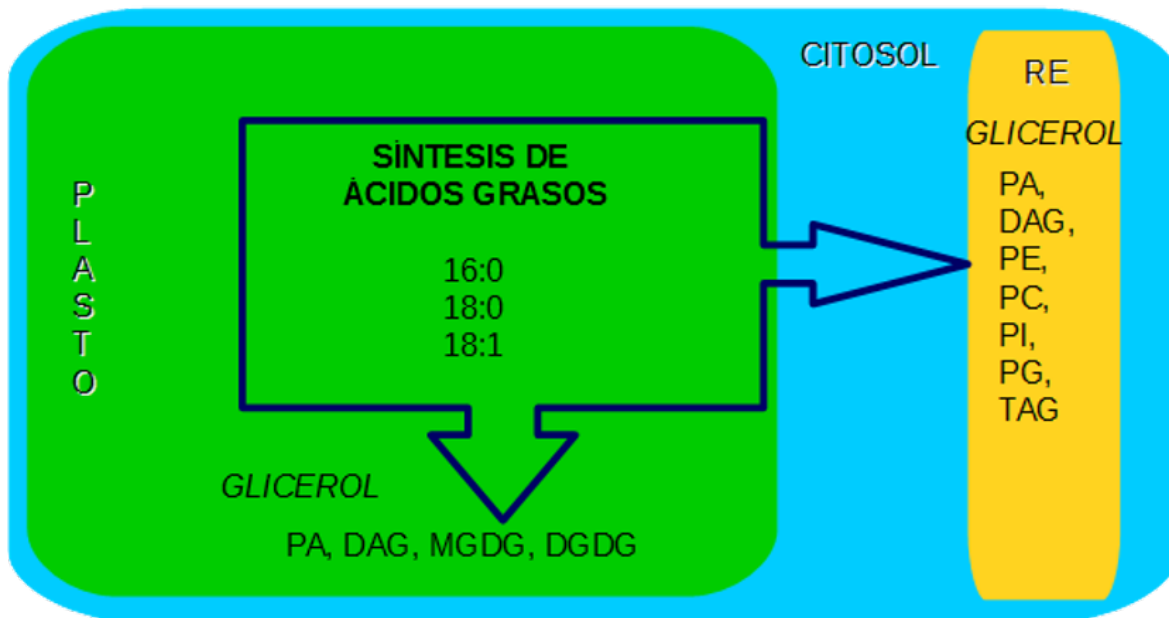


Figura 1.3: Biosíntesis de DAG y TAG. Retículo Endoplásmico (RE); Ácido Fosfatídico (PA), Fosfatidil Etanolamida (PE), Fosfatidil Colina (PC), FosfoInositol (PI), Fosfatidil Glicerol (PG), Monogalactosil Diacilglicerol (MGDG), DiGalactosil Diacilglicerol (DGDG), Diacilglicerol (DAG), Triacilglicerol (TAG).

analizaron su contenido demostrando que los esferosomas refringentes poseen aceites en su interior de modo que se acuñó el término de oleosoma para identificarlos. Posteriormente se demostró que estos oleosomas poseen una interesante capacidad de mantenerse como unidades separadas y no coalescer (fusionarse) a diferencia de las micelas formadas de manera natural o por dispersión mecánica de aceite en agua. Esta extraña propiedad es aportada por una proteína que se encuentra en toda la superficie del orgánulo. La gran mayoría de las semillas almacenan aceites como fuente de carbono y energía para la germinación y estos siempre son almacenados en los oleosomas ya que proveen un mecanismo altamente eficiente que tolera los procesos que anteceden a la germinación como la deshidratación y la vernalización (estrés por frío) y aun así, mantiene una alta relación de superficie por contenido de lípido (Yatsu *et al.*, 1971; Huang, 1996).

### 1.3. Oleosoma y Oleosina

Los oleosomas se encuentran principalmente en semillas y típicamente están compuestos de una matriz de triacilgliceroles, rodeada por una monocapa de fosfolípidos y proteínas es-

estructurales que cubren toda la superficie del orgánulo (figura 1.4). La más abundante de las proteínas es denominada oleosina y pertenece a una familia de proteínas de bajo peso molecular (15-26 kDa). Estas proteínas poseen una horquilla hidrofóbica muy característica con un nudo de prolinas justo a la mitad, se trata del dominio hidrofóbico más largo descrito con más de 70 aminoácidos de longitud, los aminoácidos de las regiones amino y carboxilo terminal están expuestos al citosol y debido a su composición presentan una densidad de carga eléctrica (figura 1.5), de manera que cuando un oleosoma está completamente recubierto por las oleosinas repele a los otros oleosomas y así evita la coalescencia (Rooijen and Moloney, 1995; Huang, 1996; Huang *et al.*, 2013).

Los oleosomas y las oleosinas han sido ampliamente estudiados en diversos organismos como musgos (*Physcomitrella patens*), gimnospermas (*Pinus massoniana*) y angiospermas (*Arabidopsis thaliana*) y se ha reportado su presencia en diferentes órganos como esporas, megagametofitos e incluso polen, hojas y semillas. En semillas se ha relacionado con la tolerancia a la deshidratación y al frío mientras permite mantener el almacenamiento de lípidos en pequeños paquetes que facilitan su disponibilidad para la germinación. Cuando la síntesis de oleosinas está comprometida, los oleosomas coalescen y se observa un aumento en su tamaño causando que la eficiencia de germinación decaiga hasta en un 70 % (Kim, 2002; Shimada *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2009, 2013; Liu *et al.*, 2012; Pasaribu *et al.*, 2014; Shimada and Hara-Nishimura, 2015 ).

Sin embargo, el contenido y la composición de los oleosomas han mostrado variar entre los tejidos de diferentes plantas, ya que aparentemente existen diversos tipos de oleosomas. Algunos oleosomas solo almacenan TAG para la germinación, como los encontrados en las células del endospermo y embrión de semillas en la mayoría de las plantas, aquí los TAG superan el 90 % y los DAG llegan a alcanzar hasta el 9 % del contenido lipídico. La fracción proteica de los oleosomas posee generalmente dos oleosinas, una de bajo y otra de alto peso molecular; se encuentran además caleosinas y esteroleosinas, que también se anclan al oleosoma. (Tzen *et al.*, 1997; Chua *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2010).

En los oleosomas de las esporas de *P. patens* se han encontrado esteroides, esteril ésteres, mono, di y triacilglicérols, así como ácidos grasos libres que protegen a estas estructuras y las ayudan durante su germinación. Hay evidencia que apoya la existencia de splicing alternativo en las oleosinas de este musgo, ya que hay solo tres genes que codifican oleosinas pero cinco proteínas con estas características (Huang *et al.*, 2009).

Los oleosomas que además de TAG poseen alcanos y flavonoides, son usados en la formación

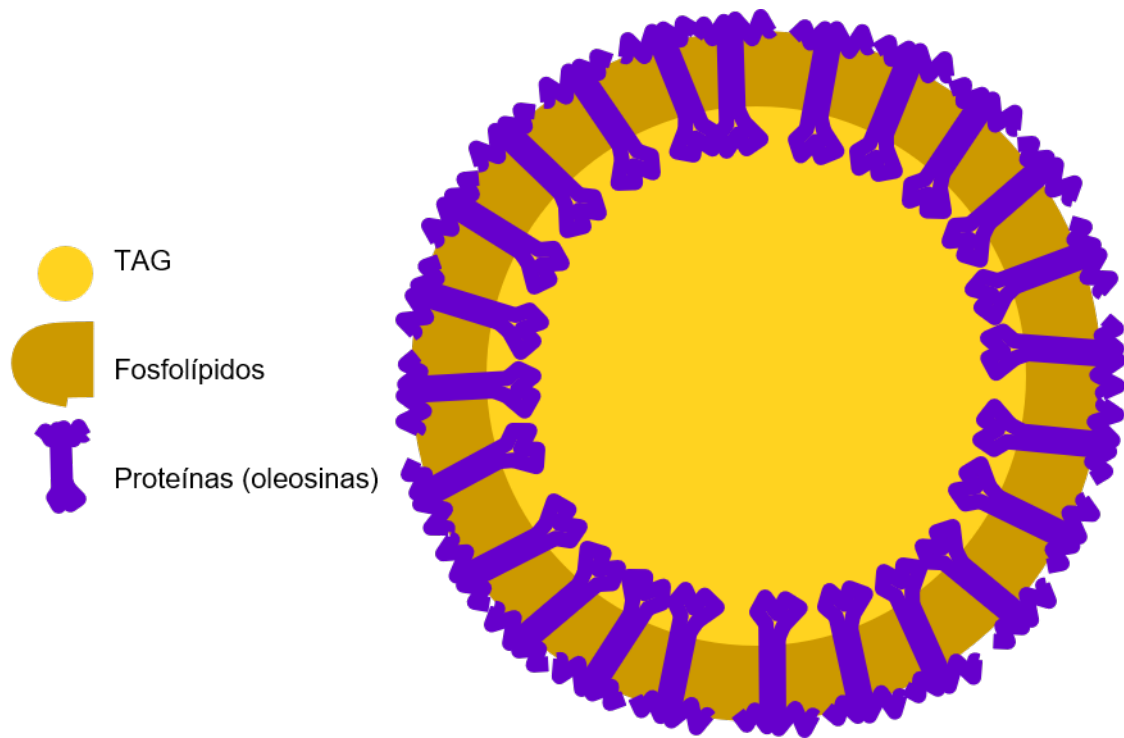


Figura 1.4: Esquema general de un oleosoma, con información de Huang (1996).

de la cobertura hidrofóbica del polen, entre sus proteínas se describió otro tipo de oleosina que hasta ahora solo se ha reportado en el tapetum floral de las crucíferas (familia Brassicaceae)(Hsieh and Huang, 2007).

En *A. thaliana* se ha reportado la presencia de oleosomas en hojas senescentes. Al interior de estos oleosomas se lleva a cabo la síntesis de oxilipinas, las cuales son derivados de ácidos grasos que tienen actividad antifúngica, se cree que el ambiente hidrofóbico de este orgánulo crea las condiciones necesarias para la síntesis de estos compuestos, ya que los intermediarios son inestables en presencia de agua y sin el ambiente hidrofóbico de los oleosomas la síntesis de las oxilipinas detectadas en estas hojas sería imposible (Shimada and Hara-Nishimura, 2015).

También se han reportado oleosomas sin oleosinas en el mesocarpio de frutos oleogénicos como la palma de aceite (*Elaeis guineensis*), aceituna (*Olea europaea*) y el del fruto de aguacate (*P. americana*)(Platt-Aloia and Thomson, 1981; Ross *et al.*, 1993; Ho *et al.*, 2014).

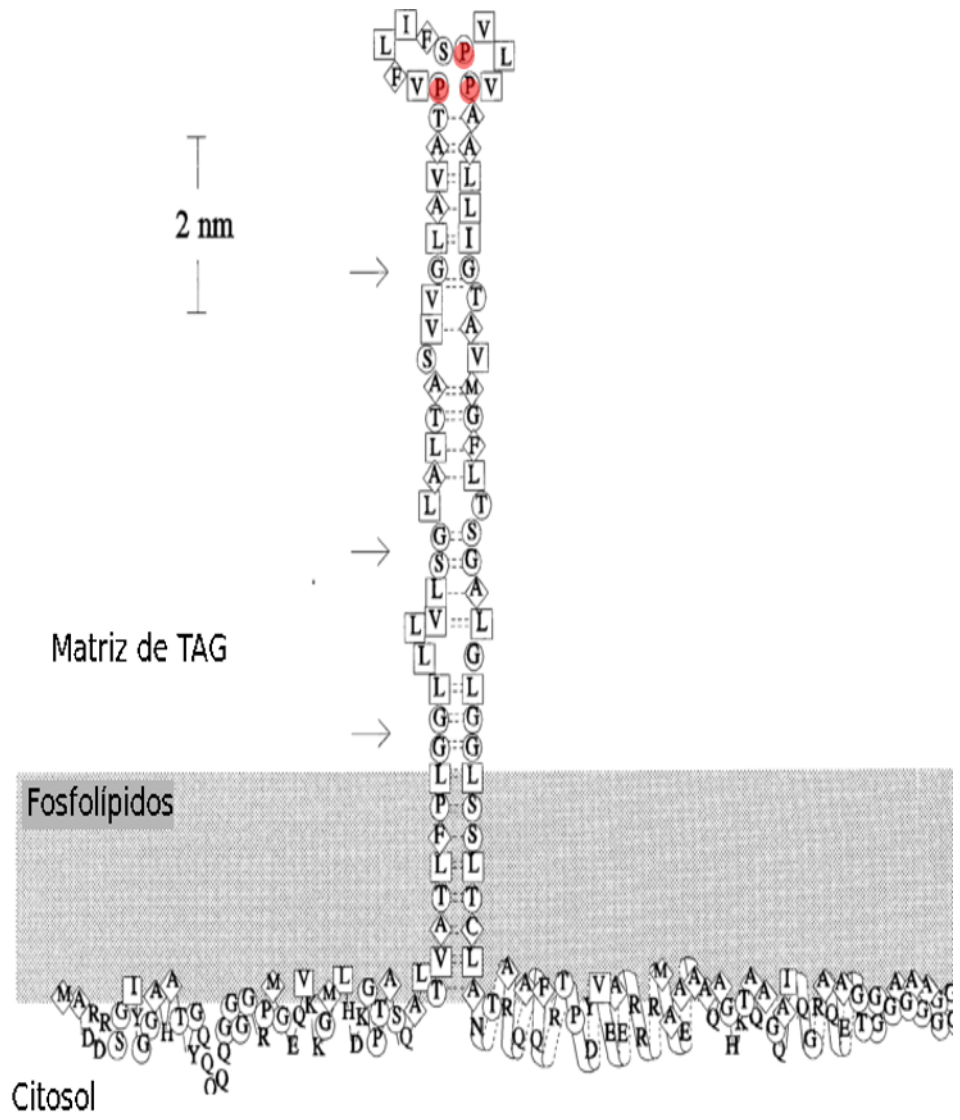


Figura 1.5: Esquema estructural de una oleosina, se observa la horquilla hidrofóbica anclada en la matriz de TAGs, se marcan las prolinas que conforman el nudo. Modificada de Huang (1996).

## **2. Antecedentes**

### **2.1. Oleosomas en el fruto de aguacate**

En el fruto de aguacate los aceites del mesocarpio se almacenan en dos estructuras principales, en células especialmente modificadas localizadas entre el tejido llamadas idioblastos y en gotas intracelulares con posible contenido de lípidos que asemejan a los denominados oleosomas. Mientras que los idioblastos poseen un amplio rango de compuestos hidrofóbicos incluidos ácidos grasos libres, alcaloides y terpenoides; el contenido de las gotas intracelulares en aguacate solo ha mostrado la presencia de triacilgliceroles (TAG) y diacilgliceroles (DAG) como componentes principales (Platt-Aloia *et al.*, 1983; Platt and Thomson, 1992; Huang and Huang, 2016).

Después de que Ross *et al.* (1993) publicaran que no había oleosinas en la semilla y mesocarpio de aguacate del cv. Hass, las gotas intracelulares de aceite del mesocarpio de aguacate no fueron estudiadas por muchos años. Más recientemente en un ensayo de transcriptómica realizado en nuestro grupo de trabajo se reportó la abundancia de un RNA mensajero que codifica para una proteína con las características de la oleosina (Lopez-Gomez *et al.*, 2007), Tiempo después Horn *et al.* (2013) estudiando las proteínas del oleosoma en mesocarpio de fruto de aguacate reportó la presencia de un par de proteínas denominadas LDAP1 y LDAP2, homólogas a las proteínas involucradas en la formación de las pequeñas partículas de caucho (SRPP) que se encuentran en el árbol del hule (*Hevea brasiliensis*), también mencionan una posible oleosina, aunque consideraron que su presencia es mínima en comparación con las LDAPs y proponen que existen oleosomas dependientes de la oleosina para estabilizarse como es el caso de las semillas; también observaron oleosomas no dependientes de oleosina que utilizan proteínas del tipo LDAP y SRPP para lograr la estabilidad (Horn *et al.*, 2013).

### **2.2. Transcriptoma en mesocarpio de *Persea americana* var. *drymifolia***

El transcriptoma es un estudio de la expresión de los genes en un momento y tejido específico del organismo. Debido a que todas las células poseen el mismo ADN, las diferencias celulares que determinan el tejido y la función dependen de los genes expresados de manera diferencial, dichos genes pueden ser analizados y gracias a las tecnologías actuales de secuenciación es posible obtener librerías completas de ESTs.

Las Etiquetas de Secuencias Expresadas (Expressed Tag Sequences o **ESTs**) son secuencias de RNA mensajero que representan un tejido específico en un punto de su desarrollo. Se obtienen realizando una extracción de RNA el cual es posteriormente procesado para obtener un cDNA, este a su vez es subclonado para obtener las diferentes librerías utilizadas en la secuenciación; de esta manera podemos obtener lecturas de todos aquellos genes que se estaban expresando en cada tejido e incluso podemos hacer inferencias respecto a la intensidad relativa con que se expresan.

Una vez obtenidas las lecturas es necesario procesar y ensamblar los genes, detectar las secuencias codificantes (Coding Sequences **CDS**), buscar genes homólogos y determinar si corresponde con alguna proteína ya descrita.

Lopez-Gomez *et al.* (2007) realizaron un transcriptoma para pulpa de frutos de aguacate “nativo” mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*), encontrando que un 36 % de las secuencias no tenían similitud con las reportadas en diferentes bases de datos. De entre estas secuencias Pliego-Alfaro *et al.* (2013) reportaron la presencia de secuencias con una alta expresión en mesocarpio, entre las más abundantes una secuencia que codificaba para una proteína con todas las características de la oleosina. Esta secuencia fue registrada en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) bajo el código KF006324, y se describe como un EST de 822 pb con un CDS de 477 pb que codifica una proteína de 159 aa (AGT63296.1), esta posee un dominio conservado correspondiente a las oleosinas. Es interesante comentar que la secuencia de oleosina no fue detectada en otro transcriptoma realizado en aguacate Hass (*P. americana* cv. Hass) (Kilaru *et al.*, 2015), aunque Huang and Huang (2016) reportaron una proteína similar a AGT63296.1, la cual es localizada exclusivamente en los oleosomas pequeños dentro de las células del mesocarpio. Un análisis filogenético de esta secuencia y otras obtenidas de Lauraceas no comerciales como los géneros *Lindera* y *Litsea* demostraron que las oleosinas de mesocarpio solo están presentes dentro de esta familia (Huang and Huang, 2016).

### **3. Justificación**

Durante muchos años se supuso que los frutos de aguacate no contenían oleosina en su mesocarpio, pero el hallazgo de un RNA mensajero muy abundante en el transcriptoma de este fruto planteó reconsiderar el papel de esta proteína en la estructura de almacenamiento de lípidos en el fruto de aguacate por lo que era importante realizar estudios para describir la composición de los lípidos y las características de la oleosina del mesocarpio de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*).

## **4. Hipótesis**

Las células del mesocarpio del fruto de aguacate nativo mexicano almacenan triacilglicérols en oleosomas que poseen oleosinas en su superficie.

## **5. Objetivos**

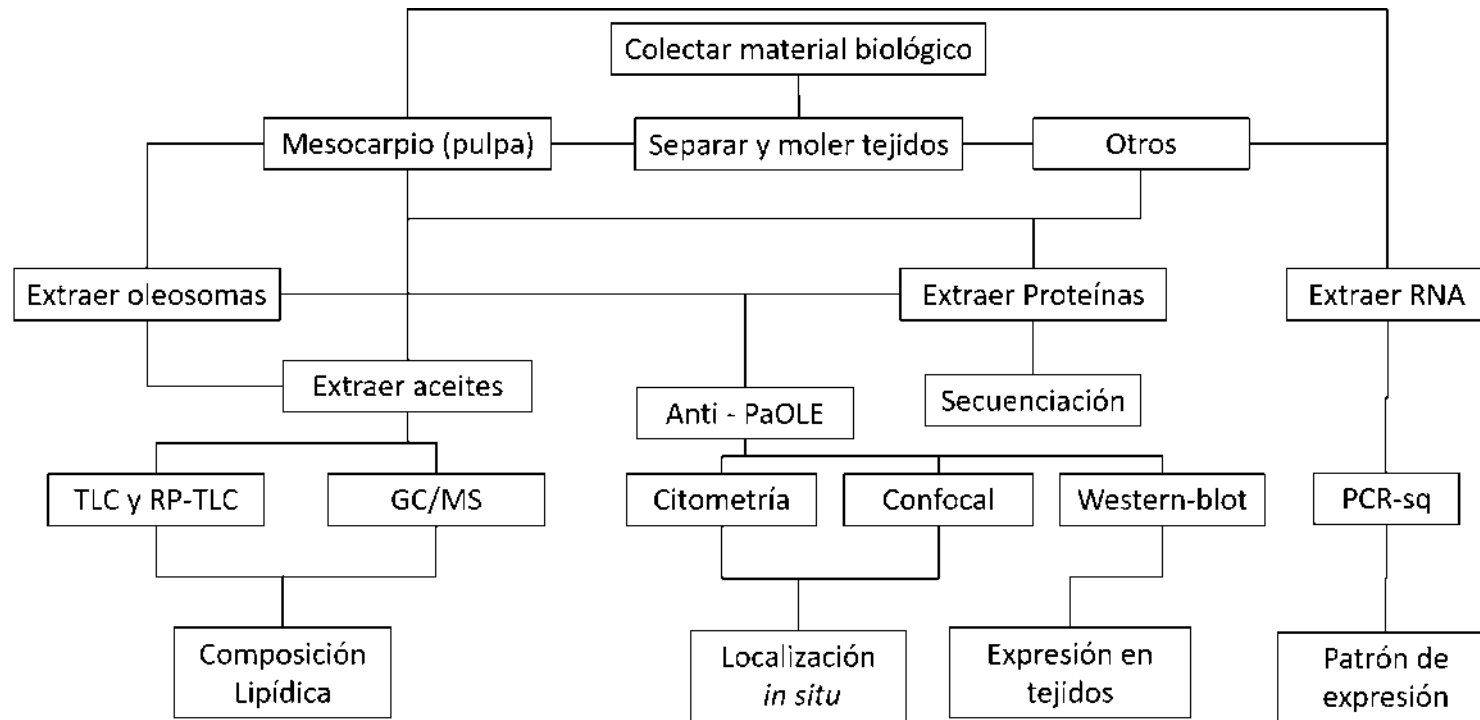
### **5.1. Objetivo general**

Determinar la composición lipídica y las características moleculares de la oleosina de los oleosomas de las células del mesocarpio de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*).

### **5.2. Objetivos particulares**

1. Describir el contenido y composición lipídica de los oleosomas del mesocarpio de *P. americana* var. *drymifolia*.
2. Analizar las características moleculares y de expresión de la proteína y el gen de la oleosina del mesocarpio de *P. americana* var. *drymifolia*.

## 6. Estrategia Experimental



## 7. Resultados

### 7.1. Descripción del contenido y composición de los oleosomas del mesocarpio de *Persea americana* var. *drymifolia*.

#### 7.1.1. Resumen

Los estudios sobre el aceite de aguacate se han enfocado en los cultivares comerciales más comunes Hass, Bacon y Fuerte, antes que en las variedades *P. americana* var. *drymifolia* y *P. americana* var. *americana*, a pesar de que la variedad *drymifolia* posee un mayor contenido de aceites y la variedad *americana* es el aguacate más común cultivado en los trópicos. Las estructuras de almacenamiento de aceites en plantas más abundantes son los oleosomas y el enfoque de este estudio es determinar el tamaño del oleosoma, el rendimiento del aceite y la composición de ácidos grasos de las variedades *americana* y *drymifolia*, usando el cultivar Hass como referencia. Se encontraron diferencias entre los tres tipos de aguacate, para 1) el rendimiento de aceite, siendo la variedad *drymifolia* la de mayor y la variedad *americana* la de menor contenido ( $p < 0.05$ ), 2) tamaño de los oleosomas, donde el aguacate Hass posee los más grandes ( $41.53 \mu\text{m}$ ) y la variedad *americana* los más pequeños ( $11.96 \mu\text{m}$ ) y 3) la composición de ácidos grasos con las variedades *americana* y *drymifolia* presentando menos ácidos grasos monoinsaturados (oleico) y más polinsaturados (linoleico) y saturados (palmítico); mientras Hass posee un mayor nivel de monoinsaturados (60 %). Diferencias pequeñas pero significativas se encontraron también entre los aceites de oleosoma y de mesocarpio de la variedad *drymifolia* y del cultivar Hass.

**Palabras clave:** Aguacate, oleosoma, ácidos grasos, gc/ms.

#### 7.1.2. Abstract

Studies on avocado oil have focused on the most common commercial cultivars, Hass, Fuerte, and Bacon, rather than the less common varieties, *P. americana* var. *drymifolia* and *P. americana* var. *americana*, even though the *drymifolia* variety has a higher oil content and the *americana* variety is the most common avocado grown in the tropics. The most abundant storage structures for plant oils are the oleosomes, and the aim of this study was to determine the oleosome size, oil yield, and fatty acid composition of the *americana* and *drymifolia* varieties, using the Hass cultivar as a reference. Differences were found between the three av-

ocado types for 1) oil yield, with *drymifolia* having higher and *americana* lower oil content ( $p < 0.05$ ), 2) oleosome size, with Hass having a larger ( $41.53 \mu\text{m}$ ) and *americana* a smaller ( $11.96 \mu\text{m}$ ) size, and 3) fatty acid composition, with the *americana* and *drymifolia* varieties showing less monounsaturated fatty acids (oleic) and more polyunsaturated fatty acids (linoleic) and saturated fatty acids (palmitic); while Hass had a high level (60 %) of monounsaturated fatty acids. Small but significant differences were also found between oleosome and mesocarp oils isolated from the *drymifolia* and Hass types.

**Keywords:** Avocado, oleosome, fatty acids, gc/ms.

### 7.1.3. Introducción

La principal característica que distingue al fruto del aguacate (*Persea americana* Mill.) es el alto contenido de aceite en el mesocarpio, lo cual le da al fruto la textura cremosa y contribuye a su sabor. El aceite es una fuente de ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico), monoinsaturados (oleico y palmitoleico) y poliinsaturados (linoleico y linolénico) que aportan beneficios a la salud por sus actividades anticolesterolémica, antioxidante y antiinflamatoria (Biale and Young, 1971; Lewis, 1978; Whiley *et al.*, 2002).

Hasta ahora los estudios sobre el aceite del fruto de aguacate se han enfocado en cultivares comerciales como Hass, Bacon y Fuerte, mientras que solo unos pocos estudios han abordado los frutos de las variedades nativa mexicana (*P. americana* var. *drymifolia*) y americana o antillana (*P. americana* var. *americana*), a pesar de sus excelentes propiedades nutricionales y medicinales (Bora *et al.*, 2001; Villa-Rodríguez, 2011; Dreher and Davenport, 2013; Ibarra-Laclette *et al.*, 2015).

El árbol de aguacate pertenece a la familia Lauraceae un grupo primitivo de Angiospermas que fue domesticado durante la época prehispánica en Mesoamérica, posee tres variedades botánicas (*P. americana* var. *americana*, *P. americana* var. *guatemalensis* y *P. americana* var. *drymifolia*). La variedad *drymifolia*, que corresponde al aguacate nativo mexicano es originaria de la región centro-este de México. A diferencia de las otras dos variedades, que están adaptadas a un clima tropical o subtropical, la variedad *drymifolia* tolera un clima templado-frío y mayores altitudes, además es resistente a algunas enfermedades. Los frutos de *drymifolia* tienen un aroma anisado y poseen un pericarpio delgado y comestible que pasa de verde a púrpura oscuro (casi negro) al madurar, sus frutos poseen el mayor contenido de aceite alcanzando del 15 al 20 % e incluso llegan a superar este valor (Barrientos-Priego *et al.*, 1996;

Whiley *et al.*, 2002; Ozdemir and Topuz, 2004; Lopez-Gomez *et al.*, 2007; Barrientos Priego, 2010).

En plantas los aceites son almacenados intracelularmente como gotas de lípidos llamados oleosomas, se trata de estructuras similares a micelas. Los oleosomas se componen de una matriz de triacilgliceroles rodeada por una monocapa de fosfolípidos. A diferencia de las micelas, los oleosomas están cubiertos por una capa de proteínas (principalmente oleosina). La cubierta de proteínas evita la coalescencia de los aceites y mantiene la alta correlación entre la superficie del oleosoma y el aceite en su interior. Las alteraciones en la estructura de la oleosina modifican negativamente el oleosoma y pueden disminuir la capacidad de germinación de algunas semillas (Huang, 1996; Shimada *et al.*, 2008; Shimada and Hara-Nishimura, 2010).

Los oleosomas en mesocarpio no han sido asociados con la germinación, pero se han detectado oleosomas en el mesocarpio de los frutos de la palma de aceite (*Elaeis guineensis*), aceituna (*Olea europaea*) y aguacate (*Persea americana*). Estos oleosomas de mesocarpio de fruto son de mayor tamaño que en las semillas, por ejemplo en aceituna, los oleosomas de semilla se encuentran entre los 0.2 y los 2  $\mu\text{m}$ , y entre 10 a 20  $\mu\text{m}$  en el mesocarpio. En frutos de palma de aceite ocurre algo similar, los oleosomas están entre los 4 a 26  $\mu\text{m}$  en las semillas y de 4 a 32  $\mu\text{m}$  en el mesocarpio. Ho *et al.* (2014) relacionaron el contenido de aceites con el tamaño y número de oleosomas en el mesocarpio del fruto de la palma de aceite, reportando que un alto contenido de aceite se asocia con un número alto de oleosomas de tamaño pequeño (Ross *et al.*, 1993; Giannoulia *et al.*, 2007; Ho *et al.*, 2014; Huang and Huang, 2016).

A pesar de que los frutos de aguacate de la variedad *drymifolia* tienen el más alto contenido de aceite, no hay estudios que caractericen sus estructuras celulares de almacenamiento, que analicen la composición o que evalúen las posibles diferencias entre los aceites de los cultivares reportados y de las variedades botánicas. En el presente estudio se compara la ubicación, el perfil y la composición de ácidos grasos en los aceites obtenidos de mesocarpio y de oleosomas aislados de *P. americana* var. *drymifolia* y de *P. americana* cv. Hass con el aceite extraído de mesocarpio de *P. americana* var. *americana*.

#### **7.1.4. Materiales y métodos**

##### **7.1.4.1. Material vegetal**

Todos los frutos de aguacate fueron colectados y adquiridos en estado maduro. Los frutos de *P.*

*americana* var. *drymifolia* fueron colectados en el municipio de Petembo, Michoacán, México (Latitud 19.1167, Longitud -101.493611); los frutos de *P. americana* var. *americana* fueron comprados en un mercado local en Mérida, Yucatán, México; y los frutos de *P. americana* cv. Hass fueron adquiridos en el mercado local en Morelia, Michoacán, México. Los frutos fueron lavados y se separaron el pericarpio (cáscara), mesocarpio (pulpa) y semillas. Se apartaron cortes de cada variedad para el análisis histológico, el resto fue finamente molido para obtener oleosomas o para la extracción de aceite.

#### **7.1.4.2. Análisis histológico**

Los tejidos fueron embebidos en TissueTeck™ y congelados a -23°C para solidificar el componente, se utilizó un criostato (Hyrax c25 Zeiss™) y se realizaron cortes de 70 μm de espesor. Los cortes fijados por 15 min en 4 % formaldehído/ 15 % glicerol, se enjuagaron a fondo con agua destilada y se tiñeron por 5 min con Sudan III, se enjuagaron con 70 % etanol y se realizó un segundo teñido de 5 min con azul de toluidina, finalmente se enjuagaron completamente con agua destilada. Los cortes fueron observados en un microscopio óptico a 40× aumentos. Las imágenes fueron analizadas con ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) para obtener los valores de área, perímetro y diámetro de Feret para los oleosomas teñidos de rojo.

#### **7.1.4.3. Extracción de oleosomas y Extracción de aceite**

Los oleosomas fueron obtenidos mediante el método de Tzen *et al.* (1997) que consistió en flotación en solución de sacarosa seguida por un lavado con detergente (Tween 20™) y un lavado con solución iónica (2M NaCl). El aceite de los oleosomas se recuperó a partir de 300 μL de la suspensión, se agregaron 3 mL de cloroformo: metanol 2:1 (C/M). Los aceites del mesocarpio fueron extraídos a partir de 500 mg de mesocarpio finamente molido en nitrógeno líquido, se agregaron 3mL de C/M, se agitó por 1 min y se filtró, la extracción se repitió por 3 veces y se juntaron los tres filtrados, una vez extraído del oleosoma o del mesocarpio, el disolvente fue evaporado en atmósfera de nitrógeno y el aceite fue desecado por 48 h a 37 °C. Las extracciones se realizaron por triplicado y el rendimiento se obtuvo para cada muestra. El aceite obtenido de frutos del cultivar Hass fue usado como referencia.

#### **7.1.4.4. Cromatografía en capa fina**

La cromatografía en capa fina (thin-layer chromatography: TLC) fue realizada sobre placas de gel de sílice sobre aluminio (Fluka™ 60778-25EA) como fase estacionaria y éter de petróleo:

éter etílico: acetona (80:20:1) como la fase móvil; la cromatografía en capa fina en fase reversa (Reversed-phase thin-layer chromatography: RP-TLC) fue realizada sobre placa de gel de sílice sobre vidrio (Merck™ 60-RP-18) como la fase estacionaria y diclorometano: ácido acético: acetona (20:40:50) como fase móvil. Se utilizaron 5 mg de aceite por carril y las placas fueron desarrolladas una vez, la placa de TLC fue revelada con luz ultravioleta (366 nm) y la placa de RP-TLC con ácido fosfomolibdico y posterior calentamiento a 95 °C por 3 min. Las imágenes obtenidas fueron procesadas con Gel Analyzer (<http://www.gelanalyzer.com>) e imageJ.

#### **7.1.4.5. Cromatografía de Gases/Masas**

La composición de ácidos grasos fue determinada para las diferentes muestras de aceite mediante un método de derivatización ácida: en viales de reacción de 2 mL se agregaron 100  $\mu$ L de aceite, 1mL de 1M HCl en metanol y se calentó a 80°C durante 1 h. Los metil ésteres fueron recuperados con hexano y el disolvente se evaporó con nitrógeno gaseoso. Los metil ésteres fueron resuspendidos en 200  $\mu$ L de metanol y 1  $\mu$ L de resuspensión fue inyectado en un cromatógrafo de gases (GC/EIMS Agilent series 5975C) usando el modo splitless, 1mL/min de helio como acarreador y una columna Agilent 122-0162UI DB-1ms Ultra Inert (60 m  $\times$  250  $\mu$ m  $\times$  0.25  $\mu$ m). El programa de temperatura fue de 150°C por 3 min, después se calentó hasta 300°C con una rampa de 4°C/min y se mantuvo por 20 min a esta temperatura. Los metil ésteres separados fueron registrados con el detector de masas funcionando en modo de impacto de electrones (Electron Impact: EI) y los datos fueron colectados en modo de escaneo desde 50 hasta 550 m/Z.

#### **7.1.4.6. Identificación y cuantificación de ácidos grasos**

Los cromatogramas obtenidos fueron analizados con el programa AMDIS y la base de datos NIST (<http://chemdata.nist.gov/dokuwiki/doku.php?id=chemdata:amdis> y <https://www.nist.gov/srd/nist-standard-reference-database-1a-v17>) para identificar los picos de la señal. Los picos correspondientes a ácidos grasos fueron identificados por su tiempo de retención y espectro de masas; su porcentaje fue estimado calculando el área bajo la curva.

#### **7.1.4.7. Análisis estadístico**

Todos los datos fueron analizados con el Software de R (Team, 2017) y el porcentaje fue transformado para normalizar la distribución de los datos y permitir el análisis de la varianza (ANOVA) y el cálculo de la diferencia de medias (prueba de Tukey), usando la fórmula:

$$adj \% = \left(\frac{180}{\pi}\right)(\sin^{-1}(\sqrt{\%}))$$

donde:

*adj* % = porcentaje ajustado

% = porcentaje original expresado en centésimas

## 7.1.5. Resultados y Discusión

### 7.1.5.1. Localización y morfología

La tinción con Sudan III permitió la observación *in situ* de los oleosomas (figura 7.1). El azul de toluidina produjo una tinción no específica de color azul-púrpura en las proteínas y un tinte ligero de la pared celular. El Sudan III tiñe a los lípidos neutros, como los triacilgliceroles (TAG), con un color rojo-naranja, así que los oleosomas se observan como esferoides con un color naranja a café-rojizo. El tamaño medio de los oleosomas difiere entre las variedades: Son pequeños ( $11.96 \pm 1.44 \mu\text{m}$ ) y dispersos en *P. americana* var. *americana*, grandes ( $41.53 \pm 6.83 \mu\text{m}$ ) y sin forma en *P. americana* cv. *Hass*, y agrupados en racimos en *P. americana* var. *drymifolia*. El tamaño y forma del racimo es muy parecido al tamaño y forma del oleosoma individual en el cultivar *Hass*, sin embargo, cada oleosoma que forma el racimo en *drymifolia* tienen un tamaño menor ( $21.52 \pm 8.49 \mu\text{m}$ ) y una forma esfeoridal; esta diferencia fue evidente porque el azul de toluidina tiñe la capa de proteína que separa los oleosomas, así que estos pueden distinguirse como estructuras individuales con bordes de color púrpura oscuro. La proteína en el cultivar *Hass* aparece como una mancha azul-violácea en la superficie, pero no se observaron racimos de oleosomas; la diferencia de tamaños fue evidente a pesar de la alta variabilidad observada, el aguacate *Hass* posee los oleosomas más grandes ( $p < 0.05$ ).

Como lo reportaron Platt and Thomson (1992) y Huang and Huang (2016), las células de mesocarpio de aguacate poseen oleosomas, el Sudan III revela la presencia de TAGs dentro de ellos, por su parte el azul de toluidina tiñe la capa de proteína. Esta tinción diferenciada permitió observar los racimos de oleosomas en mesocarpio de *drymifolia*, que no habían sido reportados previamente. Oleosomas de gran tamaño con una limitada cobertura de oleosinas fueron reportados por Huang and Huang (2016) para el mesocarpio de *Hass*, pero una cobertura de proteínas más completa fue relacionada con oleosomas de menor tamaño (Huang, 1996) y la presencia de más oleosina ha sido asociada con un mayor contenido de aceite (Ho *et al.*, 2014). Ambas condiciones fueron observadas para la variedad *drymifolia*, la cual mostró el

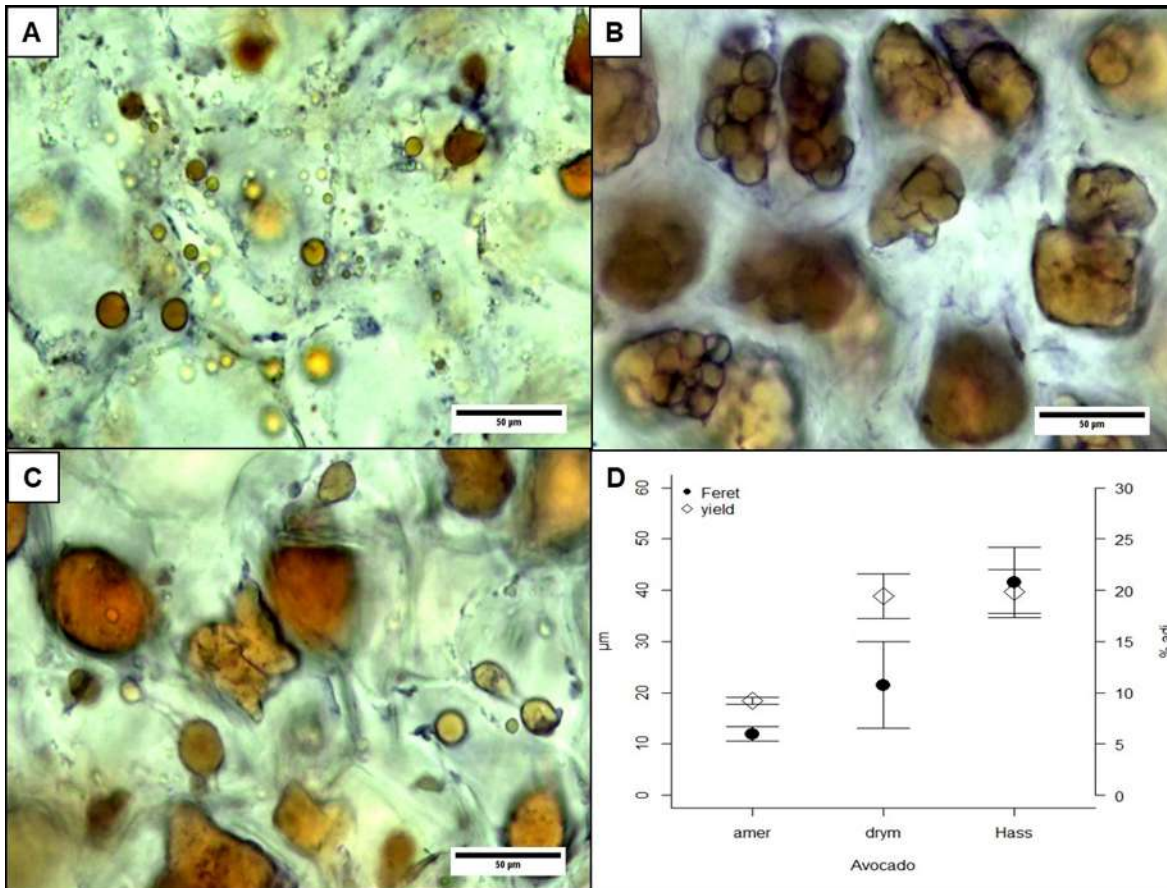


Figura 7.1: Micrográficas de los oleosomas de las diferentes variedades: A (americana), B (drymifolia), C (Hass), D (gráfica comparativa de tamaño (Feret) contra rendimiento (yield); amer (*Persea americana* var. americana), drym (*P. americana* var. drymifolia), Hass (*P. americana* var. Hass).

mayor contenido de aceites y un menor tamaño de oleosoma que Hass. La variedad americana tiene un tamaño aún menor en sus oleosomas y parece completamente cubierta de proteínas, pero el bajo contenido de aceite puede estar relacionado con una baja síntesis de lípidos en esta variedad.

#### 7.1.5.2. Rendimiento de aceite

Los oleosomas fueron recuperados solo de frutos de *Persea americana* var. drymifolia y cv. Hass. En *P. americana* var. americana, la fase de los oleosomas fue demasiado delgada y difícil de recuperar. La variedad americana tiene el contenido de aceite más bajo, con un 2.5 %, lo que concuerda con el valor de 2.5-8 % previamente reportado por Whiley *et al.* (2002). Este

bajo contenido de aceite puede explicar la dificultad al aislar oleosomas desde frutos de esta variedad. El mesocarpio de fruto de *drymifolia* mostró el mayor rendimiento con 13.27 % ( $p < 0.05$ ), mientras que el mesocarpio de Hass tuvo un contenido de 9.57 %. Estos valores son menores que los reportados previamente por Whiley *et al.* (2002) porque son expresados en base a peso fresco, en tanto que otros reportes refieren el contenido en base a peso seco. Debido a que el peso seco es de aproximadamente el 30 % menor que el peso fresco, lo que indica una pérdida de alrededor de 70 % de agua (Ozdemir and Topuz, 2004), los resultados aproximados en porcentaje de peso seco son: 8.53 % para americana, 44.23 % para *drymifolia* y 31.9 % para Hass.

En la figura 7.1 panel D, se muestra la correlación entre el contenido de aceite en mesocarpio y el tamaño medio de los oleosomas. El análisis de varianza ( $p < 0.05$ ) confirma que la variedad americana tiene el menor contenido de aceite y los oleosomas más pequeños, mientras que el mayor contenido de aceite corresponde a la variedad *drymifolia*. La variedad *drymifolia* tiene oleosomas de tamaño menor a los del cultivar Hass, pero mayor contenido de aceites. Estos resultados sugieren que el contenido de aceite en mesocarpio no se relaciona directamente con el tamaño de oleosoma o que el contenido varía en un rango de tamaños.

La acumulación de TAG se ha relacionado con aclimatación al frío en *Arabidopsis thaliana* (Degenkolbe *et al.*, 2012); entre varios factores, el mayor contenido de TAG en la variedad *drymifolia* puede deberse a su adaptación a las condiciones de crecimiento en terrenos elevados ( $> 2000$  metros de altitud) y clima templado-frío; en contraste la variedad americana crece en terrenos más bajos ( $< 1000$  m de altitud) y clima tropical (Barrientos and López, 1998) que pueden favorecer el menor contenido de aceites.

#### **7.1.5.3. Cromatografía de capa fina (TLC)**

Los triacilglicerolos son los principales componentes de almacenamiento en oleosomas de aguacate. En la figura 7.2 se muestra el resultado de la placa de cromatografía de capa fina (TLC), en la que se observan las bandas características de lípidos neutros (principalmente TAG) de las muestras de aceite, encontrando pequeñas bandas que pueden corresponder a los fosfolípidos (diacilglicerolos o DAG). Con el análisis de estas bandas se obtuvo que los TAG representan más del 95 %, los DAG hasta el 9 % y se observa un aproximado de 3 % de otros lípidos. Si bien todas las muestras analizadas presentan una visible banda de TAG, la banda intermedia correspondiente a los DAG es visible en las muestras obtenidas a partir de oleosomas aislados y es indetectable en las muestras obtenidas de pulpa total. Por su parte

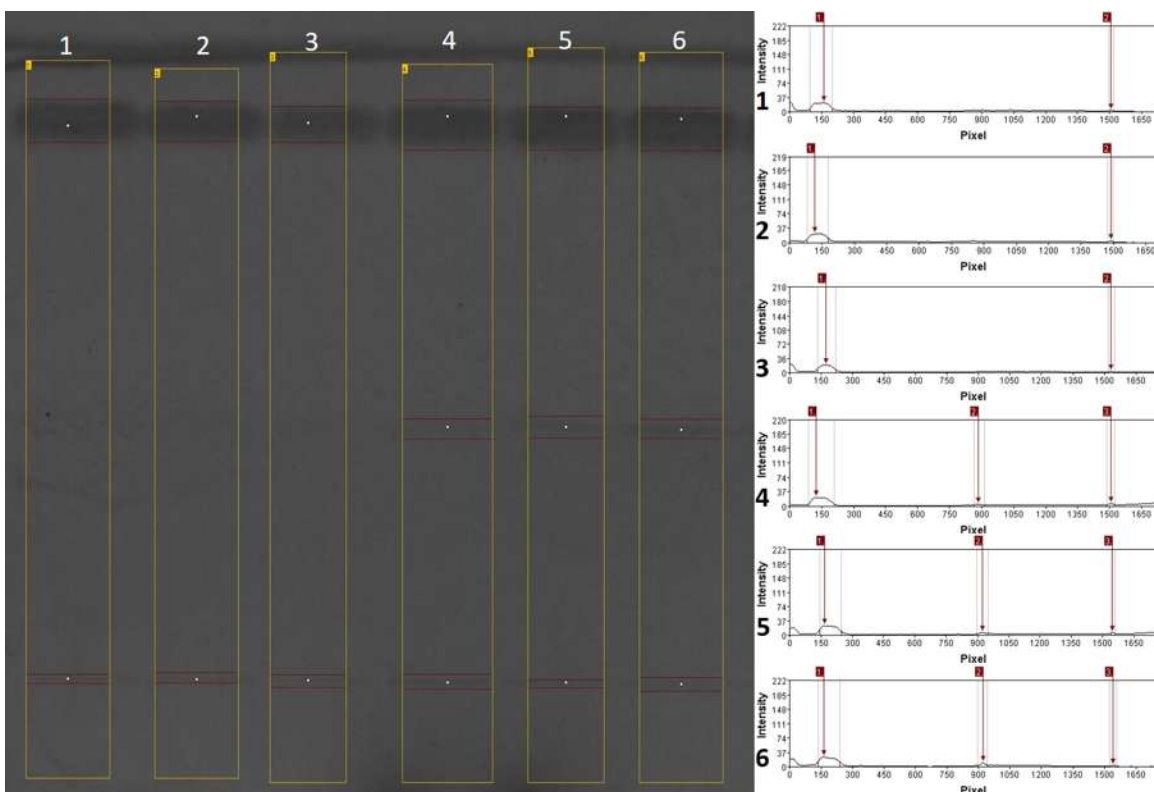


Figura 7.2: TLC para lípidos no polares en aceite de *Persea americana* var. *drymifolia*; La banda superior ( $R_f$  0.87) corresponde a lípidos neutros (TAG), la banda intermedia ( $R_f$  0.39) a fosfolípidos (DAG). 1) aceite de pulpa verde, 2) aceite de pulpa verde-maduro, 3) aceite de pulpa maduro, 4) aceite de oleosoma verde, 5) aceite de oleosoma verde-maduro, 6) aceite de oleosoma maduro.

el estado de maduración no presentó ningún efecto apreciable en la separación por TLC.

Los resultados de RP-TLC para el perfil de ácidos grasos se presentan en la figura 7.3, en la que los perfiles de los aceites extraídos mediante disolvente presentan bandas con un alto  $R_f$  (carriles 1-3); el perfil de bandeado para la variedad americana tiene una intensidad menor (carril 3), mientras que el aceite comercial de aguacate y de oliva tienen un mayor número de bandas (carriles 4,5), Todos los perfiles son similares al patrón de bandeado reportado previamente para el aceite de oliva (Europe, 2008), debido a que todos muestran tres bandas de bajo  $R_f$ , estas bandas comunes pueden ser debidas a la presencia de una alta proporción en TAGs comunes para todas las muestra analizadas. El RP-TLC indica que el perfil de triacilgliceroles es específico para cada variedad de aguacate y para el método de extracción. El método utilizado está descrito en Europe (2008) y es empleado como un método comparativo, la muestra es corrida contra un estándar de aceite para detectar mezclas o adulteraciones.

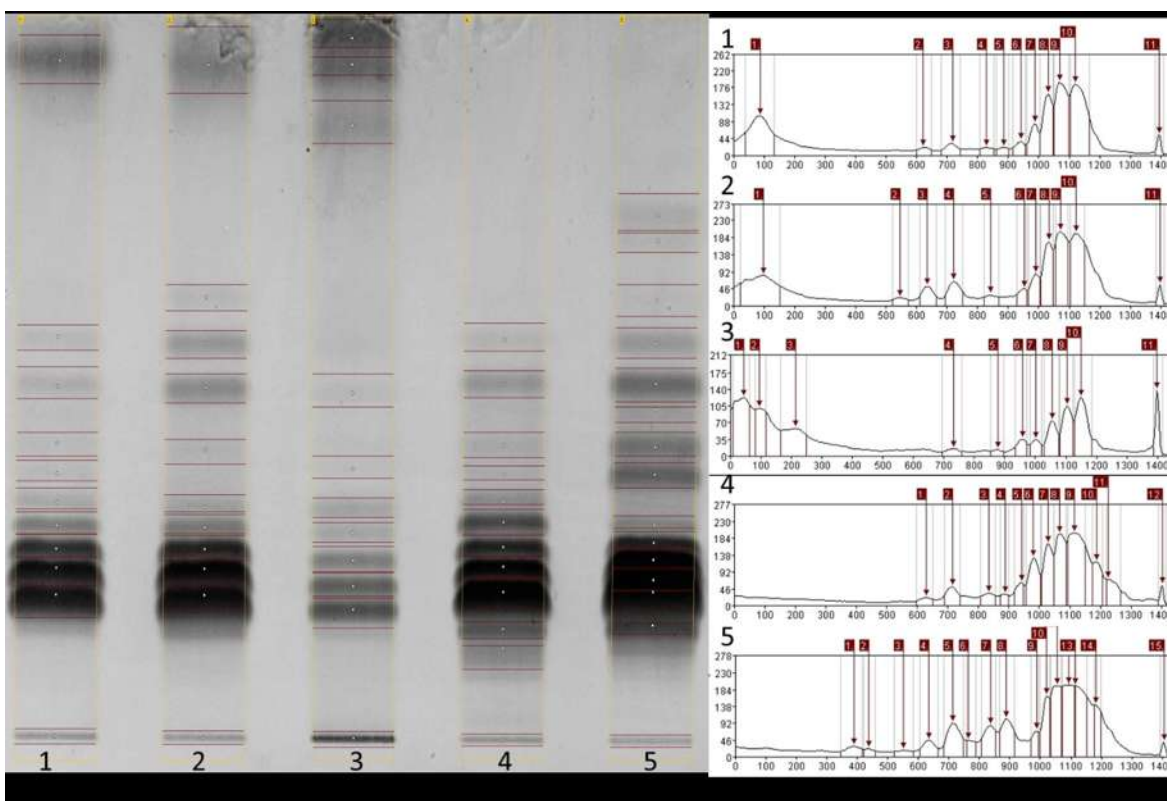


Figura 7.3: RP-TLC para muestras de aceites y su respectivo perfil de señal. 1) *Persea americana* cv. Hass, 2) *P. americana* var. *drymifolia*, 3) *P. americana* var. *americana*, 4) Aceite de oliva, 5) Aceite de aguacate.

Los ácidos grasos asociados con los triacilglicéridos se presentan en varias combinaciones, por lo que se aplica la RP-TLC como un control de calidad, ya que separa diferentes especies de TAGs según sus propiedades fisicoquímicas. El tratamiento con ácido fosfomolibdico oxida los ácidos grasos insaturados para desarrollar un patrón de bandeo que es característico de la composición de TAGs en el aceite. Sin embargo, este patrón puede modificarse debido al método de extracción o mezclando o adulterando los aceites.

Este es el primer informe de los perfiles de bandas de TAGs para el aceite comercial de aguacate (extraído por extrusión de los frutos del cultivar Hass) y para los aceites obtenidos de frutos de Hass, *drymifolia* y *americana* (extraídas con mezcla de disolventes clorofor-mo/metanol).

#### 7.1.5.4. Cromatografía de gases con Espectrometría de Masas (GC/MS)

A pesar de que la derivatización ácida es una reacción ampliamente reportada para la deter-

Tabla 7.1: Rendimiento y composición del aceite de pulpa de aguacate y oleosoma.(a,b,c,d grupos con diferencias significativas  $p < 0.05$ )

<i>Persea americana</i>	Tejido	Rendimiento	palmitoleico	palmítico	linoleico	oleico	estearico
var. drymifolia	Mesocarpio	13,05 <sup>ab</sup> ± 0,32	12,49 <sup>ab</sup> ± 2,82	38,73 <sup>a</sup> ± 2,20	18,74 <sup>a</sup> ± 3,68	40,73 <sup>b</sup> ± 1,67	3,90 <sup>ab</sup> ± 0,89
var. drymifolia	Oleosoma	13,49 <sup>a</sup> ± 0,02	16,30 <sup>a</sup> ± 0,89	37,42 <sup>a</sup> ± 0,25	16,36 <sup>ab</sup> ± 0,59	43,29 <sup>b</sup> ± 1,16	2,49 <sup>bc</sup> ± 0,47
var. americana	Mesocarpio	2,56 <sup>d</sup> ± 0,19	6,52 <sup>bc</sup> ± 0,62	39,15 <sup>a</sup> ± 3,89	21,40 <sup>a</sup> ± 1,99	41,72 <sup>b</sup> ± 5,27	5,94 <sup>a</sup> ± 0,04
cv. Hass	Mesocarpio	9,82 <sup>bc</sup> ± 0,40	11,80 <sup>ab</sup> ± 0,88	24,28 <sup>c</sup> ± 1,38	10,59 <sup>b</sup> ± 3,25	60,16 <sup>a</sup> ± 2,69	1,94 <sup>c</sup> ± 0,26
cv. Hass	Oleosoma	9,32 <sup>c</sup> ± 1,68	4,53 <sup>c</sup> ± 3,93	30,92 <sup>b</sup> ± 2,62	15,83 <sup>ab</sup> ± 0,80	53,77 <sup>a</sup> ± 2,90	1,65 <sup>c</sup> ± 1,43
Aguacate	NA	NA	0,00	13,90	13,22	64,87	7,67

minación de perfiles de ácidos grasos mediante GC/MS, la mayoría de los reportes existentes sobre aceite de aguacate han utilizado el método alcalino. Para propósitos de validación comparamos los perfiles de ácidos grasos previamente reportados para el cultivar Hass, obtenidos mediante el método alcalino (Meyer and Terry, 2008; Takenaga *et al.*, 2008; Villa-Rodríguez, 2011; Kilaru *et al.*, 2015) con el obtenido por el método ácido (figura 7.4), en todos los casos, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) lo cual valida el uso del método ácido.

La composición de ácidos grasos de tejidos del mesocarpio de variedades americana y drymifolia, así como del cultivar Hass se muestra en la figura 7.5 y la tabla 7.1. Una clara correlación inversamente proporcional se observa entre los ácidos palmítico y oleico, así como entre los ácidos linoleico y palmitoleico.

El cultivar Hass posee el mayor contenido de ácido oleico y el menor de palmítico y esteárico, mientras que las variedades drymifolia y americana tienen contenidos similares de ácido oleico y palmítico respectivamente un 42 y 38 % para drymifolia, también 41.7 y 39.1 % para americana. La variedad americana posee el mayor contenido de ácidos linoleico y esteárico, mientras que drymifolia posee el más alto contenido de ácido palmitoleico. Las diferencias son evidentes entre aceites obtenidos de mesocarpio y de oleosomas. Los ácidos palmítico y linoleico se encuentran en cantidades superiores y el ácido palmitoleico en cantidades inferiores en el aceite obtenido de oleosoma de Hass comparado con el aceite de mesocarpio del mismo. Por su parte los niveles de ácido palmitoleico son mayores y los de ácido linoleico y esteárico son menores en el aceite de oleosoma de drymifolia en comparación con el aceite de mesocarpio de esta misma variedad.

El aceite de aguacate, como la mayoría de los aceites vegetales, es rico en ácidos palmítico y oleico.

Se ha reportado que los aguacates Hass poseen mucho más ácido oleico ( $> 50\%$ ) que palmítico ( $< 30\%$ ) (Meyer and Terry, 2008; Takenaga *et al.*, 2008; Villa-Rodríguez, 2011; Kilaru *et al.*, 2015) y estos niveles son cercanos a los reportados para el aceite de oliva que tiene altas con-

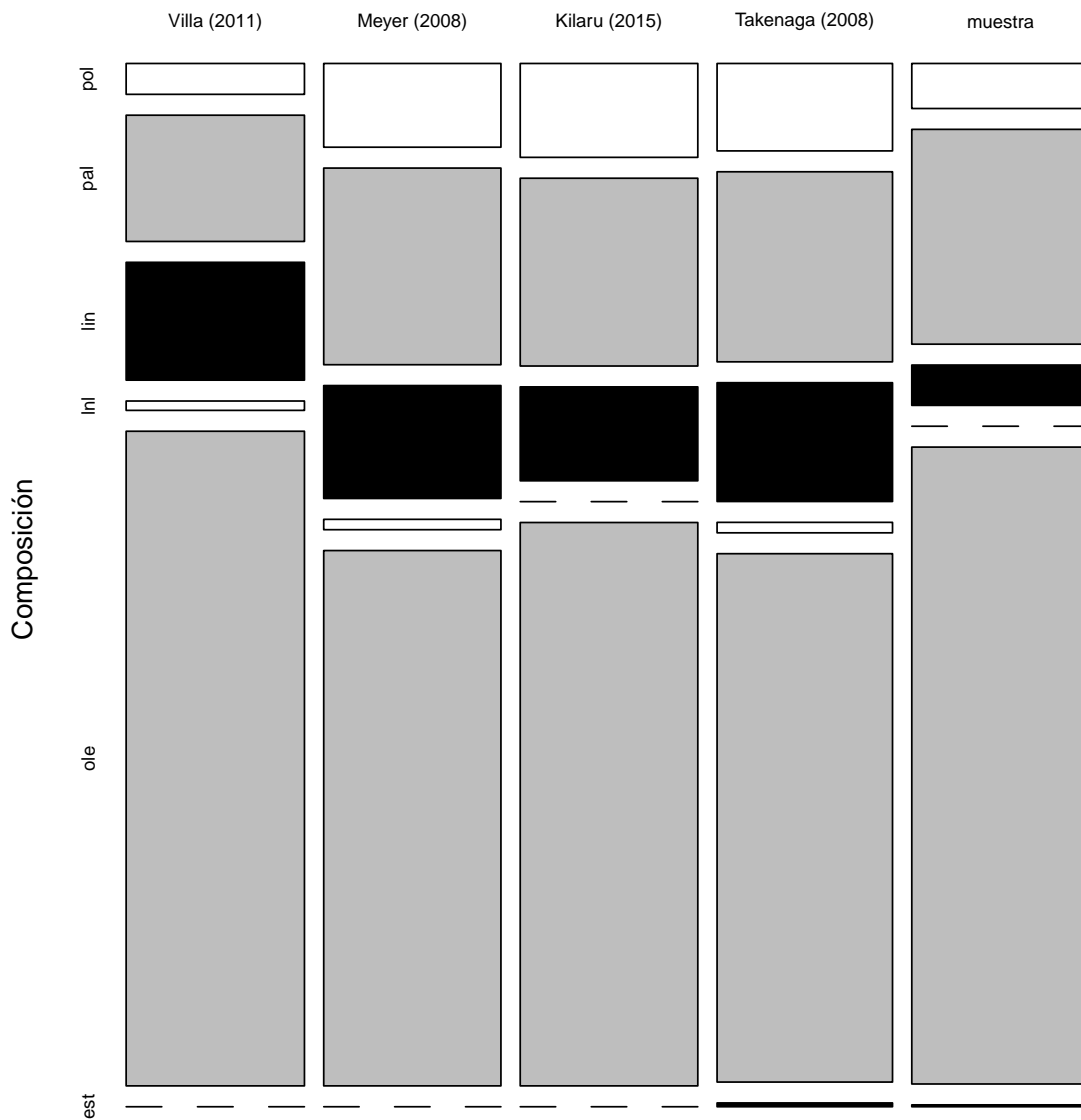


Figura 7.4: Composición de ácidos grasos de aguacate Hass reportado por: Meyer and Terry (2008); Takenaga *et al.* (2008); Villa-Rodríguez (2011); Kilaru *et al.* (2015) y medido por el método ácido. Los ácidos grasos: ole (oleico), pal (palmítico), lin (linoleico), lnl (linolénico) y est (esteárico).

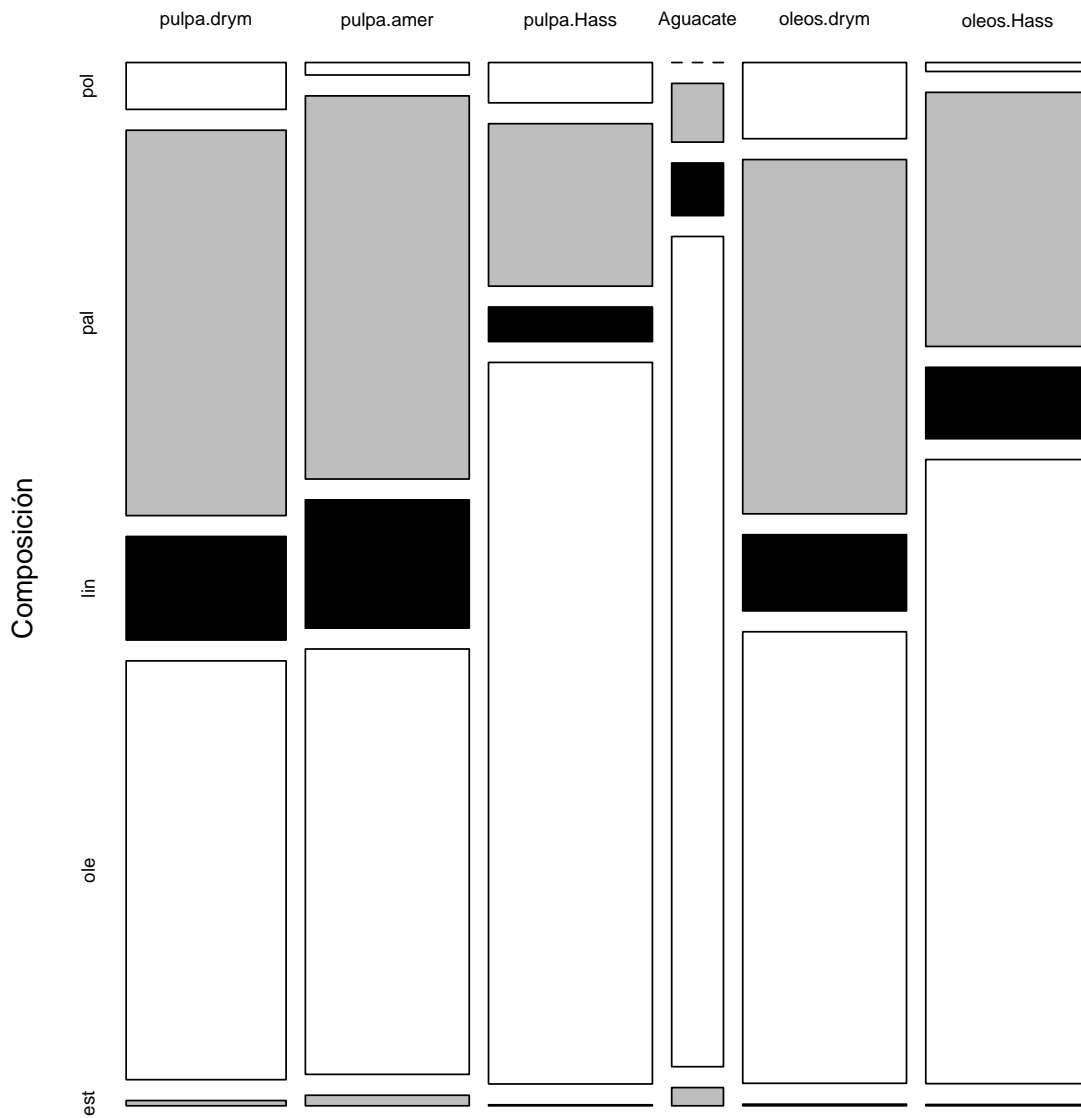


Figura 7.5: Composición de ácidos grasos del aceite de las diferentes variedades; amer (*Persea americana* var. americana), drym (*P. americana* var. drymifolia), Hass (*P. americana* cv. Hass); pulpa (mesocarpo), oleos (oleosoma), y los ácidos oelico (ole), palmítico (pal), palmitoleico (pol), linoleico (lin) y esteárico (est).

centraciones de ácido oleico (~70 %) y bajas concentraciones de ácido palmítico y linolénico (< 16 %)(Gutfinger, 1981). Estos datos pueden explicar las bandas en común observadas para los aceites de oliva y aguacate en las placas de RP-TLC. Las variedades *drymifolia* y americana tienen mucho más ácido palmítico (llegando a alcanzar el 39 % de los ácidos grasos) y mucho menos ácido oleico, con apenas un 42 %.

En el perfil de saturación para las muestras analizadas (figura 7.6) los ácidos grasos saturados (AGS), palmítico y esteárico representan un 40 % del total de ácidos grasos en el mesocarpio de las variedades *drymifolia* y americana, y corresponde al mayor nivel ( $p < 0.05$ ). En contraste, el aceite comercial de aguacate posee el menor nivel con solo 7.6 %. Los ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), palmitoleico y oleico, poseen los valores más altos en el extracto del mesocarpio del cultivar Hass, así como en el aceite comercial de aguacate, alcanzando cerca del 80 % del total de ácidos grasos, mientras que los extractos del mesocarpio de las variedades americana y *drymifolia* poseen solo cerca de 45 % de estos AGMI.

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), linolénico y linoleico, presentaron el contenido más alto en el mesocarpio de las variedades americana y *drymifolia* (alcanzando al rededor del 13 %) y menores en el cultivar Hass (con 3.6 %). El cultivar Hass y la variedad *drymifolia* también mostraron diferencias sensibles entre los extractos de oleosoma y mesocarpio en términos de sus perfiles de ácidos grasos insaturados.

Los resultados de esta investigación son novedosos sobre la composición de los aceites de aguacate, lo que permite establecer características comerciales de interés en las diferentes variedades, como el perfil de saturación de los aguacates de las variedades *drymifolia* y americana que han demostrado un menor porcentaje de AGMI y un mayor porcentaje de AGPI. Trabajos recientes sobre los perfiles de saturación y su efecto en la salud sugieren que reemplazar los AGS de la dieta con AGPI puede tener un efecto moderado en el riesgo de enfermedad cardíaca coronaria, mientras que el efecto de reemplazar los AGS con AGMI es menos evidente (Micha and Mozaffarian, 2010). El nivel de saturación de los ácidos grasos de membrana también ha sido relacionado con aclimatación al frío y esto pudiera explicar las diferencias observadas entre los aceites de oleosoma y mesocarpio, dado que la variedad *drymifolia* que proviene de un clima templado-frío posee más AGPI en el mesocarpio que en el oleosoma mientras que en el cultivar Hass es lo inverso, ya que posee más AGMI en el mesocarpio que en el oleosoma.

La composición de la pulpa de Hass y de sus idioblastos (células de aceite) aislados fue reportada recientemente por Rodríguez-López *et al.* (2017) y la composición de ácidos grasos que obtiene es similar para ambos tejidos. Estos estudios se enfocan a las acetogeninas de

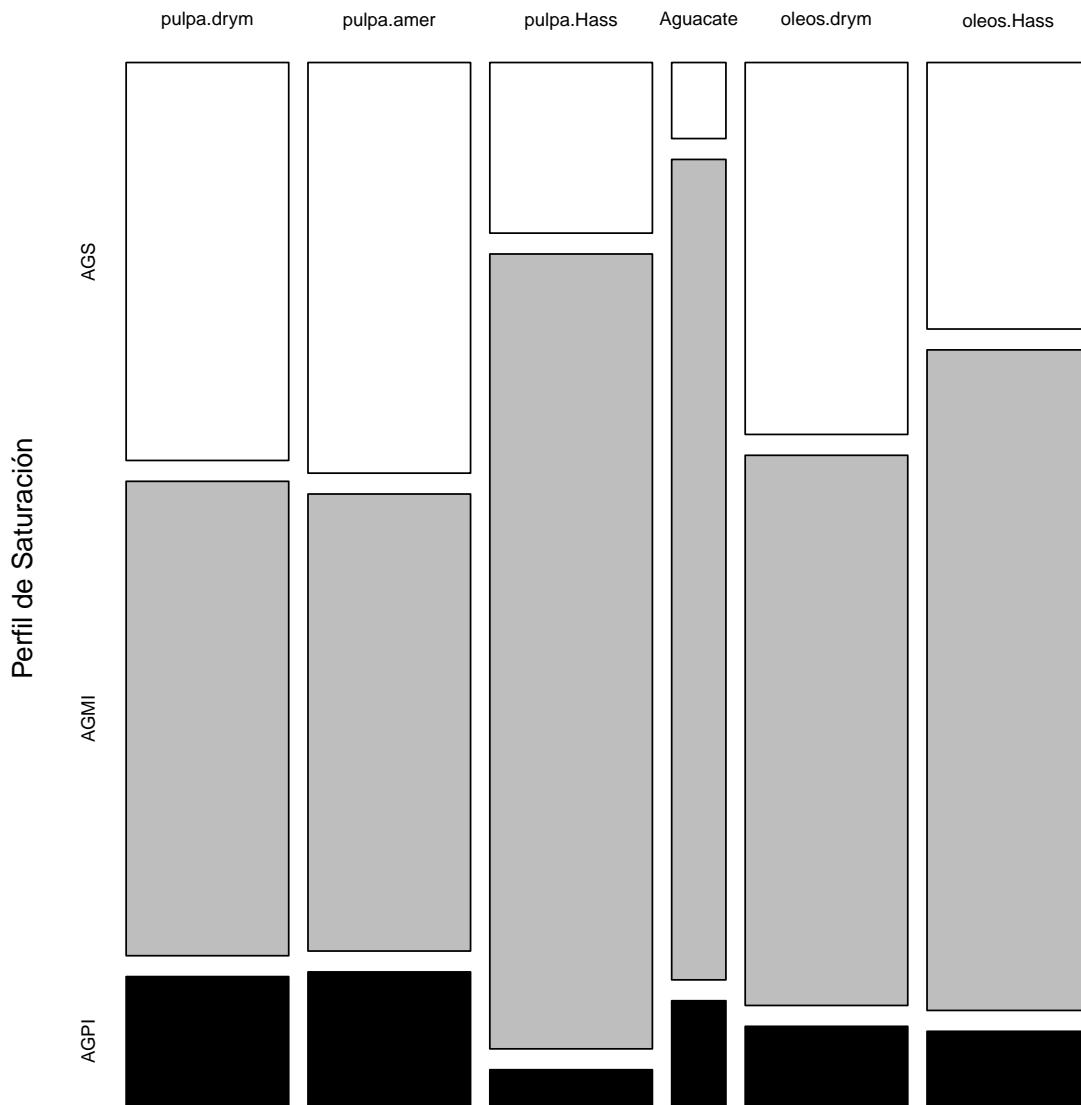


Figura 7.6: Perfil de saturación del aceite de aguacate de las diferentes variedades; amer (*Persea americana* var. americana), drym (*P. americana* var. drymifolia), Hass (*P. americana* cv. Hass); pulpa (mesocarpio), oleos (oleosoma), AGS (ácidos grasos saturados), AGMI (ácidos grasos monoinsaturados), AGPI (ácidos grasos polinsaturados).

aguacate, pero investiga también la composición de ácidos grasos. Los resultados muestran claramente que el oleosoma del cultivar Hass posee mayor contenido en ácido palmítico mientras que el idioblasto contiene los mismos ácidos grasos que el mesocarpio. Otros estudios de los idioblastos y su contenido químico han indicado que estas células contienen un amplio rango de compuestos químicos, incluyendo alcaloides, sesquiterpenos e hidroperóxidos (Platt and Thomson, 1992), indicando que los ácidos grasos no son el componente mayoritario de estas estructuras.

El aceite de aguacate, cuando es extraído por disolventes tanto de mesocarpio como de oleosoma posee un aproximado de 95 % de TAGs, 5 % DAGs y 3 % de otros, el aceite del mesocarpio de aguacate es almacenado en oleosomas, los que poseen una cubierta de proteínas en un complejo oleosoma-oleosina, los resultados de la presente investigación describen el tamaño y el contenido de aceite de los oleosomas, principalmente los de las variedades de aguacate *drymifolia* y *americana*.

#### **7.1.6. Conclusiones**

Se demostró que el contenido más alto de aceite (13 % en peso fresco) es observado en *Persea americana* var. *drymifolia*, el cual posee oleosomas grandes con un tamaño promedio de 21.52  $\mu\text{m}$ .

Los ácidos grasos que componen las variedades *drymifolia* y *americana* de aguacate tienen menos oleico y más palmítico y linoleico en comparación con el cultivar Hass. Este aumento en el contenido de ácidos palmítico y linoleico puede ser una característica útil para incrementar el uso comercial del aceite de estas variedades de aguacate.

Con el contenido de este capítulo se realizó un artículo el cual fue publicado en el Journal of Oleo Sciences (Anexo 10.3).

## **7.2. Análisis de las características moleculares y de expresión de la proteína y del gen de la oleosina del mesocarpio de *P. americana* var. *drymifolia*.**

### **7.2.1. Resumen**

Los oleosomas son las estructuras intracelulares de almacenamiento de lípidos, estos se mantienen como estructuras íntegras incluso en condiciones de deshidratación y estrés por frío, gracias a las proteínas que las recubren, siendo la oleosina la más abundante de ellas y la responsable del comportamiento fisicoquímico de estas gotas de aceite; los oleosomas y las oleosinas han sido ampliamente estudiadas en semillas. El fruto de aguacate es rico en aceites, sin embargo estos no se encuentran en la semilla sino en el mesocarpio. Se encontraron dos genes de oleosinas en mesocarpio de aguacate nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*). Uno corresponde a las oleosinas universales y el otro corresponde a las oleosinas exclusivas de mesocarpio de la familia Lauraceae, esta se expresa abundantemente en el mesocarpio durante el desarrollo del fruto. La inmunodetección mostró la presencia de esta oleosina en los oleosomas de mesocarpio de aguacate. Estos genes son expresados de manera diferencial en los órganos de la planta de aguacate y sus secuencias proteicas muestran diferencias.

**Palabras clave:** Aguacate, oleosina de mesocarpio, oleosomas.

### **7.2.2. Abstract**

Oleosomes are the plant intracellular lipid storage structure, they remain as integral structures even in conditions of dehydration and cold stress thanks to the proteins that covers them, being the oleosin the most abundant and the responsible of the physicochemical behavior of these lipid droplets; oleosomes and oleosins has been widely studied in seeds. The fruit of the avocado is rich in oils, however these are not found in the seed but in the pulp (mesocarp). We found in avocado nativo mexicano (*Persea americana* var. *drymifolia*) two oleosin genes. One corresponds to the universal oleosins and the other corresponds to the exclusive mesocarp oleosins of the Lauraceae family , it is expressed abundantly in mesocarp during fruit development. Immunodetection shown the presence of this oleosin in the avocado mesocarp oleosomes. These genes are differentially expressed in avocado plant organs and protein sequences shown differences.

**Keyword:** Avocado, mesocarp oleosin, oleosomes.

### 7.2.3. Introducción

En 1971 los esferosomas intracelulares reportados en los diferentes estudios sobre células vegetales demostraron poseer un contenido lipídico, Yatsu *et al.* (1971) acuñaron el término 'oleosoma', orgánulos que cobraron relevancia, ya que posteriores estudios confirmaron que los oleosomas eran muy parecidos a las micelas, una matriz de triacilgliceroles, rodeada por una monocapa de fosfolípidos, pero a diferencia de estas, los oleosomas poseen una cubierta de proteínas que evitan la coalescencia (Huang, 1996).

Los oleosomas son la estructura intracelular de almacenamiento de reservas en forma de triacilgliceroles (TAG's) y la proteína mayoritaria en su cubierta, la oleosina es una proteína exclusiva de las plantas. Son una familia de proteínas asociadas a los oleosomas, que presenta una fuerte afinidad a estos orgánulos debido a su estructura terciaria (Huang, 1996).

Las oleosinas pertenecen a una familia de proteínas con un bajo peso molecular (15-27 kDa) que se pueden encontrar en los diferentes tejidos vegetales, poseen una región altamente hidrofóbica con un nudo de prolina intermedio, esta región se pliega formando una horquilla de aproximadamente 70 aa de longitud que atraviesa la capa de fosfolípidos y se ancla en la matriz de triacilgliceroles, la horquilla es el dominio que la define como una oleosina, en los extremos amino y carboxilo terminales presenta regiones altamente variables compuestas por aminoácidos hidrofílicos que confieren una densidad de carga negativa lo cual le permite al orgánulo una capacidad de repulsión y evita la coalescencia de estos, aun cuando se encuentren densamente empaquetados como es el caso de los que se encuentran en semillas (Huang, 1996; Shimada and Hara-Nishimura, 2010).

La familia de las oleosinas agrupa proteínas como la caleosina y la esteroleosina que conservan una horquilla hidrofóbica ligeramente más pequeña y poseen regiones funcionales de unión a calcio y esteroides respectivamente (Chen *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2002).

Se ha demostrado la evolución de las oleosinas a partir de proteínas de membrana que desarrollaron la horquilla hidrofóbica y se ha descrito que estas proteínas aparecen en algas unicelulares y posteriormente se expresan en varios de los tejidos de musgos y plantas vasculares. En *Physcomitrella patens*, un musgo, se describe la presencia de tres transcritos que codifican oleosinas pero también se han observado que posee cinco proteínas de este tipo, lo cual indica la presencia de un mecanismo de edición genética específica denominado "splic-

ing” alternativo (Huang *et al.*, 2009). Algunas de estas oleosinas se expresan de maneras tejido específicas mientras que otras de manera constitutiva, posteriormente en plantas vasculares, se presentan varias oleosinas con diferentes patrones de expresión, tanto las oleosinas como los oleosomas se llegan a observar en diferentes tejidos y en distintos momentos del desarrollo de la planta (Huang *et al.*, 2013; Huang and Huang, 2015).

En el endospermo y embrión de las semillas se encuentran oleosomas densamente empaquetados, que poseen dos tipos de oleosina conocidas como de alto (H) y bajo (L) peso molecular, estas mantienen los aceites de reserva de la semilla en pequeños oleosomas (0.2-5  $\mu\text{m}$  de diámetro), de modo que su contenido sea más accesible a las lipasas y puedan ser utilizados rápidamente durante la germinación, la inhibición de estas oleosinas incrementa el tamaño de los oleosomas e inhibe la germinación de las semillas (Huang, 1996; Shimada and Hara-Nishimura, 2010).

Se sabe que existen oleosinas de expresión constitutiva que se encuentran distribuidas en todos los tejidos por lo que se denominan oleosinas universales (Huang and Huang, 2015)).

En *Arabidopsis thaliana* se ha demostrado la presencia de oleosomas que se forman durante la senescencia de las hojas de roseta, estos oleosomas funcionan como ambiente propicio para la formación de oxilipinas con efecto antifúngico, la presencia de oleosomas en hojas se ha observado en diferentes plantas y a veces con patrones de presencia estacional (Lersten and Czapinski, 2006; Shimada and Hara-Nishimura, 2015).

En la familia Brassicaceae se reporta la presencia de oleosomas en el tapetum de las anteras, en estas células se forman tapetosomas los cuales son oleosomas que almacenan alcanos y flavonoides en su interior, durante la maduración del polen estos tapetosomas colapsan y su contenido recubre los granos de polen otorgándole una capa hidrofóbica además de protección contra la radiación UV (Hsieh and Huang, 2005, 2007).

También hay oleosomas en el mesocarpio de algunos frutos oleogénicos, como en la aceituna (*Olea europaeae*), la palma de aceite (*Elaeis guineensis*) y el aguacate (*Persea americana*); los reportes sobre estos oleosomas han sido variados, para la aceituna se ha reportado que el tamaño de los oleosomas de la semilla (0.5 a 2  $\mu\text{m}$ ) es menor al de los oleosomas del mesocarpio (10 a 20  $\mu\text{m}$ ), también se ha encontrado que los oleosomas de semilla poseen oleosinas mientras que los de mesocarpio carecen de ellas (Ross *et al.*, 1993). Para el caso del fruto de la palma de aceite se han descrito oleosomas muy pequeños en el embrión de la semilla (0.18 a 4.71  $\mu\text{m}$ ) y mucho mayores en el mesocarpio (4.09 a 31.77  $\mu\text{m}$ ) (Ho *et al.*, 2014); en cuanto al aguacate se han reportado la presencia de oleosomas en el mesocarpio

(Platt and Thomson, 1992) y hasta recientemente fue detectada la expresión de una secuencia que codifica para una oleosina en aguacate nativo mexicano (Pliego-Alfaro *et al.*, 2013; Ibarra-Laclette *et al.*, 2015). También se localizó una oleosina en la superficie de los oleosomas del mesocarpio de aguacate Hass, esta oleosina del mesocarpio forma parte de un grupo muy específico de estas proteínas presentes solo en el mesocarpio de miembros de la familia Lauraceae (Huang and Huang, 2016).

En esta investigación se describen dos oleosinas presentes en el aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*), que posee un mayor contenido lipídico que el aguacate del cultivar Hass.

#### **7.2.4. Materiales y Métodos**

##### **7.2.4.1. Secuencias y filogenia**

Las secuencias de aminoácidos de las oleosinas de *Persea*, *Litsea* y *Lindera* fueron obtenidas de Huang and Huang (2016), las de oleosinas de *Persea americana* var. *drymifolia* (PaOLE y PaOLEII), así como las de *Spirogyra grevilleana*, *Cocos nucifera*, *Olea europaea* y *Elaeis guineensis*, se obtuvieron de la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Las secuencias de Huang and Huang (2016) se usaron como referente para alinear a PaOLE y PaOLEII; mientras que las de *S. grevilleana* (3 secuencias), *C. nucifera* (3 secuencias), *O. europaea* (13 secuencias) y *E. guineensis* (10 secuencias) se agregaron para realizar el árbol filogenético; todas las secuencias se procesaron utilizando Bioedit (Hall, 1999) y el algoritmo de Clustal W (<https://www.clustal.org>) para el alineamiento y Mega7 (Kumar *et al.*, 2016) con el algoritmo de Neighbor Joining y bootstrap de 1000 réplicas para el árbol filogenético.

##### **7.2.4.2. Material vegetal**

Frutos de *Persea americana* var. *drymifolia* de 6 meses post antesis (verde), 8 meses post antesis o preclimatérico (verde-maduro) y maduro de consumo o postclimatérico (maduro) fueron colectados en la comunidad de Petembo, Michoacán, México (Latitud 19.1167, Longitud -101.493611), frutos de *P. americana* var. *americana* fueron comprados en el mercado local de Mérida, Yucatán, México y los frutos de *P. americana* cv. Hass fueron adquiridos en el mercado local en Morelia, Michoacán, México. Los frutos una vez en el laboratorio fueron lavados, la cáscara (pericarpio), la pulpa (mesocarpio) y la semilla fueron separados, la pulpa fue molida finamente en nitrógeno líquido y almacenada a - 80 °C hasta su uso.

Tabla 7.2: Oligonucleótidos para los genes utilizados en PCR semicuantitativo

Gen	Fw	Rw	Tm (°C)	Tamaño (pb)
PaOLE	GCCTGGATGTACAGGTATGCTA	CACACGCTTGGTGATCTGTT	60	162
PaOLEII	GGGACTGTCCTGGGTCTACA	TCTCAAGCACCAGGGGCC	64	174
PaFAD	GATGGTCAGGATGACGACCT	TTCTTTGGCCCTGCTTCGAG	62	228
60s	ATGGTGAACGTTCAAAGAC	GAAAAGAGAAGTCCCTTCC	60	315

#### 7.2.4.3. Diseño de oligonucleótidos y de anticuerpos

Se diseñaron oligonucleótidos para la detección de la región variable de los genes de las Oleosinas (PaOLE y PaOLEII), la ACP-desaturasa (PaFAD) y 60s ribosomales (60s) de aguacate nativo mexicano (tabla 7.2) los cuales fueron sintetizados por las empresas INVITROGEN™ (60s) y Elim biopharmaceuticals™ (PaOLE, PaOLEII, PaFAD). Se diseñó también un anticuerpo anti-PaOLE contra los 14 aminoácidos variables de la región amino terminal de la proteína (corchete en la figura 7.7), sintetizado como anticuerpo policlonal en conejo por la empresa Biomatik™.

#### 7.2.4.4. Modelado de la proteína

Se utilizó la secuencia de PaOLE (KF006324) y el software en línea de I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) para realizar ensayos de modelado automático de la estructura tridimensional de la oleosina.

#### 7.2.4.5. Extracción de oleosomas

Los oleosomas fueron separados por el método de Tzen *et al.* (1997) modificado, ya que se realizó solo un lavado con detergente (TWEEN™ 20) y uno con solución iónica (2M NaCl), al final los oleosomas recuperados fueron lavados 2 veces y finalmente resuspendidos en PBS (buffer fosfatos salino; 10 mM fosfatos, pH= 7.4, 9 % NaCl).

#### 7.2.4.6. Citometría de flujo

Los oleosomas fueron diluidos a una densidad óptica de 0.5 a 600 nm y confrontados con el anticuerpo primario anti-PaOLE. y posteriormente se confrontaron con el anticuerpo secundario anti-Rabbit-Fluoresceína (#cat. F2765 de Life technologies™), una vez que fueron enjuagados perfectamente, las muestras se analizaron en un equipo de citometría de flujo (BD Accuri™ C6 flow cytometer).

#### **7.2.4.7. Extracción de proteínas**

Las proteínas del mesocarpio de aguacate fueron extraídas a partir de 100 mg de tejido pulverizado en nitrógeno líquido utilizando el método de Saravanan and Rose (2004), basado en el uso de fenol para separar las proteínas y estas se precipitaron posteriormente con acetato de amonio en metanol.

Una vez extraídas las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford; 10 - 20  $\mu$ g de proteína total por carril fueron separadas en un gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) al 13 % y teñidas con azul de Coomassie.

#### **7.2.4.8. Secuenciación de proteínas**

Un fragmento del gel correspondiente a los  $\approx$  17 kDa (figura 7.10) fue cortado y enviado a secuenciación mediante MS-MS en el laboratorio de proteómica del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados unidad Irapuato (CINVESTAV-Irapuato). Los datos obtenidos fueron analizados con el software TPP (transproteomic pipe line) para tratar de obtener la secuenciación de la proteína.

#### **7.2.4.9. Western Blot**

Las proteínas separadas por el SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de PVDF (Immobilon™ -P 0.45 $\mu$ m de MILLIPORE™) y se realizó una prueba de Western-Blot por el método rápido (Protocolo del fabricante) utilizando anti-PaOLE como anticuerpo primario, anti-Rabbit-AP (7054, Cell Signaling Technology™) como anticuerpo secundario y NBT/BCIP (00-2209 Invitrogen™) como revelador para la detección de la oleosina.

#### **7.2.4.10. Inmunolocalización**

Los oleosomas marcados con fluoresceína que se prepararon para citometría de flujo fueron observados en un microscopio confocal para la observación de la oleosina *in situ*.

#### **7.2.4.11. Reacción en cadena de la polimerasa**

El RNA total del mesocarpio fue recuperado mediante el método de Lopez-Gomez *et al.* (1992), y fue digerido con DNasa (DNase I, Amp Grade, 18068015, INVITROGEN™) para eliminar cualquier rastro de DNA genómico/mitocondrial y posteriormente se utilizó como base para la síntesis de cDNA (SMART™ MMLV Reverse Transcriptase Clontech™) según instrucciones

Tabla 7.3: Características de las oleosinas localizadas en mesocarpio de aguacate nativo mexicano

Nombre	Id Gen	CDS	Id Proteína	aa/kDa	Pi	Horquilla
PaOLE	KF006324	477	AGT63296.1	159/17.47	10.02	15-91
PaOLEII	KX682343	513	ARO50424.1	171/17.71	10.14	42-121

del fabricante. Finalmente se realizó el análisis de la expresión de los genes mediante PCR semicuantitativo partiendo de 100 ng de cDNA y utilizando los oligos correspondientes a los genes problema y de referencia. Los productos de PCR fueron separados en un gel de Agarosa al 1.2 % en TBE 0.5× y observados mediante una tinción con bromuro de etidio 0.1 %. Las imágenes fueron analizadas Mediante el software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

#### 7.2.4.12. Análisis estadístico

Los datos fueron procesados mediante el software estadístico de R (Team, 2017). Los datos crudos de la intensidad de señal obtenidos por ImageJ se ajustaron dividiéndose entre la intensidad de señal del 60s para corregir por la expresión basal y se asignó un valor límite de 0,75 como límite de detección. Estos valores fueron analizados mediante la comparación de Kruskal-Wallis con la función 'kruskal' del paquete 'agricolae' con una  $p \leq 0.05$  para cada gen.

#### 7.2.5. Resultados y discusión

##### 7.2.5.1. Identidad del transcrito

La oleosina de mesocarpio de *Persea americana* var. *drymifolia* (PaOLE) fue identificada en el transcriptoma de fruto de aguacate reportado por Pliego-Alfaro *et al.* (2013) e Ibarra-Laclette *et al.* (2015), con el análisis realizado se demostró la presencia de un segundo unigen el cual codifica otra proteína que también conserva características de la oleosina, la cual fue reportada en el GenBank a través de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y se denominó PaOLEII, las características de ambas secuencias y de sus respectivas proteínas, así como la localización de la horquilla hidrofóbica se muestran en la tabla 7.3.

Las secuencias de aminoácidos inferidas para estas oleosinas fueron alineadas con las reportadas por Huang and Huang (2016), de acuerdo al alineamiento mostrado en la figura 7.7, PaOLEII pertenece a las oleosinas de expresión universal, conserva una identidad de 95.9 % con *Litsea-U* y 98.8 % con *Lindera-U*, mientras que PaOLE solo tiene un porcentaje de iden-

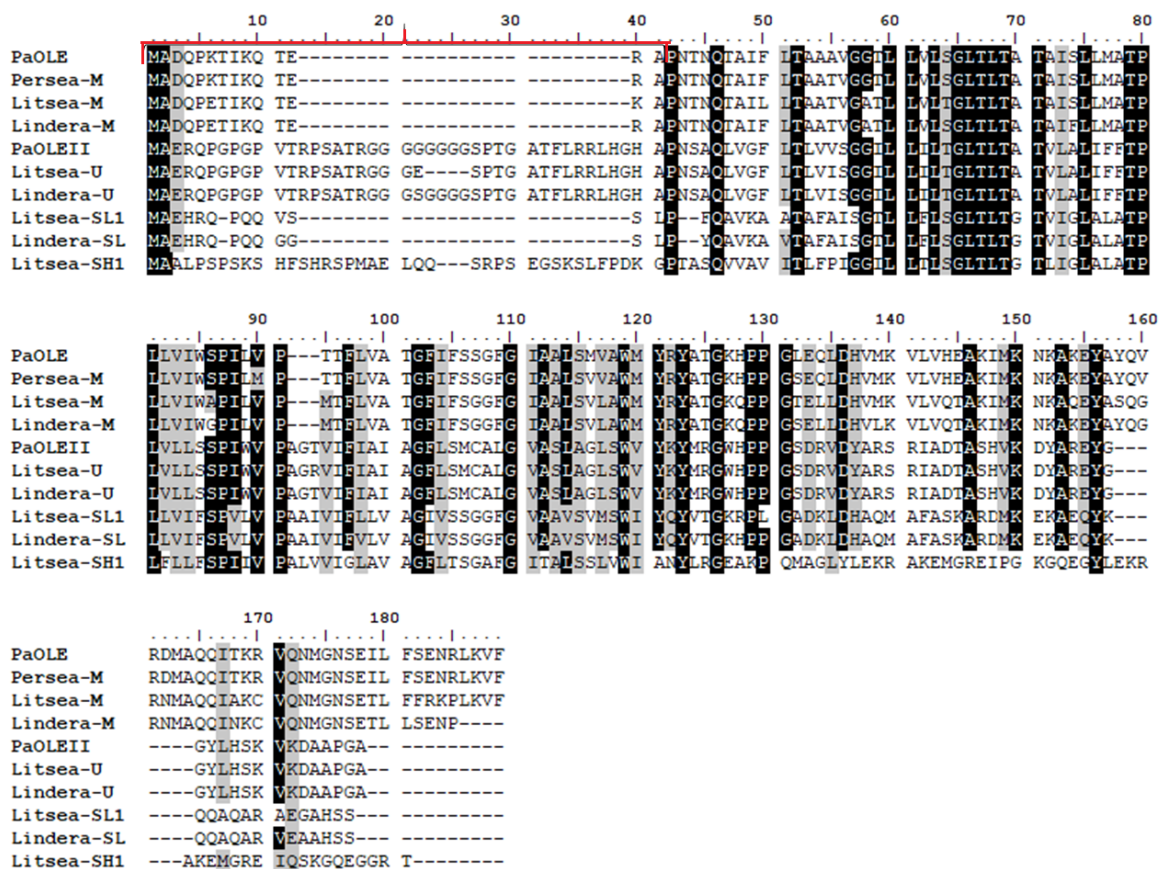


Figura 7.7: Alineamiento de oleosinas de la familia *Lauraceae*, Las oleosinas de *Persea*, *Litsea* y *Lindera* fueron obtenidas de Huang and Huang (2016) y usadas como referencia para la expresión en tejido; mesocarpio (M), universal (U), semilla bajo peso molecular (SL), semilla alto peso molecular (SH), el corchete muestra la región usada en el diseño de anticuerpos.

tividad de 83.0 % con *Litsea-M* y un 83.6 % con *Lindera-M*, cabe recalcar que la identidad que conserva *PaOLE* y *Persea-M* alcanza el 97.4 %, siendo idénticas salvo por cuatro aminoácidos.

El árbol filogenético construido según el análisis realizado figura 7.8 se observa que *PaOLEII* se asocia con las secuencias de oleosinas universales, así como con posibles oleosinas universales de aceituna (*Oeu*) y palma de aceite (*Egu*). Por su parte, en el grupo de las oleosinas de mesocarpio solo se encontraron miembros de la familia *Lauraceae*. El resto de las secuencias de coco, palma y aceituna, se agrupan con las oleosinas de semilla de alto (SH) y bajo (SL) tamaño molecular. Huang and Huang (2015) describieron la evolución de las oleosinas y clasificaron separándolas en oleosinas primitivas (P), universales (U), de semilla de alto y bajo peso (SH y SL respectivamente) y de tapetum (T), esta última solo ha sido descrita en

crucíferas. También fueron los primeros en proponer que la oleosina de mesocarpio de aguacate pertenece a una subfamilia “M” exclusiva de la familia Lauraceae, así como también reportaron secuencias correspondientes a oleosinas de expresión universal (U) y de expresión en semilla (SH y SL), dentro de esta misma familia (Huang and Huang, 2016).

El modelado de la proteína PaOLE no pudo ser completado, en la figura 7.9 muestra el modelo más cercano, en la que se observan las  $\alpha$  - hélices que conforman la horquilla hidrofóbica, así como el nudo de prolina (flecha); sin embargo, la horquilla está mal definida, se pliega sobre sí misma y los brazos amino y carboxilo terminales son demasiado cortos.

Este problema de modelado puede ser debido a que no existen modelos experimentales, ya que el modelado suele depender de un alineamiento sobre una proteína de referencia que ya ha sido cristalizada y posteriormente se realizan ajustes. En el caso de las oleosinas, no se ha reportado la cristalización de ninguna, por lo tanto, todos los intentos de modelado parten de inferencias matemáticas y estadísticas. Sin embargo la mayoría de estos algoritmos asumen un entorno polar como el citoplasma, mientras que la oleosina posee la particularidad de que su horquilla se encuentra inmersa en un medio hidrofóbico, probablemente el incluir la interfase de medios en que se encuentra la oleosina, permitiría mejorar el modelo.

#### **7.2.5.2. Extracción de la proteína y detección de la oleosina**

Las proteínas fueron recuperadas a partir de muestras de mesocarpio y posteriormente estas fueron analizadas con el anticuerpo anti-PaOLE para determinar la especificidad del mismo. A pesar de que las proteínas de aguacate cv. Hass se han recuperado con el método de Kanellis *et al.* (1989), este no dio buenos resultados para la recuperación de proteínas de mesocarpio de la variedad *drymifolia*, por lo cual fue necesario buscar un método más astringente. En este caso, se determinó utilizar el método propuesto por Saravanan and Rose (2004), logrando la separación de la proteína total de mesocarpio de *P. americana* var. *drymifolia* (figura 7.10), la mayoría de las proteínas están por encima del marcador de 26.6 kDa. Sin embargo, se observa un pequeño bandeo por encima de los 16.9 kDa que corresponde con el tamaño esperado de PaOLE (17.47 kDa), esta región fue cortada y se secuenció. Por su parte, el anticuerpo anti-PaOLE detecta una sola banda cercana a esa región.

#### **7.2.5.3. Secuenciación de PaOLE**

Los datos de secuenciación de la proteína fueron analizados pero al no contar con una base de datos de proteínas de fruto de aguacate, se utilizó una base de aproximadamente 30 proteínas

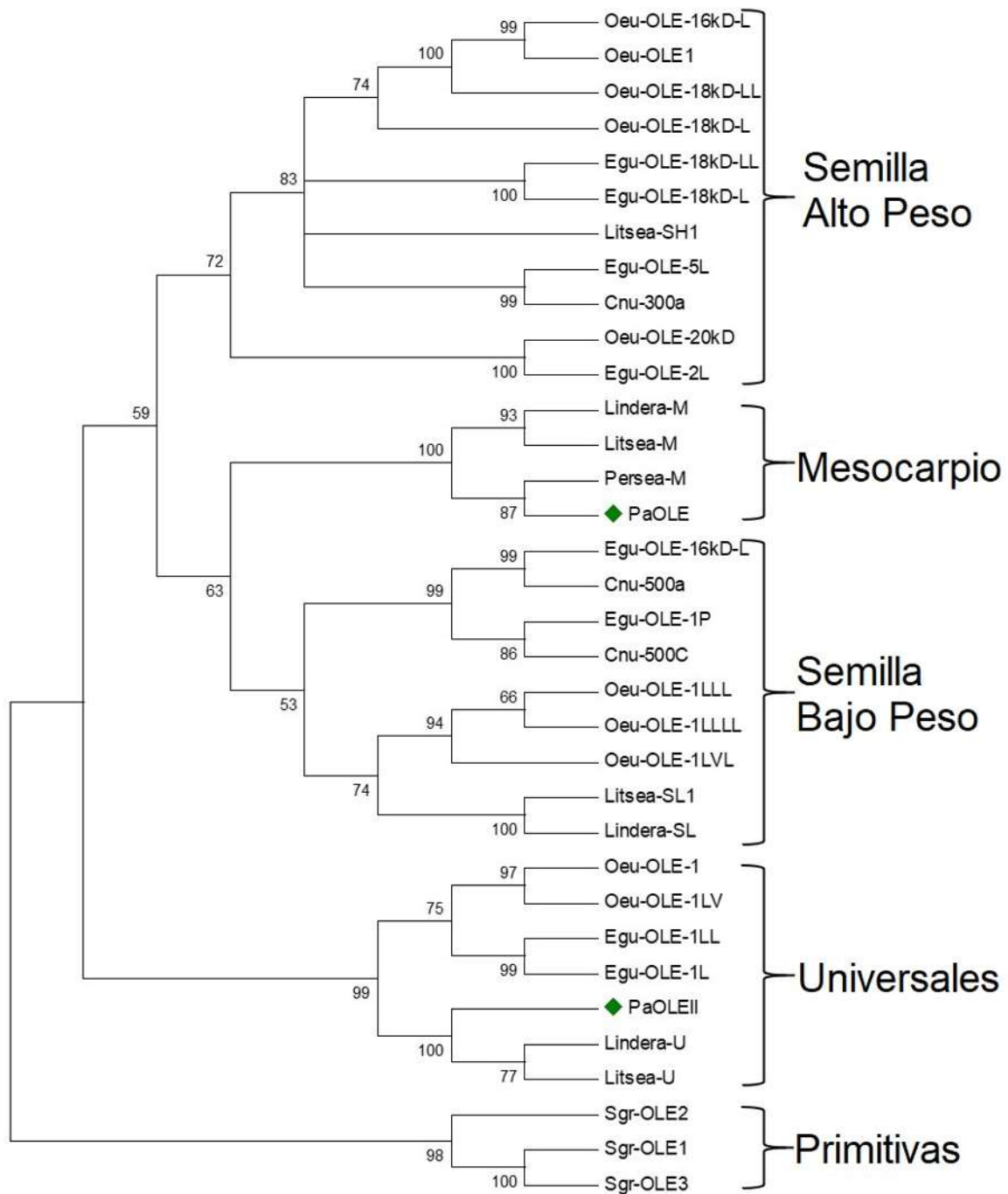


Figura 7.8: Cladograma obtenido mediante Neighbor Joining y bootstrap de 1000 réplicas a partir de las oleosinas de la familia *Lauraceae*. Las oleosinas de *Persea*, *Litsea* y *Lindera* fueron obtenidas de Huang and Huang (2016) y usadas como referencia para la expresión en tejido: mesocarpio (M), universal (U), semilla bajo peso molecular (SL), semilla alto peso molecular (SH). Se agregan las secuencias de *Spirogyra grevilleana* (Sgr), *Cocos nucifera* (Cnu), *Olea europaea* (Oeu) y *Elaeis guineensis* (Egu).

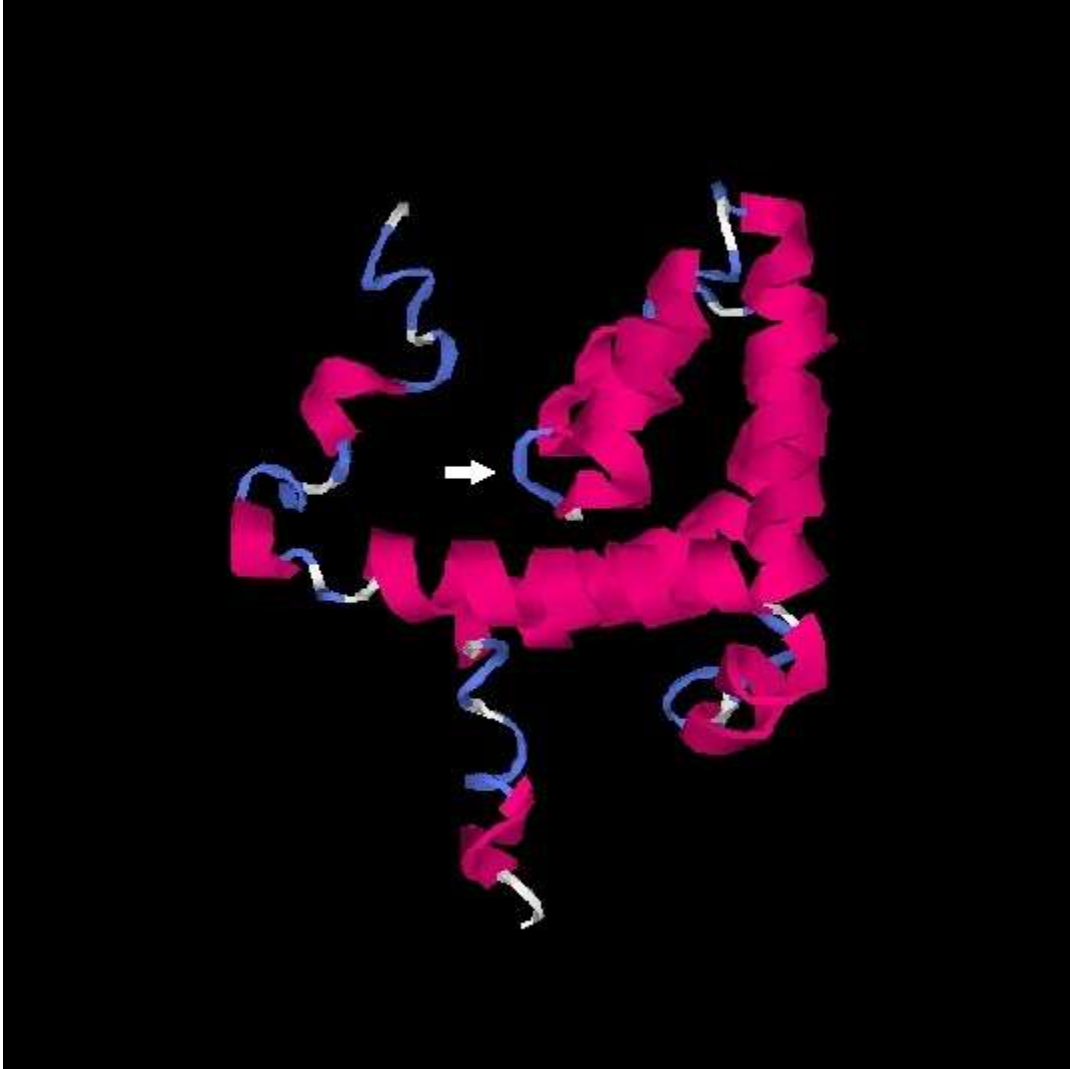


Figura 7.9: Modelo tridimensional de la oleosina, en color magenta las  $\alpha$ -hélices y en azul las vueltas (coil), la flecha horizontal señala el nudo de prolina.

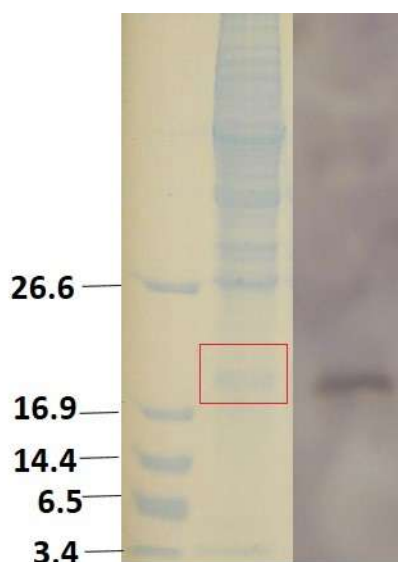


Figura 7.10: Gel de poliacrilamida al 13 % teñido con azul de Coomassie que muestra el marcador de tamaño molecular y la proteína total de mesocarpio maduro de *Persea americana* var. *drymifolia*, así como el respectivo Western-blot, el recuadro rojo marca la región cortada y enviada a secuenciar.

de las cuales cinco fueron proteínas esperadas y algunos controles positivos y negativos, logrando identificar 1329 fragmentos correspondientes a 31 secuencias posibles a partir de la secuencia reportada de PaOLE. Esto significa que se logró identificar en un 50.9% (81 de 159 aminoácidos), posiblemente no se obtuvieron fragmentos de la región hidrofóbica, debido a que la tripsina utilizada en la digestión de la proteína no hace cortes en secuencias hidrofóbicas, sugiriendo que el fragmento restante (aproximadamente 78 aminoácidos) es muy grande para ser detectado en el equipo de MS-MS. Con esta información se obtiene una secuenciación parcial de la oleosina (PaOLE) en las proteínas del mesocarpio de aguacate nativo mexicano.

#### 7.2.5.4. Detección de PaOLE por Wester-blot

El anticuerpo anti-PaOLE se utilizó para identificar la oleosina entre las proteínas de diferentes tejidos de aguacate (*Persea americana* var. *drymifolia*), utilizando partes de la planta (hoja y raíz) así como partes de fruto (pulpa, cáscara y semilla) como se muestra en la figura 7.11. los resultados muestran solo la detección de la expresión en mesocarpio maduro, que concuerda con lo reportado por Huang and Huang (2016), quienes observaron la expresión en el mesocarpio de aguacate (*P. americana* cv. Hass) y también localiza la proteína en los oleosomas

aislados a partir del mesocarpio.

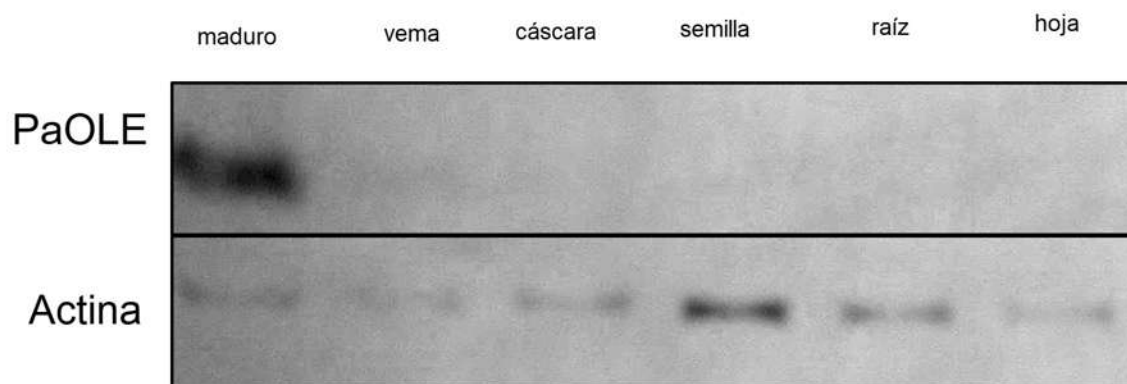


Figura 7.11: Western blot en proteínas de *Persea americana* var. *drymifolia* en diversos tejidos: hoja, raíz, semilla, pericarpio (cáscara), mesocarpio verde-maduro (vema) y mesocarpio maduro. Se utilizó actina como referencia.

Posteriormente se realizó un ensayo con mesocarpio de diferentes variedades de aguacate para detectar este tipo de proteínas en el mesocarpio de *P. americana* var. *drymifolia* en tres estadios de desarrollo (verde, verde-maduro (vema) y maduro), en mesocarpio de *P. americana* var. *americana* (amer) y *P. americana* cv. Hass. Se utilizó un anticuerpo anti-actina como referencia. La mayor intensidad de señal se observó en la variedad *drymifolia* maduro, seguido por *drymifolia* verde y Hass, en *americana* y *drymifolia* verde-maduro se detectó muy poca oleosina (figura 7.12A).

Debido a que la desaparición de la señal de oleosina en la variedad *drymifolia* verde-maduro no era esperada, se aislaron oleosomas para realizar una inmunolocalización con el mismo anticuerpo anti-oleosina como anticuerpo primario y un anti-rabbit con fluoresceína como anticuerpo secundario, posteriormente se realizaron mediciones en un citómetro de flujo y un microscopio confocal para observar la oleosina *in situ*.

#### 7.2.5.5. Análisis de los oleosomas por citometría de flujo

Primero se analizó una muestra de oleosomas sin anticuerpo (figura 7.13) para determinar la distribución y comportamiento basal de estos en el citómetro, este primer ensayo mostró una distribución de tamaños muy marcada, siendo muy abundantes en tamaños pequeño y mediano (de 40 hasta 50 % en cada uno) y escasos en tamaños grandes (< 10 %), además de la presencia de fluorescencia basal en los oleosomas particularmente en el canal rojo, ya que

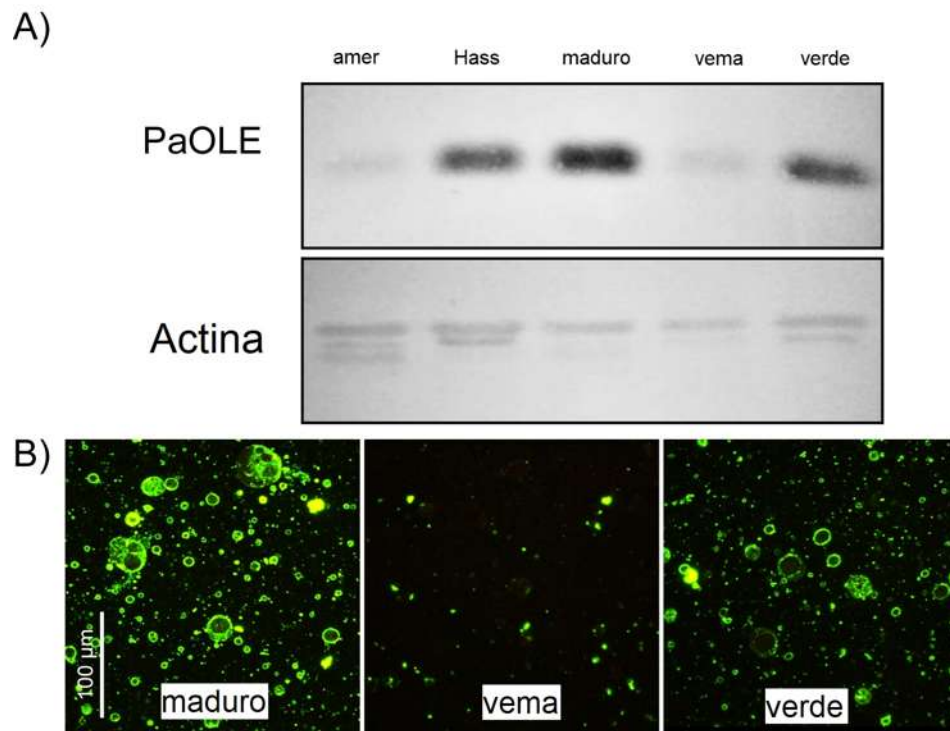


Figura 7.12: Western blot A) en proteínas de mesocarpio e inmunolocalización B) de la oleosina en oleosomas aislados de *Persea americana* var. *drymifolia*; verde, verde-maduro (vema), maduro; *P. americana* cv. Hass y *P. americana* var. *americana* (amer).

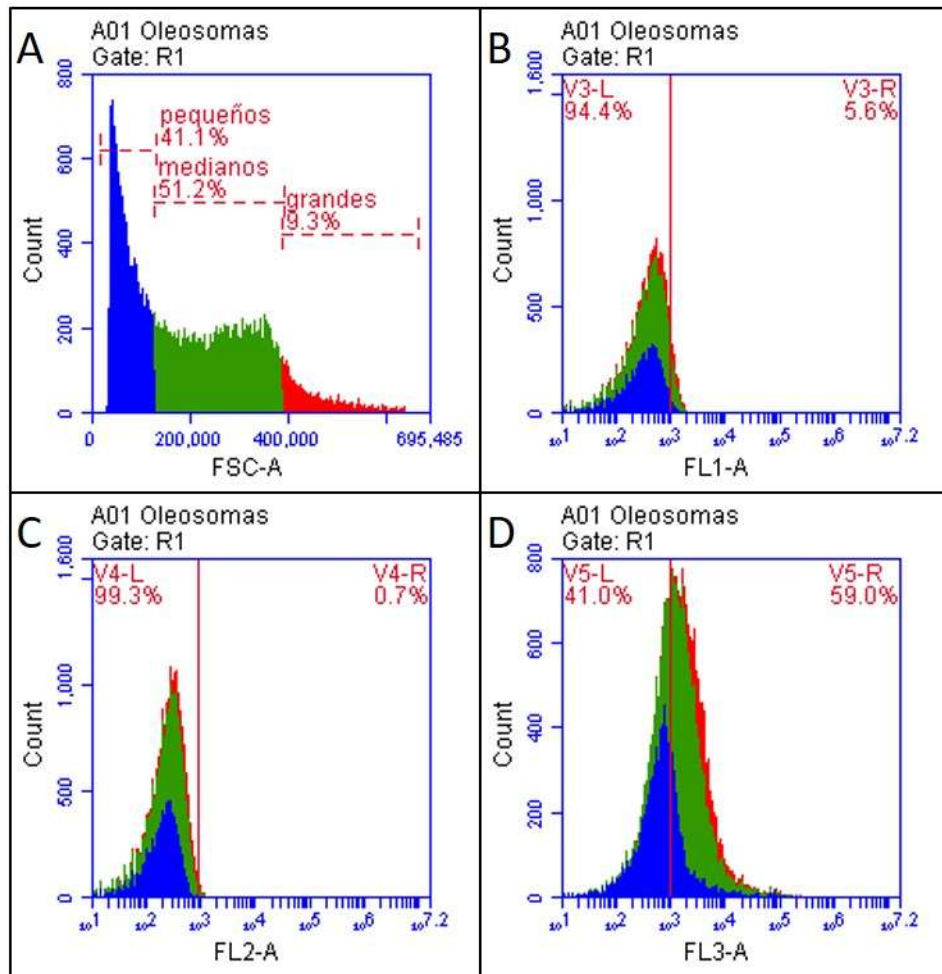


Figura 7.13: Citometría de flujo de oleosomas sin anticuerpo, A) Distribución de tamaños y fluorescencia basal en los espectros verde B), naranja C) y rojo D) de los oleosomas medido en el citómetro de flujo BD Accuri™ C6 flow cytometer.

los orgánulos aislados y sin tinción ni anticuerpos mostraron una tenue, pero inconfundible señal en el detector FL3 que corresponde a fluorescencia en el espectro del rojo; esta señal puede deberse a la presencia de restos de clorofila que se ha reportado puede fluorescer en este espectro.

Una vez añadido el anticuerpo con fluoresceína, este mostró una señal en el espectro del verde que es recibida en el detector FL1, que se observa en la figura 7.14B, mientras que la fluorescencia basal se mantuvo en general sin cambios en los oleosomas aislados de diferentes tejidos (figura 7.14A). La señal del anticuerpo en el detector FL1 tiene el mismo comportamiento que se observó en el western-blot, existiendo una pérdida de señal en el estadio

verde-maduro.

El resultado que se observa en la figura 7.12B corresponde a las imágenes obtenidas con el microscopio confocal para las mismas muestras, en las que se aprecian oleosomas con una amplia diversidad de tamaños: en oleosomas de estadio verde se observa la señal de la proteína distribuida ampliamente en la superficie de los oleosomas; en los de verde-maduro, la señal se observa solamente en pequeños cúmulos, probablemente se trate de oleosomas pequeños, al parecer la proteína deja de cubrir los oleosomas de mayor tamaño o esta es inaccesible para los anticuerpos en este punto específico de desarrollo; mientras que en oleosomas del estadio maduro se observa un incremento en el tamaño de algunos de estos orgánulos y nuevamente la señal es visible en todos los oleosomas y en todos los tamaños.

El aumento de tamaño de los oleosomas durante la maduración no está debidamente documentado, la inmunolocalización de la oleosina en los oleosomas del cultivar Hass fue reportada por Huang and Huang (2016), encontrando abundante oleosina en los oleosomas más pequeños pero escasa en los oleosomas de mayor tamaño; esto es similar a lo que se observó en la variedad *drymifolia* verde-maduro, donde la señal solo se observa en cúmulos pequeños; sin embargo no hay reportes de una presencia de oleosina tan abundante como la observada en las muestras de mesocarpio verde y maduro de la variedad *drymifolia*.

#### **7.2.5.6. Expresión semicuantitativa de los genes de oleosina**

Tratando de entender si la anomalía en la detección de la oleosina tenía que ver con ciclos de expresión del gen de oleosina, se realizó un ensayo de PCR semicuantitativo. En la figura 7.15A se observan los niveles de expresión de los genes en tejidos de *P. americana* var. *drymifolia*, en la que PaOLE carece de expresión en flor (F), embrión (E) y cotiledón (C), mientras que en mesocarpio verde (V) la expresión alcanza su máximo nivel, posteriormente disminuye en mesocarpio verde-maduro (VM) y postclimático (D); en PaOLEII no se detectó expresión en flor, embrión y cotiledón, en mesocarpio verde presenta un leve incremento y posteriormente se apaga en mesocarpio verde-maduro y postclimático. PaFAD se expresa en los tejidos de flor, embrión y cotiledón; muestra un fuerte incremento en mesocarpio verde, y el gen se inactiva en el mesocarpio verde maduro y maduro. Ambas oleosinas presentan una actividad mayor en el mesocarpio verde; sin embargo la expresión del gen PaOLE es superior a la de PaOLEII. La desaturasa PaFAD también tiene un incremento muy marcado en el mesocarpio verde, esto coincide con uno de los momentos de mayor síntesis de lípidos, si bien PaFAD y PaOLE muestran una alta expresión en mesocarpio verde en mesocarpio verde-maduro (vema)

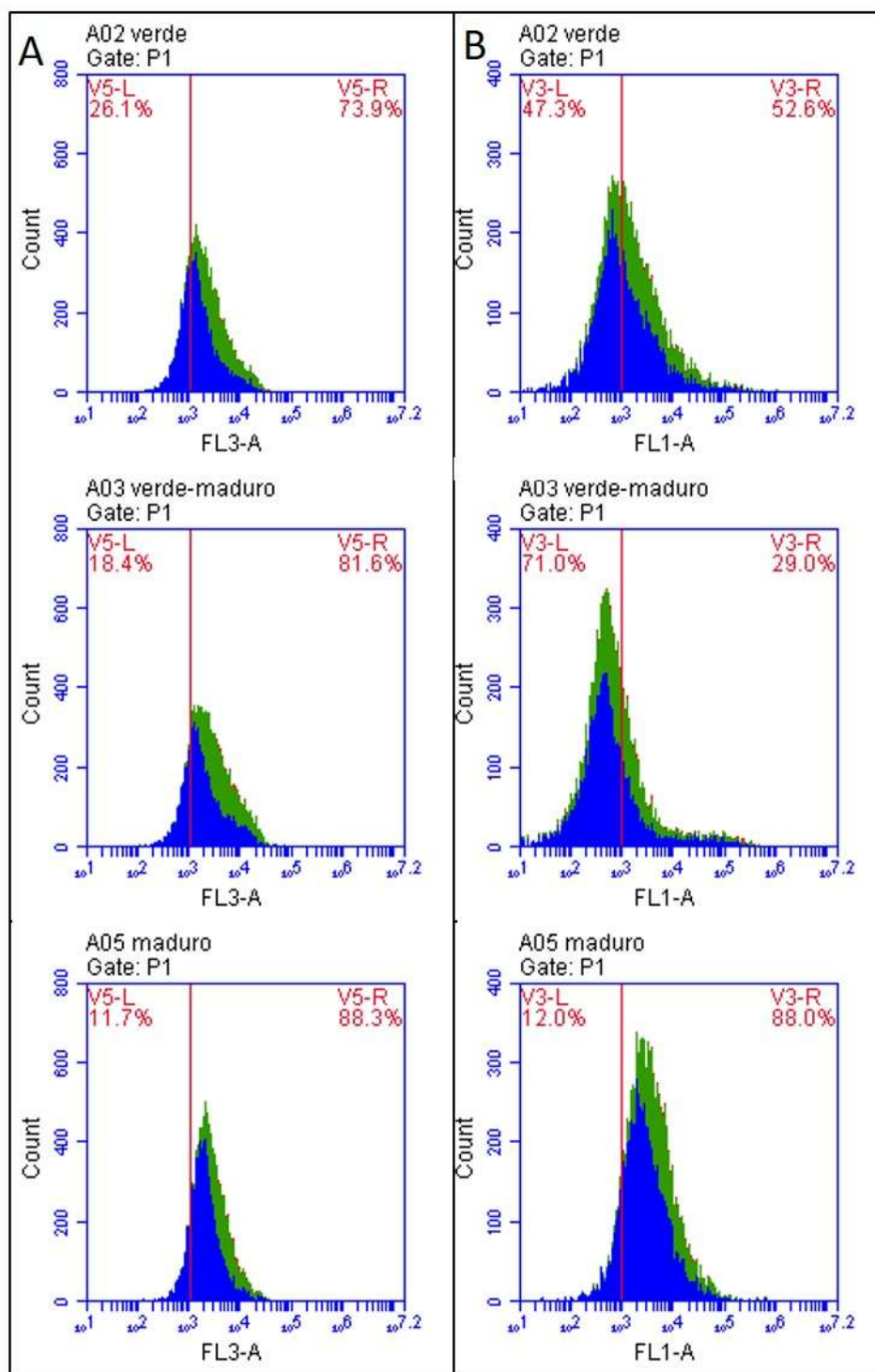


Figura 7.14: Citometría de flujo de los oleosomas tratados con los anticuerpos anti-PaOLE y anti-Rabbit-Fluoresceína, se mide la fluorescencia en los canales A) rojo y verde B) para los oleosomas aislados de mesocarpio verde, verde-maduro y maduro.

la oleosina se sigue expresando mientras que la actividad del gen de PaFAD ya ha caído por debajo del nivel de detección. Esto sugiere la posibilidad de una correlación entre la síntesis de lípidos y el contenido de oleosina, aunque faltarían más datos para confirmarla.

En la figura 7.15B se muestra la expresión de los genes en mesocarpio maduro de las variedades americana (A), *drymifolia* (D) y del cultivar Hass (H), con una mayor expresión de PaOLE en la variedad americana (A), mientras que *drymifolia* y Hass se encuentran por debajo del límite de detección; también el gen PaFAD presenta un comportamiento similar con actividad en americana y sin detección en *drymifolia* y Hass. PaOLEII se mantuvo debajo del límite de detección en las 3 muestras.

Es notoria la caída de los niveles de expresión en mesocarpio de *drymifolia*, todos los genes que analizamos presentan ese comportamiento, el cual puede ser debido al climaterio, se sabe que el gen de oleosina se inactiva durante el climaterio lo que puede deberse a la presencia del gas etileno (Ibarra-Laclette *et al.*, 2015). La expresión genética observada en la variedad americana puede estar relacionada con una menor producción de etileno durante el climaterio y por ende una inhibición incompleta y tardía de los genes.

Cuando buscamos a la oleosina con el anticuerpo, algo inhibe la detección de la oleosina en el estadio verde-maduro, sin embargo, la síntesis del gen solo presenta un pico de actividad y una caída posterior, no es posible que la detección de la oleosina en el estadio maduro se deba a una nueva síntesis de la proteína, por lo tanto, la caída en la señal de oleosina pudiera estar relacionada con alguna interacción en la región amino-terminal de PaOLE. Lee *et al.* (1994) propusieron la posibilidad de que las oleosinas formaran mono o heterodímeros en maíz, esta propuesta se ha mantenido sin que a la fecha se tenga evidencia para confirmar o refutar dicha interacción (Huang and Huang, 2015).

Por otra parte en la tabla 7.4 se muestran los patrones de expresión obtenidos en el análisis del transcriptoma para los genes de PaOLE y PaOLEII (Ibarra-Laclette *et al.*, 2015), la variación en ambos casos es independiente, sin embargo PaOLE tiene un aumento de expresión muy drástico en el fruto preclimatérico alcanzando 1037.84 RPKM, PaOLEII también presenta un aumento aunque menos marcado en raíz (17.21 RPKM), semilla (12.71 RPKM) y fruto (47.51 RPKM), esto y los resultados de la presente investigación apoyan la idea de que PaOLE es una oleosina inducible que se expresa en el mesocarpio, mientras que PaOLEII pueda ser una oleosina de expresión constitutiva.

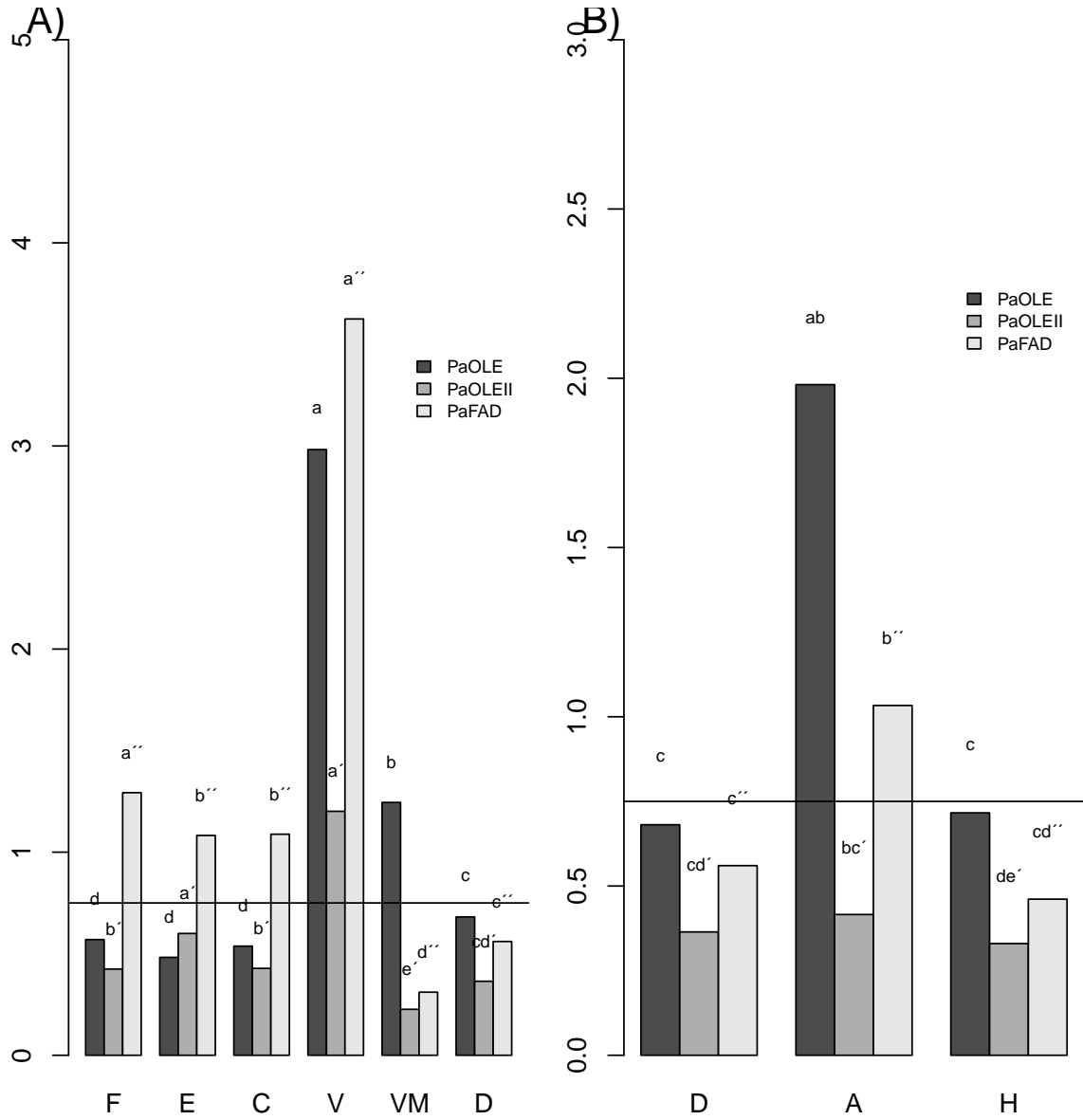


Figura 7.15: Expresión genética en tejidos A) flor (F), embrión (E), cotiledón (C), y mesocarpio verde (V), verde maduro (VM) y maduro (D) de *Persea americana* var. *drymifolia*, así como mesocarpio maduro B) de *P. americana* var. *americana* (A) y *P. americana* cv. Hass (H). Letras diferentes indican valores significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) calculados para cada gen.

Tabla 7.4: Expresión (RPKM) de los unigenes correspondientes a las oleosinas reportadas, con datos de Ibarra-Laclette *et al.* (2015).

	Hojas	Brote	Raíz	Flor	Semilla	Fruto
PaOLE	4.33	7.58	0.85	11.71	4.98	1037.84
PAOLEII	1.89	1.4	17.21	1.94	12.71	47.51

### 7.2.6. Conclusión

Se demostró la expresión de dos oleosinas en el mesocarpio de aguacate nativo mexicano: PaOLE específica del mesocarpio de las Lauraceas y PaOLEII, una oleosina de expresión universal. Se logró secuenciar la proteína PaOLE con una cobertura del 50.9 % y se localizó en la superficie de los oleosomas del mesocarpio. Los oleosomas del mesocarpio postclimatérico se encuentran completamente recubiertos por PaOLE.

## 8. Discusión general

El aguacate es un producto comercial que ha ganado mercado con unos cuantos cultivares (Hass, Fuerte y Bacon principalmente). Comparado con los reportes de Whiley *et al.* (2002), la variedad *drymifolia* presenta rendimientos más altos en cuanto al contenido de aceite, llegando a superar el 44.23 % de aceite en base seca. Además la composición de aceites también es diferente entre lo reportado para estos cultivares y la variedad *drymifolia*, esta contiene una mayor cantidad de ácidos linoleico y linolénico. Esta combinación de mayor rendimiento en el contenido de aceite y mejor perfil de ácidos grasos convierten a la variedad *drymifolia* en un interesante cultivo que puede atraer la atención de los mercados, ya sea para su comercialización en fresco o para la obtención de aceites.

La presencia de una segunda oleosina de expresión universal es un dato importante, ya que se ha demostrado también que incluso en musgos (*Physcomitrella patens*) se encuentra más de una oleosina (Huang *et al.*, 2009).

Cuando Ross *et al.* (1993) realizaron los ensayos de inmunolocalización de oleosinas en mesocarpio de aguacate y aceituna diseñaron anticuerpos, purificando la oleosina a partir de semillas, aunque el diseño fue contra proteína completa, se ha demostrado que las oleosinas pueden pertenecer a 6 subfamilias (Huang and Huang, 2015, 2016) y que los anticuerpos diseñados contra una oleosina pueden detectar oleosinas de esa familia pertenecientes a otras especies antes que oleosinas de otra familia en la misma especie. Esto puede explicar el por qué un anticuerpo diseñado contra una oleosina (posiblemente de una de las familias de alto o bajo peso en semilla) en aceituna no puede detectar oleosinas de mesocarpio ni en aceituna (donde a la fecha siguen sin reportarse) ni en aguacate, de las que se ha demostrado su presencia de acuerdo con las investigaciones realizadas por Huang and Huang (2016) y a los resultados del presente estudio.

Huang and Huang (2016) inmunolocalizaron la oleosina en los oleosomas del mesocarpio del fruto de aguacate (*P. americana* cv. Hass) y encontraron que los oleosomas más pequeños poseen oleosina. Sin embargo los oleosomas más grandes no presentan señales de esta proteína, lo que concuerda con el reporte de Horn *et al.* (2013), en el cual detectan la presencia de pequeñas cantidades de oleosina en mesocarpio de Hass. La abundancia de las proteínas LDAP1 y 2 les llevaron a concluir que los oleosomas de mesocarpio de aguacate (cv. Hass) dependen de estas proteínas y no de la oleosina para su estabilidad.

En el caso de aguacate variedad *drymifolia*, la cobertura de los oleosomas es similar a la re-

portada por Huang and Huang (2016) pero solo en oleosomas aislados del mesocarpio verde-maduro o preclimatérico, tanto oleosomas aislados de mesocarpio verde (6 meses post anthesis) como del mesocarpio maduro (postclimatérico) la presencia de oleosina es muy alta y cubre completamente el oleosoma sin importar su tamaño.

La cantidad de oleosina observada en mesocarpio maduro de la variedad *drymifolia* es mayor a la que se detectó en el cultivar Hass. Los oleosomas de la variedad *drymifolia* son más estables que Hass, ya que en este último se observó que los oleosomas son grandes e indefinidos, mientras que los de la variedad *drymifolia*, a pesar de formar racimos mantienen sus paredes individuales y su tamaño es menor que los observados en aguacate Hass.

Una mayor cantidad de oleosina y oleosomas más pequeños fueron relacionados con un mejor rendimiento de aceite en la palma de aceite (*Elaeis guineensis*) (Ho *et al.*, 2014) lo que se confirmó en los tejidos de aguacate variedad *drymifolia* frente al aguacate Hass. Para el caso concreto de la variedad americana es posible que su bajo contenido de aceite esté determinado por su adaptación a climas tropicales y bajas altitudes.

## 9. Conclusión general

Se demostró la presencia de oleosomas en las células del mesocarpio de aguacate nativo mexicano (*P. americana* var. *drymifolia*), los que están compuestos por más de 95 % de triacilgliceroles y estos a su vez poseen cantidades similares de ácidos palmítico y oleico, así como cantidades menores de ácidos esteárico, linoleico y palmitoleico.

El oleosoma de aguacate de la variedad *drymifolia* posee un aproximado de 5 % de fosfolípidos y una cobertura de oleosina que se observa completa en el mesocarpio postclimatérico.

Esta oleosina de expresión en las células del mesocarpio solo se ha encontrado en miembros de la familia Lauraceae y su mayor expresión ocurre en las células del mesocarpio verde, al mismo tiempo que la mayor expresión del gen de la desaturasa (PaFAD).

## **10. Anexos**

Publicaciones realizadas durante la presente investigación:

### **10.1. Artículo de divulgación científica.**

**Fernando Sánchez Albarrán** y Rodolfo López Gómez. 2015. Aceites vegetales: su importancia en la salud. *Saber más*, 4(23):14-16. <https://www.sabermas.umich.mx/archivo/articulos/185-numero-2311/358-fernando-sanchez-albarran-y-rodolfo-lopez-gomez.html>

### **10.2. Capítulo de libro.**

Luis María Suárez-Rodríguez, **Fernando Sánchez-Albarrán**, Huber León-Corona and Rodolfo López-Gómez. 2017. *Advances in Seed Biology* (Ed. Jose C. Jimenez-Lopez). Chapter 3. Transcriptome (ESTs) of Avocado “Native” Mexicano Early Seed Development Shows Abundance of Regulatory, Antioxidant and Defense Genes. pp. 324-360. DOI: 10.5772/intechopen.70573

### **10.3. Artículo científico.**

**Fernando Sánchez-Albarrán**, Rafael Salgado-Garciglia, Jorge Molina-Torres and Rodolfo López-Gómez. 2019. Oleosome oil storage in the mesocarp of two avocado varieties. *Journal of Oleo Science*, 68(1):87-94. DOI: 10.5650/jos.ess18176

# ACEITES VEGETALES:

## Su Importancia en la Salud

Fernando Sánchez Albarrán y  
Rodolfo López Gómez



Desde las deliciosas frituras que truenan al ser sumergidas en aceite, hasta los “saludables” aderezos que se ponen sobre las ensaladas, casi toda nuestra comida está relacionada de una u otra forma con el aceite. Pero los aceites no solo están presentes en la mesa, los utilizamos para dar vitalidad y brillo al cabello, para “combatir los signos de la edad”, incluso para conseguir la suavidad en la piel o poniendo el hombro en la lucha contra la dependencia del petróleo, la rueda de la historia humana está engrasada con aceite.

Dejando de lado los derivados del petróleo y los denominados “aceites minerales”, el resto de los aceites son componentes derivados de las plantas, es decir aceites vegetales, los que son extraídos generalmente de la reserva alimenticia de las semillas. Éstos no deben ser confundidos con los aceites esenciales, también producidos por las plantas, en particular por las aromáticas, cuyos componentes son moléculas lipídicas responsables de su olor y con propiedades medicinales.

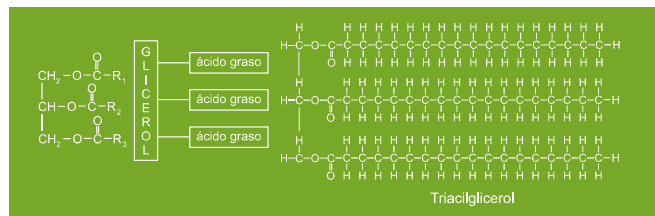
Muchos de los aceites vegetales son una fuente saludable de energía e incluso algunos son considerados esenciales para el funcionamiento del cuerpo humano, ya que son los precursores de hormonas e incluso de algunos neurotransmisores, sin los cuales no lograríamos funcionar, ni sobrevivir.



Existen también aceites vegetales que no son aptos para el consumo humano, pero que han permitido el desarrollo de lubricantes, componentes de cosméticos e incluso son utilizados en la producción de biodiesel.

### Pero a todo esto, ¿qué es un aceite?

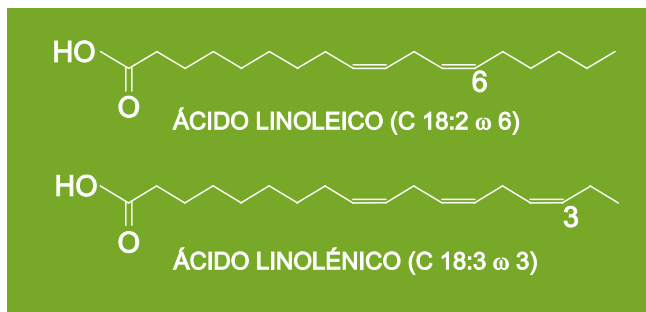
Los aceites y las grasas son ésteres de glicerol y tres ácidos grasos. El glicerol es una molécula que posee 3 carbonos y cada uno cuenta con un oxígeno, en esta molécula es donde se unen los ácidos grasos por enlaces denominados tipo éster. Los ácidos orgánicos se representan como  $O_2C-R$ , porque tiene 2 oxígenos dispuestos para el enlace y una cadena (R) hidrocarbonada que puede presentar insaturaciones (dobles enlaces entre carbonos). Es precisamente en la longitud de estas cadenas y en las insaturaciones, en donde radica la diferencia, por esta estructura son denominados triacilglicéridos o triglicéridos, aunque lo más correcto es triacilglicerol.



Las grasas de origen animal tienen cadenas cortas (de 3-8 carbonos) y medianas (10-16 carbonos), la mayoría son saturadas (sin dobles enlaces); esto las hace sólidas a temperatura ambiente, se les conoce como grasa o manteca.

Los aceites vegetales suelen poseer cadenas más largas (16-24 carbonos) y con una o varias insaturaciones, lo que los convierte en líquidos de alto punto de ebullición. Son precisamente los aceites de cadena larga y con varias insaturaciones (poliinsaturados), los que nuestro cuerpo no puede producir y por ello es indispensable suministrarlos en la dieta; los famosos omega-3 y omega-6 que se promocionan en los productos y les proporcionan un valor agregado, son los más codiciados y que se pueden obtener de productos tan accesibles como semillas y frutos secos (nueces y almendras son ricos en este tipo de aceites).

El ácido graso omega-6 de 18 carbonos cuya fórmula es C 18:2 ω 6, es una molécula con dos insaturaciones o bien con dos dobles enlaces, la letra ω (omega) indica que la posición del primer doble enlace está situado entre los átomos de carbono 6 y 7, que se establece contando los carbonos desde el final de la cadena, es por ello que se le denomina omega-6. También se le conoce como ácido linoleico y es uno de los ácidos grasos indispensables para la vida, debiéndolo obtener de los alimentos, puesto que el organismo es incapaz de formarlo, por ello se le llama esencial. Otro ácido graso poliinsaturado, es el ácido linolénico (C 18:3 ω 3), conocido como omega 3, presenta tres dobles enlaces, con un primer doble enlace entre los carbonos 3 y 4.



Los omega 6 disminuyen el colesterol malo, o de baja densidad (LDL) y los omega 3 disminuyen además los niveles de los triglicéridos, ambos tienen un efecto vasodilatador y antiagregante plaquetario. Estos ácidos grasos son los precursores de otros ácidos grasos de la serie omega 6 y omega 3, como el ácido araquidónico (C 20:4 ω 6), ácido eicosapentanoico (C 20:5 ω 3) y el ácido docosahexaenoico (C 22:6 ω 3), que tienen un papel muy importante en múltiples funciones de la célula, desarrollan un papel importante en la inflamación, en la agregación de las plaquetas, en

el sistema de defensa y son fundamentales en el desarrollo del cerebro y la retina.

## ¿Por qué las plantas los producen?

Los aceites son, junto con el almidón, las principales fuentes de energía para la germinación de las semillas, prácticamente todas las semillas poseen una alta concentración de estos componentes y les permiten sobrevivir a las diferentes condiciones ambientales (sequías y frío invernal), para llegar a germinar y producir una nueva planta. Pero además, hay frutos como el aguacate y la oliva o aceituna, que producen y almacenan aceites vegetales en el mesocarpio, la pulpa carnosa que nos comemos.

Aún existe discusión de la función del aceite en estas plantas, ya que están almacenados lejos de la semilla, sugiriendo que no son indispensables para la germinación de éstas; el consenso actual es que almacenan estos aceites para usarlos como cebo o carnada para que los animales que los consumen dispersen las semillas de estas plantas permitiéndoles diseminarse.

## Fuente de aceites vegetales

Los aceites más comunes provienen de las semillas, así el aceite de girasol, de canola o maíz llegan a nuestra mesa a través de la extracción (mecánica o química) a partir de la semilla de estas plantas; pero como se mencionó anteriormente, también hay aceites provenientes de frutos como el aguacate, la oliva o la palma de aceite. Estos frutos tienen una gran cantidad de aceite en su pulpa y también han sido aprovechados como componentes alimenticios y cosméticos.



Usos Principales	Usos Específicos	Fuentes
Alimenticios	Aceite para cocinar (Doméstico)	Maíz, Girasol, Canola, Aguacate
	Aceite para cocinar (Industrial)	Palma y Coco
	Aderezo	Oliva y Aguacate
	Aditivo (Hidrogenados)	Palma y coco
	Saborizantes	Canela, Cítricos, Menta
Industrial	Biodiesel	Maíz, Colza y Jatrofa
Cosméticos	Humectantes y emulsificantes	Oliva, Aguacate, Almendra, Uva
Medicinales	Se utilizan principalmente aceites esenciales con un bajo contenido de triglicéridos	Lavanda, Romero, Sándalo

## Lo esencial del consumo de aceites vegetales

Nuestra sociedad está inmersa en una moda que rechaza cualquier mención a las grasas y aceites, considerándolos un problema y tratando de eliminarlos de la dieta. En nuestra carrera de productos "light" y bajos en grasas, hemos dejado de lado la importancia del balance y la correcta alimentación, es por ello que observamos problemas de salud relacionados con la falta de ácidos grasos esenciales y actualmente comienza a ser un problema de salud que llega a la clasificación de grave.

Con el bajo consumo de estos aceites, se presentan los primeros síntomas como la debilidad y pérdida de cabello, resequedad y fragilidad en la piel, y existe evidencia que la falta de ácidos grasos esenciales puede llegar a producir problemas cardiovasculares graves que incluyen el aumento en niveles de colesterol y triacilglicéridos, así como arritmias y falla cardíaca. Incluso, pueden observarse efectos a nivel neurológico como el síndrome de déficit de atención o problemas en el desarrollo neuronal en los niños.



Aceites vegetales: su importancia en la salud

Es por esto, que es necesario entender la importancia que tienen los aceites vegetales e incluirlos de manera responsable en nuestra dieta. Como muchos de los problemas de la alimentación humana, el eje del asunto está en balancear la cantidad con la calidad. Es mucho más provechoso comernos unas cuantas nueces sin procesar, que consumir aceites procesados -es mucho más saludable consumir una rebanada de aguacate o algunas aceitunas que gastar mucho dinero en suplementos alimenticios que nos proporcionarán tal vez los mismos aceites esenciales-.

Así, los aceites están a disposición de nosotros y tal vez podamos llegar al día en que seamos capaces de aprovecharlos en todas sus posibilidades, alimenticias, cosméticas e industriales para la mejora de nuestra vida. ■

### Para saber más:

Agüero DS, Torres GJ y Sanhueza CJ. 2015. Aceites vegetales de uso frecuente en Sudamérica: características y propiedades. *Nutrición hospitalaria*, 32(1):11-19. <http://doi.org/10.3305/nh.2015.32.1.8874>.

Rodríguez-Cruz M, Tovar RA, del Prado M, Torre N. 2005. Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud. *Rev. Invest. Clín.*, 57(3):may./jun. <http://www.scielo.org.mx/pdf/ric/v57n3/v57n3a10.pdf>

Valenzuela BA, Sanhueza CJ, Nieto KS. 2002. ¿Es posible mejorar la calidad nutricional de los aceites comestibles?. *Rev. Chil. Nutr.*, 29(1). [http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-75182002029100002&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-75182002029100002&script=sci_arttext)

Valenzuela BA, Morgado TN. 2005. Las grasas y aceites en la nutrición humana: algo de su historia. *Rev. Chil. Nutr.*, 32(2). [http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-75182005000200002&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-75182005000200002&script=sci_arttext)

El M.C. Fernando Sánchez Albarrán es estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas, Opción Biología Experimental y el D.C. Rodolfo López Gómez es Profesor Investigador, ambos realizan investigaciones en el Laboratorio de Fisiología Molecular de Frutos del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

PUBLISHED BY

# INTECH

open science | open minds

World's largest Science,  
Technology & Medicine  
Open Access book publisher



**3,200+**  
OPEN ACCESS BOOKS



**105,000+**  
INTERNATIONAL  
AUTHORS AND EDITORS



**111+ MILLION**  
DOWNLOADS



**BOOKS**  
DELIVERED TO  
151 COUNTRIES



AUTHORS AMONG  
**TOP 1%**  
MOST CITED SCIENTIST

**12.2%**  
AUTHORS AND EDITORS  
FROM TOP 500 UNIVERSITIES



Selection of our books indexed in the  
Book Citation Index in Web of Science™  
Core Collection (BKCI)

**WEB OF SCIENCE™**

Chapter from the book *Advances in Seed Biology*

Downloaded from: <http://www.intechopen.com/books/advances-in-seed-biology>

Interested in publishing with InTechOpen?  
Contact us at [book.department@intechopen.com](mailto:book.department@intechopen.com)

---

# Transcriptome (ESTs) of Avocado “Native” Mexicano Early Seed Development Shows Abundance of Regulatory, Antioxidant and Defense Genes

---

Luis María Suárez-Rodríguez,  
Fernando Sánchez-Albarrán,  
Huber León-Corona and Rodolfo López-Gómez

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.70573>

---

## Abstract

Avocado native “Mexicano” (*Persea americana* var *drymifolia*) has been a really important species in agricultural and indigenous medicine. In the agricultural world, it has been the germplasm source for the generation of economically important cultivars like Hass and it is the main source of rootstocks for the world production of Hass avocado fruit. In spite of its importance, little is known about the molecular network of seed-fruit development. The aim of this work was to know the expressed genes (ESTs) during the early avocado native “Mexicano” seed development. Using total RNA we constructed cDNA libraries of fourth months seed development, sequencing, assembling and bio-informatic analysis was made. For validation, a semi-quantitative PCR experiments with the most abundant genes were made. About 5005 ESTs from the 5' representing 1653 possible unigenes were isolated. After assembling process, we have 171 genes that are closely related to *Nelumbo nucifera* sequences. The transcriptome is dominating by one bHLH transcription factor, three metallothioneins and snakin, suggesting its main role in seed development. Until now, there are no molecular studies in avocado seed development.

**Keywords:** avocado fruit, transcriptome, transcription factor, stress, antimicrobials, cotyledon, alignment, domain, phylogenetic, metal homeostasis, cysteine, seed development, gene expression

---

## 1. Introduction

Avocado (*Persea americana* Mill.) is an oleaginous fruit produced by a tree belonging to the magnoliid clade, a basal lineage of flowering plants. It belongs to the large plant family of Lauraceae, with approximately 2500–3000 species [1, 2]. Avocado has been rapidly incorporated as a component of human diet in many countries [3]. Due to low cost, vigor of seedling growth and easy propagation, most of the countries are still using seeds to produce rootstocks for grafted avocado trees despite their genetic variability [4]. Several Mexican varieties are derived from seeds that are resistant to attack by *Phytophthora cinnamomi* [5, 6] and are adapted to the soil and environmental conditions of the region. The Mexican state of Michoacán is the primary avocado-producing region in the world, and all the rootstocks used for the commercial production of cultivar Hass are obtained from *P. americana* var. *drymifolia* (“nativo mexicano”) [7]. The principal consume form is as fresh fruit, but is really important in cosmetic industry [8]. Avocado plant has medicinal properties, including cancer prevention [9–11]. There is ethnopharmacological information on the use of avocado seeds for the treatment of health-related conditions, especially in America. Recent research has shown that the avocado seeds are rich in phenolic compounds and these maybe play a role in putative health effects [12]. The avocado fruit is a berry of one carpel containing a single seed. This large and very conspicuous seed is made up of two fleshy cotyledons and a central attached plumule, hypocotyl and radicle, the whole surrounded by two papery seed coats closely adherent to each other. There is no endosperm left in the seed at maturity. The cotyledons are formed of indifferentiated parenchyma tissue interspersed with occasional idioblasts. Starch is the main storage material of the cotyledons and is present in great abundance [13]. Despite its importance, avocado seed development remains uncharacterized. To date, little information is available regarding the molecular biology of the seed. Analysis of expressed sequence tags (ESTs) is a rapid and effective method to identify novel genes or to investigate gene expression in different tissues, organs and plants [14, 15]. Furthermore, EST libraries and databases could provide valuable resources for functional genomic studies [16].

In principle, the frequency with which the sequence of a given gene is read in ESTs sequencing projects should reflect the relative abundance of the corresponding mRNA. This approach uses EST counts to infer the relative level of expression of a gene [17–19].

In this work, we report the analysis of an ESTs collection from immature avocado nativo mexicano seeds and the analysis of expression of bHLH transcription factor, metallothioneins (MTs) and snakin like more abundantly expressed.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Biological material

Seeds from avocado nativo mexicano fruits of three stages of development (1, 4 and 8 months) were excised from fruits and frozen immediately in liquid nitrogen until use. The materials

were collected in the avocado Germplasm Bank of the Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP; Uruapan, Michoacán México).

## **2.2. cDNA library construction and sequencing by Sanger method**

Total RNA from frozen seed tissue of 4 months of development was extracted using López-Gómez et al.'s protocol with some modifications [20]. The cDNA complementary library was built from 1 µg of total RNA using SMART™ cDNA Library Construction Kit (Clontech). The obtained cDNA sequences were cloned into pTriplEx2 vector. Cleavage experiments were made using *E. coli* BM25.8 cells to obtain the plasmid pTriplEx2. Sequencing reactions were performed using ABI PRISM BigDye Terminators v3.0 kit (Applied Biosystems), by 5' end of plasmids extracted from random clones. The sequences obtained were filtered by quality using PHRED [21]; vector masked and trimming of poly A/T were performed using LUCY2 software [22] resulting in 5002 high-quality reads.

## **2.3. Assembly and identification of full-length cDNA**

Sanger sequences were assembled using default parameters of the 454 Newbler-Assembler v1.1.03.24 (454 Life Science, Branford, CT) using 16,526 generated by the University of Florida and the Washington University Genome Sequencing Center.

Unigene set was generated by combining all assembled contigs and non-assembled reads (singlets). The consensus sequences of the Unigenes were analyzed with EuGeneHom [23] to identify the Unigenes that contained the components of a complete cDNA (5' UTR, ORF and 3' UTR): <http://genoweb.toulouse.inra.fr/eugene/EuGeneHom/cgi-bin/EuGeneHom.pl>.

## **2.4. Functional annotation**

Stand-alone BLAST software was obtained from the National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The unigenes were compared by BLAST against nucleotides and proteins plant databases. The BLAST results from different databases were used for gene ontology (GO) mapping and annotation. Blast2Go software was used to perform GO functional classification.

## **2.5. Transcript characterization and homologous search**

The transcripts were analyzed by UGENE V1.26.1 software for the identification of ORF, CDS and hypothetical protein sequence and physicochemical parameters, using the standard genetic code.

## **2.6. Alignment and phylogeny**

Mega7.0.14 software was used for alignment (Clustal W algorithm with Blossom 62 matrix) and reconstruction of the phylogenetic pattern (Neighbor Joining model with JTT matrix-based model for distance computing and 1000 replicates as bootstrap test).

GenBank Accession	Gene name	Primer sequence (5'-3')	T <sub>m</sub> (°C)
MF353071	PabHLHS1	F: TAGCGACAGGATTTGGCAGTT R: TGCCCCGTCGTCTCTTTCTTCTACC	65°C
MF353072	PaMT2a	F: TGAGAGGGAGATTGGAGGAG R: TCCCAACCACAGCATAGTACC	54°C
MF353073	PaMT2b	F: CATGCACCTGCAAATGAGAG R: CACCCAGATACAGCAGGAGAA	60°C
MF353074	PaMT3	F: TTGGTGTGGTGTCTATGC R: CATGACTCAACCACACACACC	57°C
AGC92009	PaSn	F: TCCTTGCTTTCCTTCTTTCAC R: AGATGTCCCGCAATCTATTTGT	64°C
	SUMO	F: GATAAGAAGCCCACGGATCA R: GACGGCCATCGAATAAGAAC	55°C

**Table 1.** Primers used in semi-quantitative PCR.

## 2.7. Semi-quantitative RT-PCR

The RNA from different seed stages (1, 4 and 8 months of development) digested with DNase I amplification grade (Invitrogen) was used as a template in sqPCR reactions, and the synthesis of cDNAs was carried out with the First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). In Veriti 96-well Thermal cycler (Applied Biosystems), in reactions of 10 µl (100 ng/µl cDNA, 10X Reaction Buffer, 2 mM dNTPs, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U Taq DNA polymerase), sqPCR primers (**Table 1**) were designed by Primer3 webtool (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>); the primers for bHLH transcription factor, three metallothioneins, snakin and ubiquitin as reference gene were selected. The amplification procedures were 95°C - 10min., 30 cycles (95°C - 45 s, annealing 30 s, amplification 72°C - 45 s), 72°C - 7 min. Gene expression ratio between selected gene and endogenous control was calculated using band intensity measured with GelAnalyzer 2010. The semi-quantitative PCR was performed with three repeats.

## 3. Results

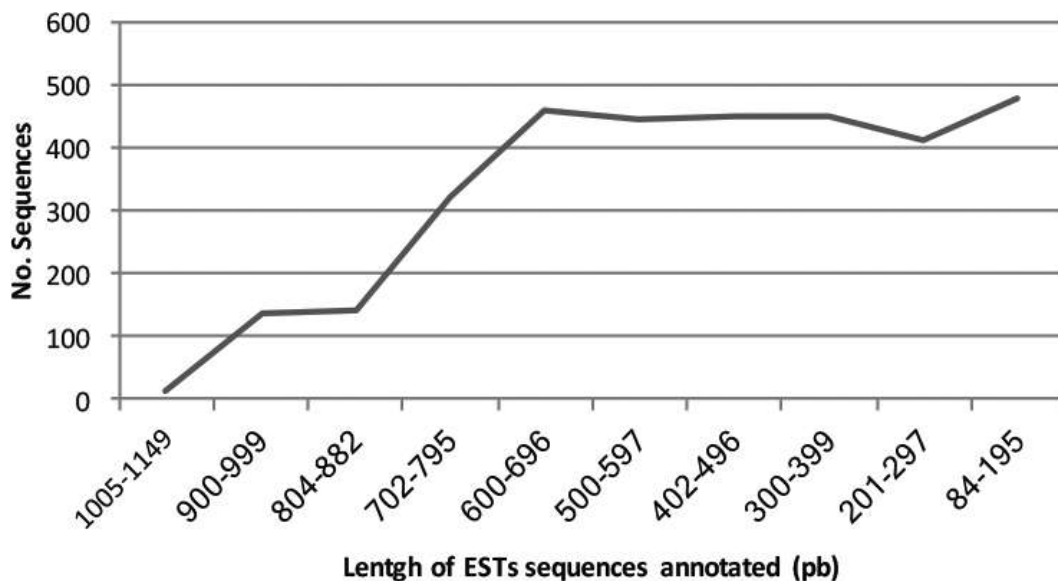
### 3.1. Sequencing and assembly of *Persea americana* var. *drymifolia* seed transcriptome

A total of 5005 sequences was assembled and obtained 3328 sequences (171 contigs of 3222 sequences + 106 singletons); these sequences were imported into BLAST analysis. In contig

assembly for the avocado seed ESTs, a total number of contigs was 171, derived from 3222 sequences and unique transcripts represented was 106 sequences. Contig length ranged from 84 to 1149 bp (**Figure 1**), the peak EST length was 84–195 bp with 478 sequences in range. The shortest sequence examined was 84 bp to known genes like GTP-binding nuclear protein.

### 3.2. Functional annotation

Functional interpretation is an important step in the analysis of transcriptomics which cannot be done without the availability of functional annotation. The most widespread and probably most extensive functional annotation schema for gene and protein sequences is the Gene Ontology (GO) [24] as standard in all public databases. Automatic functional annotation methods basically rely on sequence, structure, phylogenetic or co-expression relationships between known and novel sequences [25]. A total of 277 uniESTs sequences were manually annotated for a closer understanding of gene expression in avocado seed. The annotation proceeds through three basic steps: homologs search, GO term mapping and actual annotation. At the first step, NCBI-BLASTX and BLASTN are typically used, and for this work, the e-value  $1 \times 10^{-5}$ , cut-off:33 and the number of 20 retrieved BLAST hits are used. These uniESTs were classified into five functional categories, including antioxidative protection (677, 20.34%), transcription regulatory (1013, 30.44%), defense (507, 15.23%), cellular structure and organization (287, 8.62%) and unknown (844, 25.36%).



**Figure 1.** Sequence length distribution of ESTs from avocado native mexicano seed transcriptome. Total number of sequences analyzed were 3328. Data include both contigs and singletons.

Gene ontology annotations and functional analyses of avocado seed transcriptome were carried out with automated software Blast2GO. These were assigned into three standard classifications: biological processes, molecular functions and cellular components, and summarized according to GO criteria. The majority GO annotation was for biological process (65.34%), cellular component (19.34%) and molecular function (15.33%). In addition, the organisms closely related to the genetic load on avocado seed were reviewed within the databases, and the majority of analyzed sequences (23.47%) (Figure 2) were closely related to *Nelumbo nucifera* sequences (Figure 3). The 20 most abundant uniESTs and their annotations are shown in Table 2.

### 3.3. Avocado seed abundant genes and validation

The most abundant sequences match with metallothionein genes. This result suggests that metallothionein genes dominate the avocado seed transcriptome like avocado fruit [26]. Metallothioneins (MTs) were discovered by Margoshes and Vallee as cadmium-bound proteins isolated from the cortex of the equine kidney. These proteins were named for the high sulfur content and metals they are able to bind; depending on the metal species, these may possess more than 20% of its nature of metal ions [27, 28]. Mammalian metallothioneins are 60 amino acid peptides with 20 Cys residues and a molecular mass of about 6–7 kDa. Mammalian MTs are capable of binding up to 7 divalent metal ions via mercaptide bonds (sulfur-metal) with the Cys residues. By convention, any peptide or protein that resembles several characteristics of mammalian metallothioneins can be classified as metallothionein [28]. Plant metallothioneins have two (highly conserved) sequence similarity regions corresponding to the two Cys-rich terminal domains joined by a less conserved “spacer” (about 40 aa without Cys residues). In plants, the most distinctive feature is to have a large spacer, which differs from the MT of the

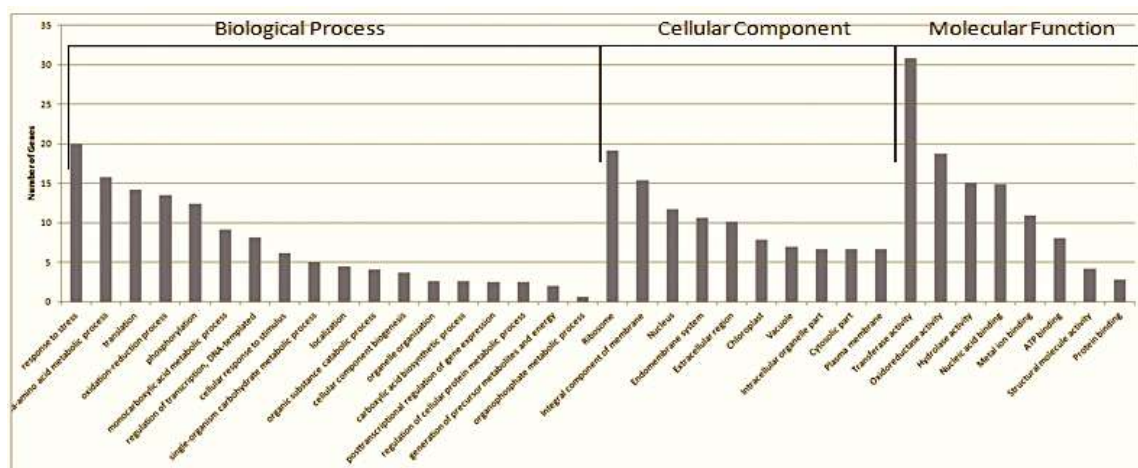
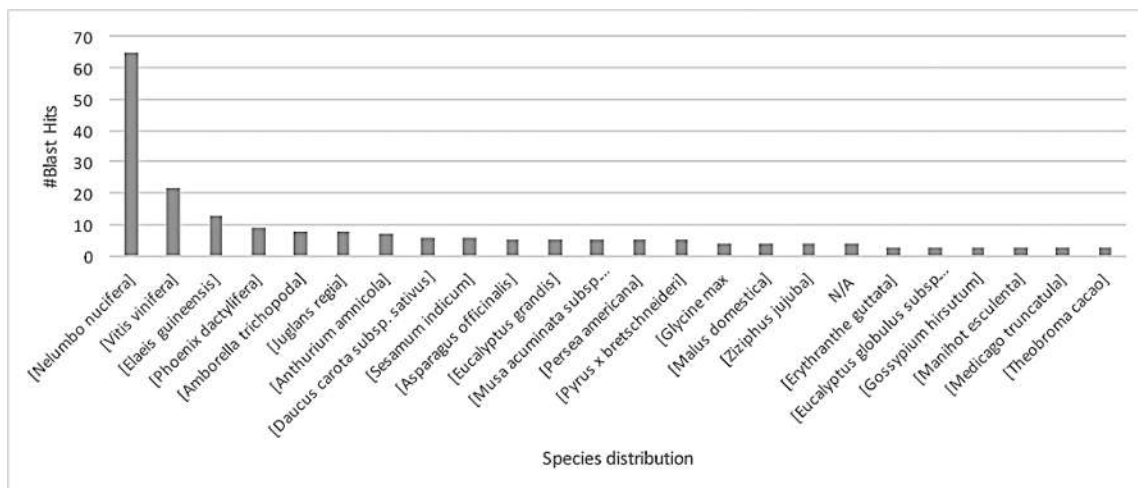


Figure 2. Gene ontology classification of *P. americana* var. *drymifolia* seed transcriptome. Unigenes with BLASTX matches were classified into three main GO categories: biological process, cellular components and molecular functions.



**Figure 3.** Main organisms with which the avocado seed transcriptome is closely related.

animals in which the Cys-rich domains are separated by a short spacer of less than 10 amino acids which do not include aromatic residues. The distribution of Cys residues as well as the length of the spacer region served to classify more MT of plants into four types, namely group 1, 2, 3 and 4 [29].

From the analysis of these abundant transcripts, we founded the existence of three MT's genes on avocado seed: PaMT2a, PaMT2b and PaMT3, which were registered in GenBank database with an accession code shown in **Table 3**. Characteristics predicted in silico for avocado metallothioneins, we have two sequences belonging to Methallothionein-2 super-family due to the two highly conserved Cys-rich motifs and the long spacer in the middle of them. PaMT3 keeps the spacer but Cys-rich motifs are not so conserved grouping this as part of the third family of plant metallothioneins (MT3). Alignment shown that the most conserved amino acids are around the Cys residues for both MT2 and MT3 groups, which are associated with the "metal binding clusters" (**Figures 4** and **5**). The alignments performed identify the amino and terminal carboxyl regions as having the most conserved Cysteine sequences, which correspond to the metal binding clusters. The intermediate spacer of about 40 amino acids is much more variable but has no cysteines. In mammalian metallothioneins, this spacer is very small (8 amino acids) and has no aromatic amino acids. However, in the family 2 to which the plants belong, we can find conserved tyrosine residues in the spacer, as well as several less conserved phenylalanines present in the metallothionein sequences of types 2 and 3 (**Figures 4** and **5**). Seed metallothioneins correspond with the three reported: NnMT2a, NnMT2b and NnMT3 [30]; the avocado seed metallothioneins are closely related with *Nelumbo nucifera* metallothioneins like 79% for NnMT2a-PaMT2a; 66% NnMT2b-PaMT2b and 71% for NnMT3-PaMT3 **Figure 6**. NnMT2a and NnMT3 were associated with processes of seed germination, tolerance to accelerated aging and salt on *Arabidopsis* [30]. However, avocado seeds have a low tolerance

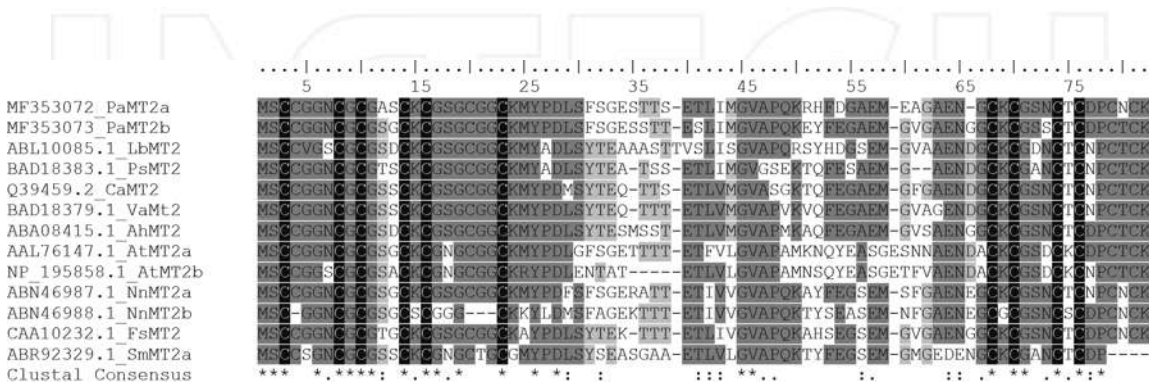
ESTs	Description	Length	e-value	GO IDs	Abundance
arlgES1	Transcription factor bHLH96	942	1.35E-103	GO:0046983	123
arlgES153	Metallothionein type 3	195	4.52E-28	GO:0043167	123
arlgES154	Stress response nst1	696	1.68E-34	GO:0009507; GO:0010207	113
arlgES2	40S ribosomal S29	171	1.77E-32	GO:0003735; GO:0043167; GO:0005829; GO:0005840; GO:0006412	100
arlgES3	PREDICTED: uncharacterized protein LOC104611921	282	4.53E-37	N/A	96
arlgES4	Vesicle-associated membrane 726	579	5.71E-130	GO:0016192; GO:0005575	90
arlgES6	ras-related RIC2	525	2.61E-118	GO:0007165; GO:0043167; GO:0005622	78
arlgES7	Metallothionein 2	240	3.91E-30	GO:0043167	77
arlgES8	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	588	1.02E-132	GO:0044281; GO:0006091; GO:0016491; GO:0043167	74
arlgES10	kDa proline-rich	483	4.35E-25	N/A	69
arlgES155	Early nodulin-93-like	318	8.41E-43	GO:0005575	69
arlgES156	PREDICTED: uncharacterized protein LOC103701850 isoform X3	552	2.83E-19	GO:0005739	66
arlgES157	Potassium transporter 12 isoform X1	366	2.97E-55	GO:0022857; GO:0009536	64
arlgES12	60S ribosomal L24	492	5.32E-63	GO:0003735; GO:0022618; GO:0005829; GO:0042254; GO:0005840; GO:0006412	58
arlgES13	60S ribosomal L7-2-like	738	1.65E-136	GO:0003735; GO:0005829; GO:0042254; GO:0005840; GO:0006412	57
arlgES15	Ethanolamine utilization eutQ	291	3.63E-61	N/A	54
arlgES158	Programmed cell death 4	636	1.00E-80	N/A	52
arlgES16	Type 2 metallothionein	243	5.56E-24	GO:0043167	51
arlgES159	Mitochondrial	178	4.72E-35	GO:0005739	50
arlgES161	Snakin	318	4.00E-57	GO:0009740	48

**Table 2.** Top 20 most abundant annotated ESTs of avocado nativo mexicano seed transcriptome.

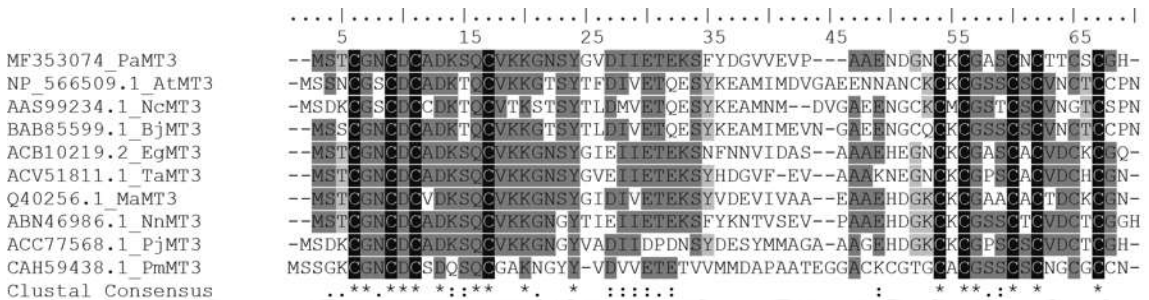
to aging. Basic function of MTs is metal homeostasis and has been reported during biotic and abiotic stress conditions too [31]. Recently, it has been reported that one metallothionein interacts with a cytoskeleton protein in the nucleus of rice cells in response to salt stress [32].

Name	GenBank	Length (aa)	Weight (kDa)	Isoelectric Point	Cys Residues	% Cys
PaMT2a	MF353072	80	7.9	5.11	14	17.5
PaMT2b	MF353073	80	7.9	4.54	14	17.5
PaMT3	MF353074	64	67	4.5	10	15.6

**Table 3.** Characterization of *Persea americana* var. *drymifolia* metallothioneins.

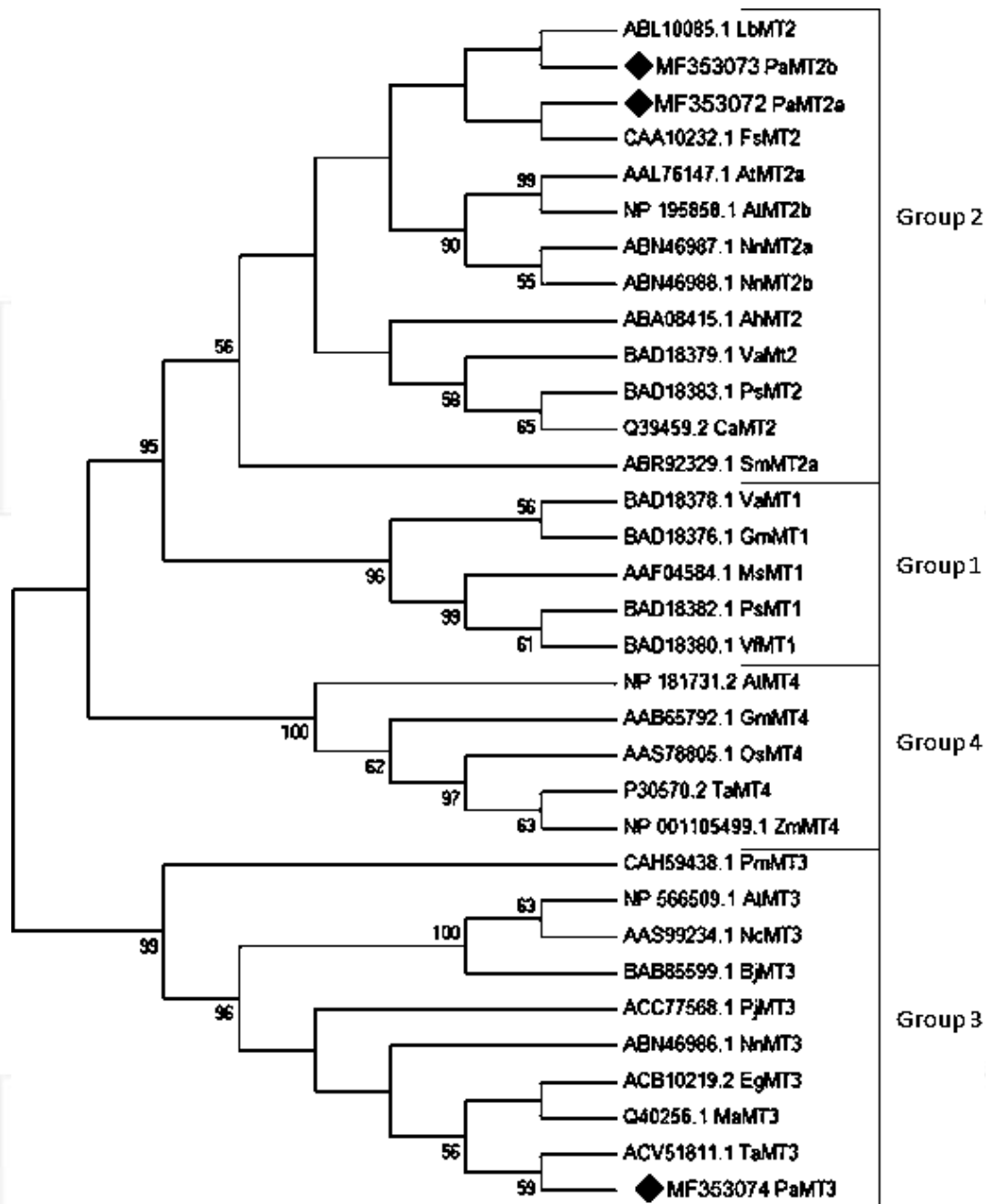


**Figure 4.** Alignment of plant metallothioneins of subfamily 2.



**Figure 5.** Alignment of plant metallothioneins of subfamily 3.

Sequences of related proteins were obtained from Zhou et al. [30] and downloaded from NCBI-GenBank: BAD18376.1 GmMT1 (*Glycine max*); BAD18378.1 VaMT1 (*Vigna angularis*); AAF04584.1 MsMT1 (*Medicago sativa*); BAD18382.1 PsMT1 (*Pisum sativum*); BAD18380.1 VfMT1 (*Vicia faba*); ABL10085.1 LbMT2 (*Limonium bicolor*); BAD18383.1 PsMT2 (*Pisum sativum*); Q39459.2 CaMT2 (*Cicer arietinum*); BAD18379.1 VaMT2 (*Vigna angularis*); ABA08415.1 AhMT2 (*Arachis hypogaea*); AAL76147.1 AtMT2a (*Arabidopsis thaliana*); NP\_195858.1 AtMT2B (*Arabidopsis thaliana*); ABN46987.1 NnMT2a (*Nelumbo nucifera*); ABN46988.1 NnMT2b (*Nelumbo nucifera*); CAA10232.1 FsMT2 (*Fagus sylvatica*); ABR92329.1 SmMT2a (*Salvia miltiorrhiza*); NP\_566509.1 AtMT3 (*Arabidopsis thaliana*); AAS99234.1 NcMT3 (*Noccaea caerulea*); BAB85599.1 BjMT3 (*Brassica juncea*); ACB10219.2 EgMT3 (*Elaeis guineensis*); ACV51811.1 TaMT3 (*Typha angustifolia*); Q40256.1 MaMT3 (*Musa acuminata*); ABN46986.1 NnMT3 (*Nelumbo*



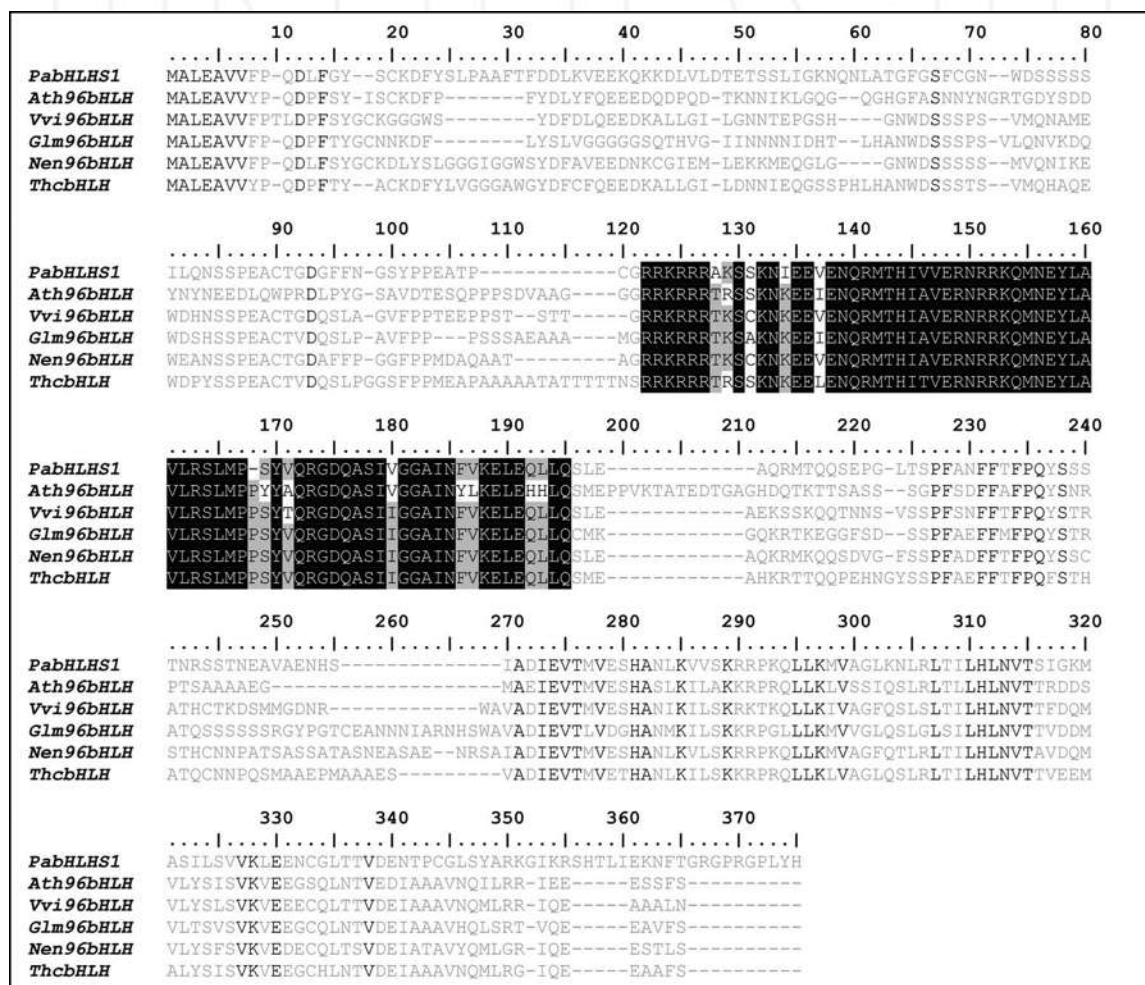
**Figure 6.** Phylogenetic analysis of avocado and plant metallothioneins. The evolutionary history was inferred using the neighbor-joining method. The bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates. The evolutionary distances were computed using the JTT matrix-based method. The analysis involved 33 amino acid sequences. All positions with less than 85% site coverage were eliminated.

*nucifera*); ACC77568.1 PjMT3 (*Prosopis juliflora*); CAH59438.1 PmMT3 (*Plantago major*); NP\_181731.2 AtMT4 (*Arabidopsis thaliana*); AAB65792.1 GmMT4 (*Glycine max*); P30570.2 TaMT4 (*Triticum aestivum*); AAS78805.1 OsMT4 (*Oryza sativa* Japonica Group) and NP\_001105499.1 ZmMT4 (*Zea mays*), [30].

Another abundant transcript is a messenger codified for a transcription factor type bHLH. The basic domain (bHLH) is a highly conserved amino acid motif that defines a group of transcription factors, which was initially described in animals and was soon discovered in all major eukaryotic lineages [33]. Proteins containing a bHLH domain (referred to as bHLH proteins) are involved in a variety of regulatory processes; their functions include the regulation of neurogenesis, myogenesis and the development of the heart in animals [34, 35], control of phosphate uptake and glycolysis in yeast [36] or modulation of secondary metabolism pathways, epidermal differentiation and environmental responses in plants [37]. The bHLH domain consists of two distinct segments composed by 50–60 amino acids, 10–15 mostly basic amino acids form the stretch (basic region) and approximately 40 amino acids form the two amphipathic helices separated by a loop (helix-loop-helix region). The analysis of the structure of bHLH proteins (yeast and mammalian) showed the basic region made in the DNA contact, while the two helices promote the formation of heterodimers between bHLH proteins [35]. These bHLH transcription factors are generally classified into six major groups (FAs) based on their ability to bind to DNA [35, 38, 39]. Most bHLH proteins are classified into group A or B; in group A, it is expected to bind to E-box consensus sequences (CACCTG or CAGCTG), in group B, it is specifically bind to G-Box consensus sequences (CACGTG or CATGTTG) and in group C, bHLH proteins share a PAS domain and bind to the recognized sequences without a need a E-box (ACGTG or GCGTG) sequences. The E group includes bHLH proteins containing a conserved Pro or Gly residue at a key position within the basic region, preferably bind to sequences referred to as N-boxes (CACGCG or CACGAG), and further share an additional WRPW motif. Groups D and F represent particularly proteins which were separated in the basic region. Some group D proteins have been described as being unable to bind to DNA and could form heterodimers that function as negative regulators of bHLH binding to DNA [40]. Group F includes so-called COE proteins. A phylogenetic study indicated that group A contained mammalian bHLH proteins and lacked bHLH plant proteins. The other groups had a mixture of different species and most of the bHLH proteins of plants belonged to group B [41, 42]. It has been shown that the bHLH family of proteins in plants is monophyletic and subjected to significant radiation before the evolution of mosses; bHLH groups established in terrestrial plants during the first 400 million years were conserved during the later evolution of plants, although there were many duplications of genes. The transcription factors are very varied since it does not have many amino acids conserved throughout its sequence; nevertheless in the sites of union to the DNA like the case of the bHLH, the great majority of its amino acids is conserved within its main motive. Due to their propensity to form homodimers or heterodimers, bHLH proteins can participate in an extensive set of a combinatorial interactions leading to the regulation of multiple transcriptional programs. The development of fleshy fruits involves complex physiological and biochemical changes. Recent studies have described the involvement of bHLH proteins in the determination of plant organ size. The SPATULA protein was shown to control cotyledon, leaf and petal expansion by affecting cell proliferation in *Arabidopsis thaliana* [43]. Nicolas et al. [44] described a bHLH transcription factor preferentially expressed in grape berry fruit, but is weakly detected in seeds. This gene is involved in cell size determination. Three basic helix-loop-helix transcription factors (bHLH) were also found to be involved in *Arabidopsis* fruit dehiscence process: ALCATRAZ (*ALC*), SPATULA (*SPT*) and INDEHISCENT (*IND*); they form a regulatory network that orchestrates

the differentiation of the valve margin, allowing seed dispersal [45]. A protein Blast was performed and the sequences that were selected for a multiple alignment were the ones that presented greater coverage and identity with the transcription factor bHLH of Mexican native avocado seed. High sequence variability was found for the nearest bHLH motif, which presenting a large number of conserved amino acids (**Figure 7**).

However, since they do not have any additional information regarding the function and/or tissue in which the function is performed, we analyzed our sequence with bHLH sequences of which their function or organospecificity is known; two bHLH factors were chosen with these characteristics of *Arabidopsis thaliana*, bHLH Zoupi (GenBank Accession: OAP16519) involved in seed development and SPATULA (GenBank Accession: AT4G36930) involved in



**Figure 7.** bHLH (*PabHLHS1*) avocado seed transcription factor alignment with bHLH transcription factors of some plant species. *Arabidopsis thaliana* (*Ath96bHLH*), *Vitis vinifera* (*Vvi96bHLH*), *Glicine max* (*Glm96bHLH*), *Nelumbo nucifera* (*96bHLH*), *Theobroma cacao* (*ThcbHLH*), in shadow black are the bHLH motif represented in black letters the amino acids that are conserved in these proteins and gray letters the amino acids differs between them.

cell development; however, no conserved amino acids were found with the avocado bHLH (data not shown). To try to infer the function of this transcription factor highly expressed in avocado seed, it will be necessary to carry out research studies of the recognition boxes inside in DNA to infer the possible association to the group to which it belongs. It is probable that the bHLH transcription factor of the avocado seed has a principal paper in seed differentiation and development.

Multicellular organisms produce small cysteine-rich antimicrobial peptides (AMPs) as an innate defense against pathogens. Native Mexican avocado seed abundantly express Snakin (PaSn) gene. These kind of AMPs were initially isolated from potato but were later found to be ubiquitous. Novel plant APs isolated include in *Arabidopsis* (family of 12-cysteine peptides).

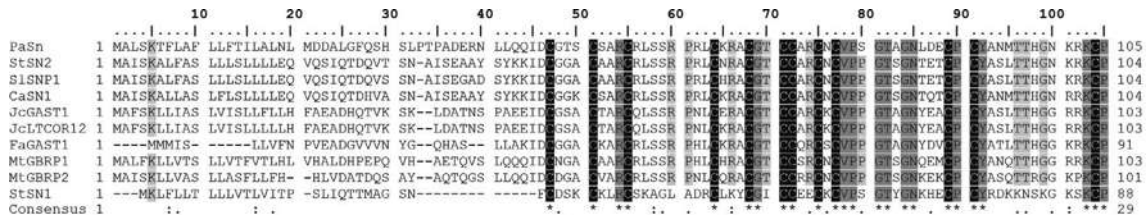
We identified a single cDNA sequence for snakin/GASA (gibberellic acid-stimulated), which contains a coding sequence of 318 bp and encodes a predicted 106 amino acid peptide. This molecule comprises a 26 amino acid signal peptide (residues 1–26), identified by SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) and a 79 amino acid mature peptide (Figure 8). An amino acid alignment of avocado snakin with other similar APs (Figure 9) showed that PaSn has the longest sequence compared with the previously reported StSN1 and StSN2 genes from potato. In addition, PaSn has the 12 characteristic Cys residues of this type of AP. In addition to the highly conserved 12 Cys residues, the other motifs in the PaSn protein consist of residues that are mostly polar, non-polar and basic (Figure 9). From these analyses, we hypothesized that the Mexican avocado snakin gene could be involved in plant defense in a similar way to that of the StSN1 and StSN2 genes in potato [7]. Until now, this is the first Snakin gene isolated from a seed.

```

1 5' CGTGCCGGGAAGCTAATATACGCTCCAATTGTCTATCTCTACAATACCCTTTTCCTCATT
21                                     M A L S K T F L A F L
61 TCCTCCATCTGTTGAGTTCTCCTTCTTGAATGGCTCTGTCAAAGACTTTCCTTGCTTTCC
41 L F T I L A L N L M D D A L G F Q S H S
121 TTCTCTTCACTATCCTTGCTCTCAATCTCATGGATGATGCTCTTGGATTCAGTCTCATT
61 L P T P A D E R N L L Q Q I D C G T S C
181 CGCTGCCTACACCTGCGGATGAGAGAAATCTCCTTCAACAAATAGATTGCGGGACATCTT
81 S A R C R L S S R P R L C K R A C G T C
241 GTTCTGCGAGGTGTCGATTGTCATCAAGGCCTAGACTCTGCAAGAGGGCTTGTGGGACAT
101 C A R C N C V P S G T A G N L D E C P C
301 GTTGTGCGAGGTGCAACTGCGTACCATCAGGAAGTGCAGGCAACTTAGACGAGTGCCCTT
121 Y A N M T T H G N K R K C P *
361 GCTACGCCAACATGACTACTCATGGGAACAAACGCAAATGTCCTTAAAAGACCTTATCTC
421 TCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTATGCTTGCTCTGTCCTTCTTTAGTA
481 TTCTGTGAGATATCTGTAAGAGAAATAAGGATGATTTGCTCTTGAGTGTGTGAATGATGA
541 AAAGTGTGAGATGTGTGTAAGTAACTTCTCTATCTGAGTAAGAGAAGTTATTTCGAAAAAAAAA
601 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA3'

```

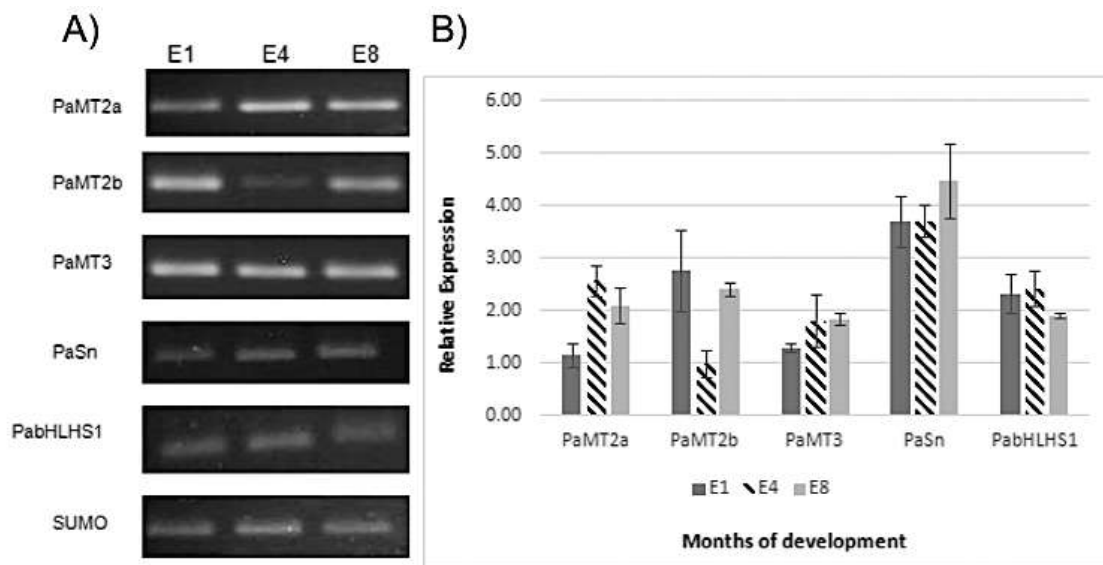
**Figure 8.** PaSn nucleotide sequence with amino acid frame translation (GenBank: KC012806). ORF in gray shaded; signal peptide (bold-underlined) is followed by the amino acid sequence of the mature peptide; the signal peptide prediction was performed using SignalP program (<http://www.Cbs.Dtu.Dk/services/SignalP/>).



**Figure 9.** Plant snakin amino acid sequences alignment. Amino acids conserved are indicated by an asterisk in the consensus sequence. The black-shaded cysteine residues are present in all sequences. The sequences included are: Avocado PaSn (KC012806); potato: StSN1 (Q948Z4), StSN2 (Q93X17); *Medicago truncatula*: MtGBRP1 (XP\_003603759), MtGBRP2 (XP\_003589486); *Capsicum annum*: CaSN1 (ACC91329); *Jatropha curcas*: JcGAST1 (ACV70139), JcLTCOR12 (ACU30848); *Solanum lycopersicum*: SISNP1 (ADR32106) and *Fragaria x ananassa*: FaGAST1 (AAB97006).

### 3.4. Expression patterns of selected genes measured by sqPCR

Expression patterns of five genes from the seed library were studied by semi-quantitative PCR (Figure 10); bHLH transcription factor, three metallothioneins, antimicrobial peptide snakin and SUMO like reference gene during avocado seed development. These genes could be divided into three stages according to the time of growth of the seed in avocado fruit. The bHLH gene has an expression pattern comparable to the endogenous gene SUMO (Ubiquitin), suggesting a role throughout the formation and development of the avocado fruit seed possibly modulating the biogenesis of the seed or embryo; since from the first month of formation (E1) to ripening (E8), similar expression levels were present. For the Metallothionein gene group, PaMT3 presented a pattern of constant expression in the three stages of seed



**Figure 10.** Transcript profiling of PaMT2a, PaMT2b, PaMT3, PaSn and PabHLHS1 during seed development. (A) Total RNA was extracted from avocado seeds of 1, 4 and 8 months of development. cDNAs were synthesized and used for sqPCR, the normalizing gene was avocado ubiquitin SUMO. (B) The amount of mRNA of different genes is expressed as the ratio of the densitometric measurement of the sample RT-PCR product to the SUMO corresponding product.

development used slightly above at the peak of expression compared to the endogenous gene but not for PaMT2a which has an initial level of expression low in first month of development, having its maximum expression peak in the stage of 4 months; PaMT2b has its maximum expression peak at the beginning of the fruit formation in the first month, decaying this by month 4 and recovering expression levels for ripening; it should be noted that metallothioneins have been directly involved within various roles within the functions. Some of them as carriers or facilitators of metal ions for processes of defense, synthesis or hydrolysis of reserve components to make them more bioavailable [46]; however, the authors do not reach an agreement to say that the different types or families of metallothioneins play a specific role. The snakin gene has a similar behavior throughout the development of the fruit emphasizing its role within the defense against pathogens or as the first barrier of protection or signaling of attack, making it therefore important to maintain the levels of expression throughout development and possibly after this for fruit protection (**Figure 10**). The expression patterns of the selected genes identified by sqPCR and the different expression patterns of avocado seed transcriptome suggested various roles of these genes in response to seed development and protection in avocado fruit.

#### 4. Conclusions

In this work, we identified and characterized three novel metallothioneins and one transcription factor gene from avocado nativo mexicano seeds, which are expressed abundantly during seed development. This suggests that they can have a protagonic paper during seed development and probably form a network to protect the embryo for drought stress. More studies are necessary to elucidate the paper of these genes during avocado seed-fruit development.

#### Author details

Luis María Suárez-Rodríguez, Fernando Sánchez-Albarrán, Huber León-Corona and Rodolfo López-Gómez\*

\*Address all correspondence to: lgomez@umich.mx

Institute of Chemical-Biological Studies, Michoacana University of Saint Nicolás of Hidalgo, Morelia Michoacán, México

#### References

- [1] Chanderbali AS, Albert VA, Ashworth VE, Clegg MT, Litz RE, Soltis DE, Soltis PS. *Persea americana* (avocado): Bringing ancient flowers to fruit in the genomics era. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*. 2008;**30**:386-396. DOI: 10.1002/bies.20721

- [2] Rohwer JG. Lauraceae. In: Kubitzki K, Rohwer JG, Bittrich V, editors. The Families and Genera of Flowering Plants. Springer-Verlag; 1993. p. 366-391. DOI: 10.1007/978-3-662-02899-5
- [3] Ibarra-Laclette E, Méndez-Bravo A, Pérez-Torres CA, Albert VA, Mockaitis K, Kilaru A, López-Gómez R, Cervantes-Luevano J, Herrera-Estrella L. Deep sequencing of the Mexican avocado transcriptome, an ancient angiosperm with a high content of fatty acids. *BMC Genomics*. 2015;**16**:599. DOI: 10.1186/s12864-015-1775-y
- [4] Ben-Ya'acov A, Michelson E. Avocado rootstocks. *Horticultural Review*. 1995;**17**:381-429
- [5] Barrientos PAF. El Aguacate. *Biodiversitas*. 2010;**88**:1-7
- [6] Andrade HP, De León C, Espíndola BMC, Alvarado RD, López JA, García ER. Selección de portainjertos de aguacate para tolerancia-resistencia a *Phytophthora cinnamomi* Rands. usando temperaturas controladas. *Spanish Journal of Rural Development*. 2012;**4**:1-8 ISSN: 2171-1216
- [7] Guzmán-Rodríguez JJ, Ibarra-Laclette E, Herrera-Estrella L, Ochoa-Zarzosa A, Suárez-Rodríguez LM, Rodríguez-Zapata LC, Salgado-Garciglia R, Jimenez-Moraila B, López-Meza JE, López-Gómez R. Analysis of expressed sequence tags (ESTs) from avocado seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) reveals abundant expression of the gene encoding the antimicrobial peptide snakine. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2013;**70**:318-324. DOI: 10.1016/j.plaphy.2013.05.045
- [8] Rivas-Gil A, Lares VC, Amaro-Luis JM, Bahsas BA. 2-Alquil-4-Hidroxy-Tetrahidrofuranos de la pulpa del aguacate. *Avances en Química*. 2006;**1**(3):35-37
- [9] Birkbeck J. Health benefits of avocado oil. *Food New Zealand*. 2002;**40**-42
- [10] QY L, Arteaga JR, Qifeng Z, Huerta S, Go VLW, Heber D. Inhibition of prostate cancer cell growth by an avocado extract: Role of lipid-soluble bioactive substances. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2005;**16**:23-30. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2004.08.003
- [11] Ding H, Chin YW, Kinghorn AD, D'Ambrosio SM. Chemopreventive characteristics of avocado fruit. *Seminars in Cancer Biology*. 2007;**17**:386-394. DOI: 10.1016/j.semcancer.2007.04.003
- [12] Dabas D, Shegog RM, Ziegler GR, Lambert JD. Avocado (*Persea americana*) seeds as source of bioactive phytochemicals. *Current Pharmaceutical Design*. 2013;**19**:6133-6140. DOI: 10.2174/1381612811319340007
- [13] Cummings K, Schroeder CA. Anatomy of avocado fruit. *California Avocado Society Yearbook*. 1942;**27**:56-64 Record Number: 19430300995
- [14] Peng FY, Reid KE, Liao N, Schlooser J, Lijavetzky D, Holt R, Martínez Zapater JM, Jones S, Marra M, Bohlmann J. Generation of ESTs in *Vitis vinifera* wine grape (cabernet sauvignon) and table grape (Muscat Hamburg) and discovery of new candidate genes with potential roles in berry development. *Gene*. 2007;**402**:40-50. DOI: 10.1016/j.gene.2007.07.016

- [15] Teh SL, Chan WS, Abdullah JO. Development of expressed sequence tag resources for Vanda Mimi palmer and data mining for EST-SSR. *Molecular Biology Reports*. 2011;**38**:3903-3909. DOI: 10.1007/s11033-010-0506-3
- [16] Low ET, Alias H, Boon SH, Shariff E, Tan CY, Ooi L, Cheah SC, Raha AR, Wan KL, Singh R. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture ESTs: Identifying genes associated with callogenesis and embryogenesis. *BMC Plant Biology*. 2008;**8**:62-81. DOI: 10.1186/1471-2229-8-62
- [17] Okubo K, Hori N, Matoba R, Niiyama T, Fukushima A, Kojima Y, Matsubara K. Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression. *Nature Genetics*. 1992;**2**:173-179. DOI: 10.1038/ng1192-173
- [18] Franco GR, Adams MD, Soares MB, Simpson AJ, Venter JC, Pena SD. Identification of new *Schistosoma mansoni* genes by the EST strategy using a directional cDNA library. *Gene*. 1995;**15**:141-147. DOI: 10.1016/0378-1119(94)00747-G
- [19] Lee H, Lee HK, An G, Lee YK. Analysis of expressed sequence tags from the red alga *Griffithsia okiensis*. *Journal of Microbiology*. 2007;**45**(6):541-546
- [20] López-Gómez R, Gómez-Lim MA. A method for extracting intact RNA from fruits rich in polysaccharides using ripe mango mesocarp. *HortScience*. 1992;**27**(5):440-442
- [21] Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. II. Error probabilities. *Genome Research*. 1998;**8**:186-194. DOI: 10.1101/gr.8.3.186
- [22] Li S, Chou HH. Lucy2: An interactive DNA sequence quality trimming and vector removal tool. *Bioinformatics*. 2004;**20**(16):2865-2866. DOI: 10.1093/bioinformatics/bth302
- [23] Foissac S, Bardou P, Moisan A, Cros MJ, Schiex T. EuGene'Hom: A generic similarity-based gene finder using multiple homologous sequences. *Nucleic Acids Research*. 2003;**31**:3742-3745. DOI: 10.1093/nar/gkg586#
- [24] Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT. Gene ontology: Tool for the unification of biology. *The Gene Ontology Consortium Nat. Genet*. 2000;**25**:25-29. DOI: 10.1038/75556
- [25] Frishman D. Protein annotation at genomic scale: The current status. *Chemical Reviews*. 2007;**107**:3448-3466. DOI: 10.1021/cr068303k
- [26] López-Gómez R, Suárez-Rodríguez LM, Ibarra-Laclette E, Guzmán-Rodríguez JJ, López-Meza JE, Ochoa-Zarzosa A, Salgado-Garciglia R, Rodríguez-Zapata LC, Jimenez-Moraila B, Herrera-Estrella L. Transcriptome (ESTs) of native Mexican avocado fruit is dominated by stress and innate immunity genes. *Acta Horticulturae*. 2016;**1144**:43-48. DOI: 10.17660/ActaHortic.2016.1144.6
- [27] Margoshes M, Vallee BL. A Cadmium protein from equine kidney cortex. *Journal of the American Chemical Society*. 1957;**79**(17):4813-4814. DOI: 10.1021/ja01574a064

- [28] Kagi JHR, Schaffer A. Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry*. 1988;**27**(23):8509-8515. DOI: 10.1021/bi00423a001
- [29] Cobbett C, Goldsbrough P. Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*. 2002;**53**(1):159-182. DOI: 10.1146/annurev.arplant.53.100301.135154
- [30] Zhou Y, Chu P, Chen H, Li Y, Liu J, Ding Y, Tsang EWT, Jiang L, Wu K, Huang S. Overexpression of *Nelumbo nucifera* metallothioneins 2a and 3 enhances seed germination vigor in Arabidopsis (electronic material). *Planta*. 2012;**235**(3):523-537. DOI: 10.1007/s00425-011-1527-4
- [31] Mir G, Doménech J, Huguet G, Guo WJ, Goldsbrough P, Atrian S, Molinas M. A plant type 2 metallothionein (MT) from cork tissue responds to oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*. 2004;**55**:2483-2493. DOI: 10.1093/jxb/erh254
- [32] Soda N, Sharan A, Gupta BK, Singla-Pareek S, Pareek A. Evidence for nuclear interaction of a cytoskeleton protein (OsIFL) with metallothionein and its role in salinity stress tolerance. *Scientific Reports*. 2016;**6**:34762. DOI: 10.1038/srep34762
- [33] Murre C, McCaw P, Vaessin H, Caudy M, Jan L, Jan Y, Cabrera C, Buskin J, Hauschka S, Lassar A, Weintraub H, Baltimore D. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generates complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell*. 1989;**58**:537-544. DOI: 10.1016/0092-8674(89)90434-0
- [34] Massari ME, Murre C. Helix-Loop-Helix proteins: Regulators of transcription in eukaryotic organisms. *Molecular and Cellular Biology*. 2000;**20**(2):429-440
- [35] Jones S. An overview of the basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biology*. 2004;**5**:226
- [36] Robinson KA, Lopes JM. *Saccharomyces cerevisiae* basic helix-loop-helix proteins regulate diverse biological processes. *Nucleic Acids Research*. 2000;**28**(7):1499-1505
- [37] Ramsay NA, Glover BJ. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends in Plant Science*. 2005;**10**:63-70
- [38] Atchley WR, Fitch WM. A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;**94**:5172-5176
- [39] Ledent V, Vervoort M. The basic helix-loop-helix protein family: Comparative genomics and phylogenetic analysis. *Genome Research*. 2001;**11**:754-770
- [40] Fairman R, Chao HG, Mueller L, Lavoie TB, Shen L, Novotny J, Matsueda GR. Characterization of a new four-chain coiled-coil: Influence of chain length on stability. *Protein Science*. 1995;**4**:1457-1469
- [41] Stevens JD, Roalson EH, Skinner MK. Phylogenetic and expression analysis of the basic helix-loop-helix transcription factor gene family: Genomic approach to cellular differentiation. *Differentiation*. 2008;**76**(9):1006-1022

- [42] Skinner MK, Manikkam M, Guerrero-Bosagna C. Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2010;**21**:214-222
- [43] Ichihashi Y, Horiguchi G, Gleissberg S, Tsukaya H. The bHLH transcription factor SPATULA controls final leaf size in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*. 2010;**51**:252-261
- [44] Nicolas P, Lecourieux D, Gomès E, Delrot S, Lecourieux F. The grape berry-specific basic helix-loop-helix transcription factor VvCEB1 affects cell size. *Journal of Experimental Botany*. 2013;**64**(4):991-1003. DOI: 10.1093/jxb/ers374
- [45] Tani E, Tsaballa T, Stedel C, Kalloniati C, Papaefthimiou D, Polidoros A, Darzentas N, Ganopoulos I, Fletmetakis E, Katinakis P, Tsafaris A. The study of a SPATULA-like bHLH transcription factor expressed during peach (*Prunus persica*) fruit development. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2011;**49**:654-663
- [46] Hassinen VH, Tervahauta AI, Schat H, Kärenlampi SO. Plant metallothioneins – Metal chelators with ROS scavenging activity? *Plant Biology*. 2011;**13**:225-232. DOI: 10.1111/j.1438-8677.2010.00398.x

INTECH



# Oleosome Oil Storage in the Mesocarp of Two Avocado Varieties

Fernando Sánchez-Albarrán<sup>1</sup>, Rafael Salgado-Garciglia<sup>1</sup>, Jorge Molina-Torres<sup>2</sup>, and Rodolfo López-Gómez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Avenida Francisco J. Múgica S/N Ciudad Universitaria, C.P. 58030 Morelia, Michoacán, MÉXICO

<sup>2</sup> Laboratorio de Fitobioquímica Depto. de Biotecnología y Bioquímica Cinvestav IPN Unidad Irapuato Km 9.6 Libramiento Norte, C.P. 36821 Irapuato, Guanajuato, MÉXICO

**Abstract:** Studies on avocado oil have focused on the most common commercial cultivars, Hass, Fuerte, and Bacon, rather than the less common varieties, *P. americana* var. *drymifolia* and *P. americana* var. *americana*, even though the *drymifolia* variety has a higher oil content and the *americana* variety is the most common avocado grown in the tropics. The most abundant storage structures for plant oils are the oleosomes, and the aim of this study was to determine the oleosome size, oil yield, and fatty acid composition of the *americana* and *drymifolia* varieties, using the Hass cultivar as a reference. Differences were found between the three avocado types for 1) oil yield, with *drymifolia* having higher and *americana* lower oil content ( $p < 0.05\%$ ), 2) oleosome size, with Hass having a larger (41.53  $\mu\text{m}$ ) and *americana* a smaller (11.96  $\mu\text{m}$ ) size, and 3) fatty acid composition, with the *americana* and *drymifolia* varieties showing less monounsaturated fatty acids (oleic) and more polyunsaturated fatty acids (linoleic) and saturated fatty acids (palmitic); while Hass had a high level (60%) of monounsaturated fatty acids. Small but significant differences were also found between oleosome and mesocarp oils isolated from the *drymifolia* and Hass types.

**Key words:** avocado, fatty acids, oleosome, GC/MS

## 1 INTRODUCTION

The main feature that distinguishes the avocado fruit *Persea americana* Mill. is the high content of oil in the mesocarp, which gives the fruit its creamy texture and contributes to its flavor. The oil is a source of saturated palmitic and stearic acid, monounsaturated oleic and palmitoleic acid, and polyunsaturated linoleic and linolenic acid fatty acids that impart health benefits through anticholesterolemic, antioxidant, and anti-inflammatory activities<sup>13</sup>. Studies on avocado fruit oil have mostly focused on the commercial cultivars, such as Hass, Bacon, and Fuerte, whereas few studies have been carried out on the fruits of native Mexican *P. americana* var. *drymifolia* and American *P. americana* var. *americana* varieties, despite their excellent medicinal and nutritional properties<sup>47</sup>.

The avocado tree belongs to the family Lauraceae, a primitive group of Angiosperms that was domesticated during the pre-Hispanic period in Mesoamerica as three botanical varieties *P. americana* var. *americana*, *P. americana* var. *guatemalensis*, and *P. americana* var. *drymifolia*.

The *americana* variety comes from Central America, where it is known as *palta* or *pagua*, and produces a large fruit that can reach 25 cm in length and weigh over 300 g. The fruit has a low oil content, ranging from 2.5 to a maximum of 8, and the fruit pericarp is green in color, changing to brownish when ripe. The *guatemalensis* variety is native to the region between Chiapas southern México and Guatemala and produces a small fruit with a thick and corky pericarp. The oil content of the *guatemalensis* mesocarp ranges from 10 to 13. The *drymifolia* variety, also known as the native Mexican avocado, comes from the central and eastern regions of México. Unlike the other two varieties, which are adapted to tropical and subtropical climates, it tolerates a cold temperate climate and higher altitudes, and is resistant to some diseases. The *drymifolia* fruits have an anise scent with a thin, edible, pericarp that is colored green to dark purple almost black when ripened and the fruits possess the highest oil content, reaching 15 to 20 and above<sup>1,811</sup>.

In plants, oils are stored intracellularly as lipid droplets,

\*Correspondence to: Rodolfo López-Gómez, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Avenida Francisco J. Múgica S/N Ciudad Universitaria, C.P. 58030 Morelia, Michoacán, MÉXICO

E-mail: lgomez@umich.mx

Accepted October 8, 2018 (received for review August 28, 2018)

Journal of Oleo Science ISSN 1345-8957 print / ISSN 1347-3352 online

http://www.jstage.jst.go.jp/browse/jos/ http://mc.manuscriptcentral.com/jjocs

called oleosomes, which are structures similar to micelles. The oleosomes are composed of a triacylglycerol matrix surrounded by a phospholipid monolayer. Unlike micelles, the oleosomes have a surrounding protein coat consisting primarily of oleosins. The coat proteins prevent the coalescence of oils and maintain the strong relationship between the oil and the oleosome surface. Alterations in the oleosin structure modifies the oleosome and can negatively affect the germination of some seeds<sup>1214</sup>.

The oleosomes in avocado mesocarp have not been associated with germination, but oleosomes have been detected in the mesocarp of oil palm, olive, and avocado fruits. The oleosomes in fruit mesocarp are larger in size than seed oleosomes; for example, in olive fruits, the oleosomes range in size from 0.5 to 2  $\mu\text{m}$  in the seeds and from 10 to 20  $\mu\text{m}$  in the mesocarp. Similarly, in palm oil fruits, the oleosomes range in size from 4 to 26  $\mu\text{m}$  in the seeds and from 4 to 32  $\mu\text{m}$  in the mesocarp. Ho et al<sup>2014</sup> related the oil content with the size and number of oleosomes in the oil palm fruit mesocarp, reporting that a higher oil content is associated with a higher number of smaller oleosomes<sup>1518</sup>.

Although the avocado fruit of the Mexican *drymifolia* variety has a high oil content, no characterization studies have been conducted on its oil storage cellular structures, on the oil composition, or on the possible differences between the previously reported cultivars and the botanical varieties. In this work, we compared the location, profile, and fatty acid composition of the oil from the mesocarp and isolated oleosomes of *P. americana* var. *drymifolia* and *P. americana* cv. Hass to the oil extracted from *P. americana* var. *americana*.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Plant materials

All avocado fruits were collected at the ripening stage. The fruits of *P. americana* var. *drymifolia* were collected in Petembo, Michoacán México Latitude 19.1167, Longitude 101.493611; the fruits of *P. americana* var. *americana* were purchased at a local market in Mérida Yucatán México, and the fruits of *P. americana* cv. Hass were acquired at a local market in Morelia, Michoacán, México. The fruits were washed, peeled, and destoned to separate the pulp mesocarp from the seeds and pericarp.

Some mesocarp slices from each avocado variety were used for histological analysis, while others were ground to obtain oleosomes or used for oil extraction.

### 2.2 Histologic analysis

The tissues were embedded in TissueTeck<sup>TM</sup> and then frozen at 23 for component solidification in cryostat Hyrax c25 Zeiss<sup>TM</sup> prior to slicing into 70  $\mu\text{m}$  thick sections. The slices were fixed for 15 min in 4 formalde-

hyde/15 glycerol, thoroughly rinsed with distilled water, stained for 5 min with Sudan III, rinsed with 70 ethanol, stained for 5 min with toluidine blue, and rinsed with distilled water. The slides were observed by light microscopy at 40 magnification. The images were analyzed with ImageJ <https://imagej.nih.gov/ij/> software to obtain areas, perimeters, and Feret's diameters for the red-stained oleosomes.

### 2.3 Oleosome isolation and oil extraction

Oleosomes were obtained by the Tzen method<sup>19</sup> consisting of flotation on sucrose buffers followed by one wash with detergent Tween 20<sup>TM</sup> and one wash with ionic solution 2M NaCl. The oleosome oils in 300  $\mu\text{L}$  of oleosome suspension were recovered using 3 mL of chloroform/methanol 2:1 C/M. The mesocarp oils were recovered from 500 mg of mesocarp finely ground in liquid nitrogen and rinsed three times with 3 mL of C/M per rinse. The solvent was evaporated in a nitrogen atmosphere and the oil was desiccated for 48 h at 37. Triplicate oil extractions were conducted and the yield was calculated for each sample. Hass avocado oil was used as a reference.

### 2.4 Reversed phase thin layer chromatography

Reversed-phase thin-layer chromatography RP-TLC was carried out on RP-C18 thin-layer plate Merck 60-RP-18 as the stationary phase and dichloromethane: acetic acid: acetone 20:40:50 as the mobile phase, according to a method obtained from the European pharmacopoeia<sup>20</sup>. About 5 mg of oil was loaded per lane and the plate was developed once. The plates were treated with phosphomolybdic acid and heated for 3 min at 95 to reveal the triacylglycerol TAG patterns, which were compared with those obtained from commercial olive and avocado oils used as references.

### 2.5 GC/MS

The fatty acid composition was determined for the oil of each avocado variety by an acid derivatization method in 2 mL reaction vials. The reaction mixture, consisting of 100  $\mu\text{L}$  of sample oil and 1 mL of 1M HCl in methanol, was heated at 80 for 1 h. The methyl esters were recovered with hexane and the solvent was evaporated with nitrogen gas. The methyl esters were resuspended in 200  $\mu\text{L}$  of methanol, and 1  $\mu\text{L}$  was injected into a GC/EIMS Agilent series 5975C instrument splitless and 1 mL/min of helium as the carrier equipped with an Agilent 122-0162UI DB-1ms Ultra Inert column 60 m 250  $\mu\text{m}$  0.25  $\mu\text{m}$ . The oven was held at 150 for 3 min and then heated to 300 at a rate of 4/min and held for 20 min at the final temp. The separated methyl esters were detected with a mass detector working in the electronic impact EI mode, and data were collected in the scan mode from 50–550  $m/z$ .

## 2.6 Fatty acid identification and quantification

Chromatograms were analyzed with AMDIS software and the NIST database <http://chemdata.nist.gov/dokuwiki/doku.php?id=chemdata:amdis> and <https://www.nist.gov/srd/nist-standard-reference-database-1a-v17> for identification of signal peaks. The fatty acid peaks were identified by their retention times and mass spectra, and the percentage of each fatty acid was estimated using the area under the curve.

## 2.7 Statistics

All data were analyzed with R software and the percentage data were transformed using the formula:

$$adj = \frac{180}{\pi} \sin^{-1} \sqrt{\frac{p}{100}}$$

where:

adj adjusted percent

original percent expressed as centesimal

to normalize the distribution of data and to allow variance analysis ANOVA and calculation of the mean differences Tukey test .

## 3 RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Oleosome staining

Sudan III staining allowed *in situ* observation of the

oleosomes Fig. 1 . Toluidine blue gave non-specific purple-blue staining of proteins and a slight staining of the cell wall. Sudan III stains neutral lipids, such as TAGs, an orange-red color, so the oleosomes appeared as spheroids with an orange to reddish-brown color. The oleosome mean size differed between the three avocado varieties Table 1 : they were small 11.961.44 μm and dispersed in *P. americana* var. americana Fig. 1 panel A , large 1.53

6.83 μm and without form in *P. americana* cv. Hass Fig. 1 panel C , and clustered in *P. americana* var. drymifolia

Fig. 1 panel B . The cluster size and shape were very similar to a single oleosome from the Hass cultivar; however, each oleosome that formed the drymifolia cluster had a smaller size 1.528.49 μm and a spheroidal shape; this difference was evident because the toluidine blue stained the protein coat that separated the oleosomes, so the oleosomes appeared as individual structures with dark purple borders. The protein in the Hass cultivar appeared as violaceous-blue stained patches on the oleosome surface, but no oleosome clusters were spotted; the size difference was evident despite the high variability. Hass avocado mesocarp had larger oleosomes  $p < 0.05$

As reported by Platt<sup>21</sup> and Huang<sup>16</sup> , avocado mesocarp cells possess oleosomes and the Sudan III staining reveals the presence of TAGs inside them, while toluidine blue stains the oleosome protein coat. This differential staining allowed the observation of the oleosome clusters in drymi-

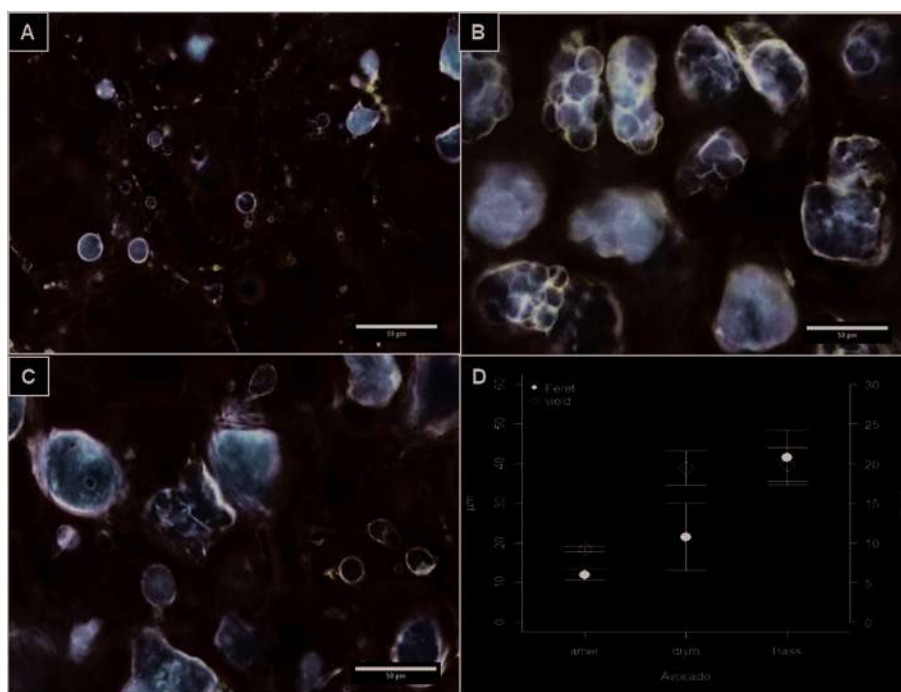


Fig. 1 Stained micrographs of different avocado varieties. A *Persea americana* variety americana, B *Persea americana* variety drymifolia, C Hass. Oleosomes are orange-red spheroids, the violet-blue stain indicates proteins on the oleosomes, and the lines indicate cell walls. D Comparison of oil yield and the Feret's diameter of the oleosomes μm ; amer *Persea americana* var. americana, drym *P. americana* var. drymifolia, Hass *P. americana* cv. Hass.

**Table 1** Oleosome sizes of avocado fruit mesocarp.

<i>Persea americana</i>	Mean	Sd	Min	Max
	Feret			
var. americana	11.96329	1.437111	10.62764	13.48394
var. drymifolia	21.51686	8.490041	11.89756	27.96436
cv. Hass	41.52600	6.828195	34.21076	47.73110
	Area			
var. americana	109.9883	18.06308	98.07774	130.7719
var. drymifolia	387.5328	214.95073	142.28875	543.2507
cv. Hass	1150.2934	305.00185	798.77403	1344.8073
	Perimeter			
var. americana	33.61876	3.409088	31.13622	37.50571
var. drymifolia	60.78617	22.850673	34.59213	76.63228
cv. Hass	114.54491	18.867917	93.95158	131.00066

Data obtained with ImageJ software

folia mesocarp, which has not been previously reported. A larger size and limited protein cover was recently reported by Huang<sup>16</sup> for Hass mesocarp oleosomes, but a complete protein cover has been related to a smaller oleosome size<sup>12</sup> and the presence of more oleosin envelope protein has been associated with a higher oil content<sup>13</sup>. Both of these conditions were observed for the drymifolia variety, which had the highest oil content and a median oleosome size. The americana variety had smaller oleosomes that appeared fully coated by proteins, but their low oil content could be related to low lipid synthesis in this variety.

### 3.2 Oleosome isolation and mesocarp oil content

Oleosomes were only recovered from the fruits of *P. americana* var. drymifolia and cv. Hass. In *P. americana* var. americana, the oleosome phases were too thin and impossible to recover. The americana variety had the lowest oil content, at 2.56%, in agreement with the value of 2.5-8% previously reported by Whiley<sup>1</sup>. This low oil content could explain the difficulty of oleosome isolation from this fruit variety. The drymifolia fruit mesocarp had the highest oil content, at 13.27%  $p < 0.05$ , while Hass mesocarp had a content of 9.57. These values are lower than those previously reported<sup>1</sup> because the present values were expressed on a fresh matter basis, while other reports refer to dry matter. Since the dry matter is about 30% meaning a loss of 70% as water<sup>11</sup>, the relevant dry weight percentages would be 8.53% for americana, 44.23% for drymifolia, and 31.9% for Hass.

Figure 1 panel D shows the correlation between mesocarp oil content and oleosome size. The analysis of variance  $p < 0.05$  confirmed that the americana variety has the lowest oil content and the smallest oleosome sizes, while the highest oil content was found for the drymifolia variety.

The drymifolia variety had smaller oleosomes than the Hass cultivar, but a higher oil content. This result suggests that the mesocarp oil content does not directly relate to oleosome size or that the content varies across a range of sizes.

TAG accumulation has been related to cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*<sup>22</sup>; therefore, the higher content of TAG in the drymifolia variety could be due to its adaptation to the growth conditions at high elevations 2000 meters above sea level and a temperate climate. By contrast, the americana variety grows at lower elevations 1000 meters above sea level and a tropical climate<sup>23</sup> that would favor a lower oil content.

### 3.3 Reversed phase thin layer chromatography of oleosome triacylglycerides

Triacylglycerides are the main storage components in avocado oleosomes. Figure 2 shows the RP-TLC results for the TAG profiles for the different oleosome oils. The profiles for solvent-extracted oils show high RF bands lanes 1-3. The profile banding for the americana variety has a low intensity lane 3, whereas the commercial avocado and olive oil samples have a greater number of bands lanes 4, 5. All the profiles are similar to the olive oil bands previously reported<sup>20</sup>, because they all show low RF bands. The RP-TLC data indicate that the TAG profile is specific for each avocado variety and for specific extraction methods. The method used here was obtained from the European pharmacopeia, which uses this method to compare samples against oil patterns to detect oil mixtures and adulterations. The fatty acids associated with triglycerides occur in several combinations, so RP-TLC is used for quality control, as it separates different TAG species depending on their physical and chemical properties. Phosphomolybdic

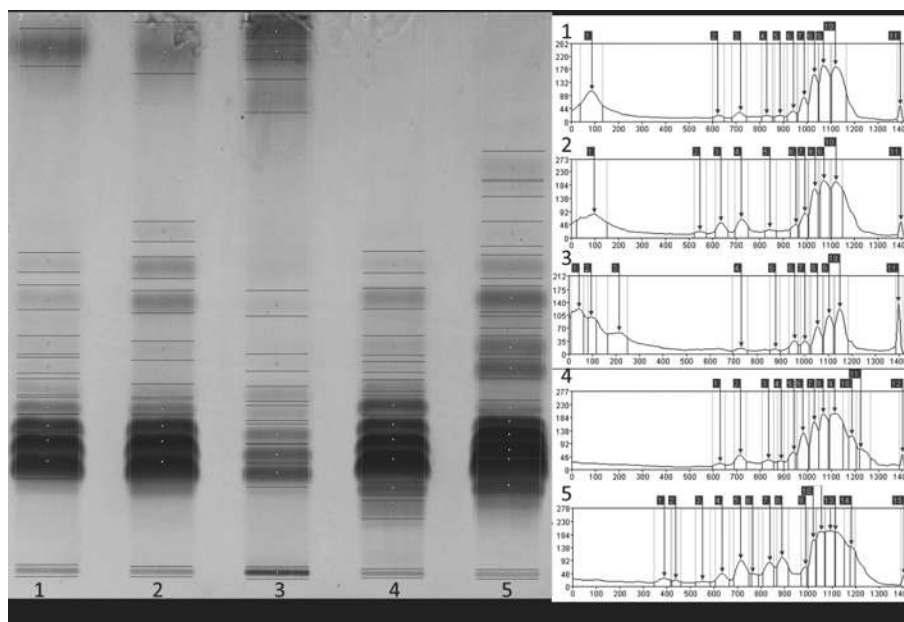


Fig. 2 Reversed-phase thin layer chromatography showing the triacylglyceride TAG profiles of 1 Hass avocados *Persea americana* X Mill. cv. Hass , 2 Mexican avocados *drymifolia* variety , 3 American avocados *americana* variety , 4 commercial olive oil, and 5 commercial avocado oil. TAGs were detected with phosphomolybdic acid.

acid treatment then oxidizes the unsaturated fatty acids to develop a banding pattern that is characteristic for the TAG composition of the oil. However, this pattern can be altered by the extraction method or by mixing or adulterating the oils<sup>20</sup>.

This is the first report of avocado oil banding profiles for commercial avocado oil extracted by extrusion from Hass fruits and for fruits of the Hass, *drymifolia*, and *americana* varieties extracted with a chloroform/methanol solvent mixture.

### 3.4 Avocado mesocarp fatty acid profiles

Although acid derivatization is a widely reported reaction for determining fatty acid profiles, most papers published on avocado oil have used alkaline methods. For validation purposes, we compared the fatty acid profile data previously reported for the Hass cultivar obtained using the alkaline method<sup>7, 24, 26</sup> with the fatty acid profile obtained by the acid method. As shown in Fig. 3, in all cases, no significant differences  $p < 0.05$  were found, which validated the use of the acid method.

Figure 4 shows the fatty acid composition of the mesocarp tissues of the *drymifolia* and *americana* varieties and the Hass cultivar. A clear and inversely proportional difference is observed between oleic ole -palmitic pal and linoleic lin -palmitoleic pol fatty acids.

The Hass cultivar has a higher oleic content and a lower content of palmitic and stearic, whereas the *drymifolia* and *americana* varieties have similar oleic and palmitic acid contents respectively, 42 and 38 for *drymifolia*

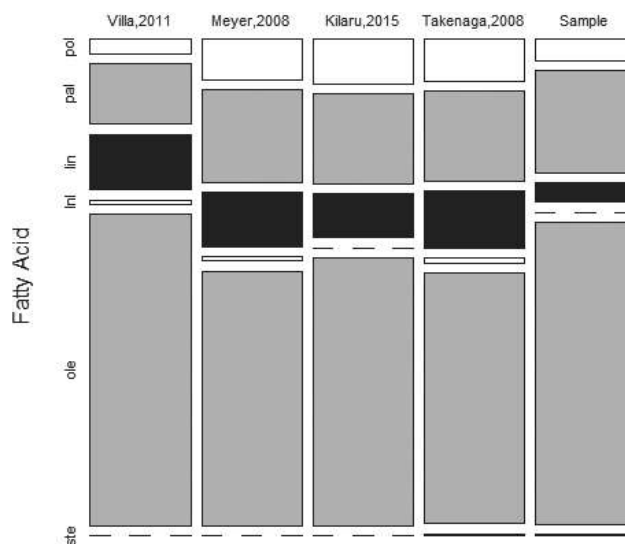


Fig. 3 Fatty acid composition of oil from Hass avocado *Persea americana* X Mill. cv. Hass, as reported by Villa 2011<sup>7</sup>, Meyer 2008<sup>25</sup>, Kilaru 2015<sup>24</sup> & Takenaga 2008<sup>26</sup> and measured with an acid method. oleoleic, palpalmitic, linlinoleic, lnl linolenic, and stearic acids.

and 41.7 and 39.1 for *americana*. The *americana* variety has the highest linoleic and stearic content, whereas *drymifolia* has the highest palmitoleic acid content. Differences are evident between oils from the mesocarp and oils from the oleosomes. The palmitic and linoleic acid levels are higher and the palmitoleic acid levels

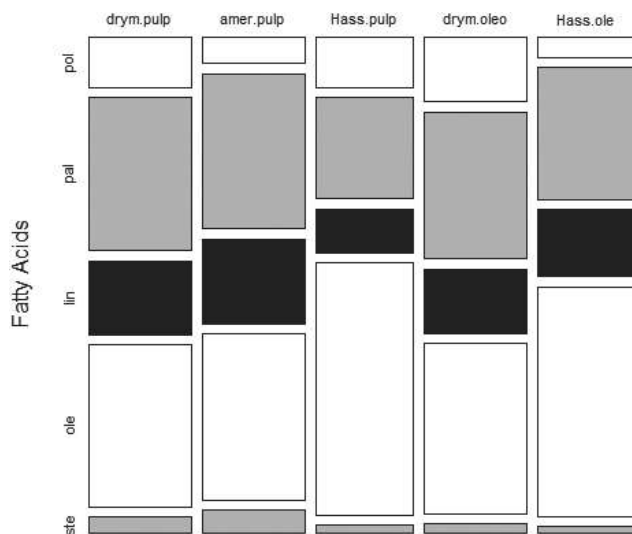


Fig. 4 Fatty acid composition of oil from different avocado varieties; amer *Persea americana* var. americana, drym *P. americana* var. drymifolia, Hass *P. americana* cv. Hass; pulp mesocarp, oleo oleosome, pol palmitoleic, pal palmitic, lin linoleic, ole oleic and ste stearic acids.

are lower in Hass oleosome oil than in Hass mesocarp oil. Conversely, the palmitoleic acid levels are higher and the linoleic and stearic acids are lower in drymifolia oleosome oil than in drymifolia mesocarp oil.

Avocado oil, as with most vegetable oils, is rich in palmitic and oleic acids. As previously reported, Hass avocados have far more oleic than palmitic acid<sup>7,24,26</sup> and these levels are close to those reported for olive oil that has high oleic acid concentrations<sup>70</sup> and low palmitic and linolenic acid concentrations<sup>16</sup><sup>27</sup>. This finding can explain the common bands observed for Hass oil and olive oil on the RP-TLC plates. The drymifolia and americana varieties have far more palmitic acid accounting for as much as 39% of the fatty acids and far less oleic acid, at just 42%.

Figure 5 shows the saturation profile for the analyzed oils. The saturated fatty acids SFAs, palmitic and stearic acid, accounted for about 40% of the fatty acids in the mesocarp oil extract of the drymifolia and americana varieties, and had the highest levels  $p < 0.05$ . Conversely, the commercial avocado oil had lower levels, at 7.6%. The monounsaturated fatty acids MUFAs, palmitoleic and oleic acid, had the highest values in the mesocarp extract of the Hass cultivar and the commercial avocado oil, accounting for about 80% of the total fatty acids, whereas the americana and drymifolia mesocarp extracts contained only about 45% of these MUFAs. The polyunsaturated fatty acids PUFAs, linolenic and linoleic acid, were highest in the mesocarp of the americana and drymifolia varieties, accounting for about 13% and lowest in the Hass cultivar.

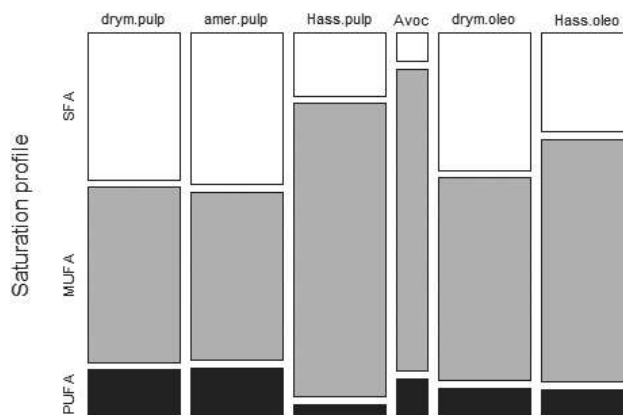


Fig. 5 Saturation profiles of oil from different avocado varieties; amer *Persea americana* var. americana, drym *P. americana* var. drymifolia, Hass *P. americana* cv. Hass, Avoc commercial avocado oil, pulp mesocarp, oleo oleosome. SFA saturated fatty acids, MUFA monounsaturated fatty acids, PUFA polyunsaturated fatty acids.

3.6. The Hass cultivar and the drymifolia variety also displayed few differences between the oleosome and mesocarp extracts in terms of their unsaturated fatty acid profiles.

The findings reported here offer new insights into the composition of avocado oils and indicate useful commercial traits for the different avocado types, as the saturation profiles of the americana and drymifolia avocados demonstrate a lower percentage of monounsaturated fatty acids

MUFAs and a higher percentage of polyunsaturated fatty acids PUFAs. Recent work on saturation profiles and health effects now suggests that replacing dietary SFAs with PUFAs can have a modest effect on coronary heart disease risk although the effect of replacing SFAs with MUFAs is less certain<sup>28</sup>. The saturation level of membrane fatty acids is also related to cold acclimation, and this can explain the differences between mesocarp and oleosome oils, as the temperate-climate drymifolia has more PUFAs in the mesocarp oil than in the oleosome oil **Table 2**.

The composition of Hass pulp and isolated idioblast oil cells has recently been reported<sup>29</sup> and the fatty acid composition was similar for both mesocarp and idioblast oils. This previous work focused on the acetogenins of avocado but investigated the fatty acid composition as well. The results clearly showed that for cv. Hass the oleosome fatty acids were enriched in palmitic acid, while the idioblasts contained the same fatty acids as the mesocarp. Other studies of idioblasts and their chemical composition have indicated that these oil cells contain a wide range of chemical compounds, including alkaloids, sesquiterpenes, and

Table 2 Avocado mesocarp and oleosome oil yield and composition.

<i>Persea americana</i>	Tissue	Yield	palmitoleic	palmitic	linoleic	oleic	stearic
var. drymifolia	Mesocarp	13.05 <sup>ab</sup> ± 0.32	12.49 <sup>ab</sup> ± 2.82	38.73 <sup>a</sup> ± 2.20	18.74 <sup>a</sup> ± 3.68	40.73 <sup>b</sup> ± 1.67	3.90 <sup>ab</sup> ± 0.89
var. drymifolia	Oleosome	13.49 <sup>a</sup> ± 0.02	16.30 <sup>a</sup> ± 1.89	37.42 <sup>a</sup> ± 0.25	16.36 <sup>ab</sup> ± 0.59	43.29 <sup>b</sup> ± 1.16	2.49 <sup>bc</sup> ± 0.47
var. americana	Mesocarp	2.56 <sup>d</sup> ± 0.19	6.52 <sup>bc</sup> ± 0.62	39.15 <sup>ab</sup> ± 3.89	21.40 <sup>a</sup> ± 1.99	41.72 <sup>b</sup> ± 5.27	5.94 <sup>a</sup> ± 0.04
cv. Hass	Mesocarp	9.82 <sup>bc</sup> ± 0.40	11.80 <sup>ab</sup> ± 0.88	24.28 <sup>c</sup> ± 1.38	10.59 <sup>b</sup> ± 3.25	60.16 <sup>a</sup> ± 2.69	1.94 <sup>c</sup> ± 0.26
cv. Hass	Oleosome	9.32 <sup>c</sup> ± 1.68	4.53 <sup>c</sup> ± 3.93	30.92 <sup>b</sup> ± 2.62	15.83 <sup>ab</sup> ± 0.80	53.77 <sup>a</sup> ± 2.90	1.65 <sup>c</sup> ± 1.43
Avocado	NA	NA	0.00	13.90	13.22	64.87	7.67

<sup>a, b, c, d</sup> groups with significant differences;  $p = 0.05$

hydroperoxides<sup>21</sup>, indicating that fatty acids are not the most abundant components in these structures.

#### 4 CONCLUSION

Avocado mesocarp oil is stored in oleosomes and a higher oil content 13 fresh weight is observed in *P. americana* var. drymifolia, which has a large oleosome size of 21.52 µm. The RP-TLC band profiles of avocado oils show three common bands that are conserved in all avocado types and in olive oil, but the rest of the bands are specific for each avocado variety and depend on the extraction method. The fatty acid oil composition of the drymifolia and americana avocado varieties is lower in oleic and higher in palmitic when compared to the oil from the Hass cultivar. This higher palmitic and linoleic content can be a useful trait that can extend the commercial use of avocado oils.

#### Acknowledgments

We extend special thanks to Luis María Suárez-Rodríguez from the Laboratory of Fisiología Molecular de Plantas from Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Enrique Ramírez-Chávez from the Laboratory of Fitobioquímica Depto. de Biotecnología y Bioquímica, Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato, and Esperanza Meléndez-Herrera and Edel Pineda-López from the Laboratory of Ecofisiología Animal from Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, for their technical support.

We also thank Libier Magaña-Ruiz for preparation and staining of the avocado tissues.

We are grateful to CONACYT for scholarship funding and to CIC - Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo - for financial support.

#### References

- 1 Whiley, A.W.; Schaffer, B.; Wolstenholme, B.N. *The avocado : botany, production and uses*. CABI Pub 2002 .
- 2 Lewis, C.E. The maturity of avocados a general review. *J. Sci. Food Agric.* **29**, 857-866 1978 .
- 3 Biale, J.B.; Young, R.E. *The avocado Pear. in The Biochemistry of fruits and their products* Hulme, A.C. eds. , Academic Press, New York 1971 .
- 4 Ibarra-Laclette, E.; Méndez-Bravo, A.; Pérez-Torres, C.A.; Albert, V.A.; Mockaitis, K.; Kilaru, A.; López-Gómez, R.; Cervantes-Luevano, J.I.; Herrera-Estrella, L. Deep sequencing of the Mexican avocado transcriptome, an ancient angiosperm with a high content of fatty acids. *BMC Genomics* **16**, 592015 .
- 5 Bora, S.P.; Narain, N.; Rocha, R.V.M.; Paulo M.Q. Characterization of the oils from the pulp and seeds of avocado cultivar: Fuerte fruits. *Grasas y Aceites* **52**, 171-172001 .
- 6 Dreher, M.L.; Davenport, A.J. Hass avocado composition and potential health effects. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **53**, 738-752013 .
- 7 Villa-Rodríguez, J. Effect of maturity stage on the content of fatty acids and antioxidant activity of Hass avocado. *Food Res.* **44**, 1231-1232011 .
- 8 Barrientos-Priego, A.F.; García-Villanueva, E.; Avitia-García, E. Anatomía del fruto de aguacate, ¿drupa o baya?. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* **2**, 189-198996 .
- 9 Lopez-Gomez, R.; Torres-Cardenas, Y.; Chavez-Moctezuma, M.; Salgado-Garciglia, R.; Jimenez-Morilaila, B.; Coronoa-Armenta, G.; Herrera-Estrella, L. Genomics of avocado criollo fruit *Persea americana* Mill. VAR. Drymifolia . *Proceeding VI World Avocado Congr.* 2007 .
- 10 Barrientos Priego, A.F. *El aguacate. CONABIO Biodiversitas* A.G.T. Editor, México D.F. 2010 .
- 11 Ozdemir, F.; Topuz, A. Changes in dry matter, oil content and fatty acids composition of avocado during harvesting time and post-harvesting ripening period. *Food Chem.* **86**, 79-82004 .
- 12 Huang, A.H. Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. *Plant Physiol.* **110**, 1055-1061996 .

- 13 Shimada, T.L.; Shimada, T.; Takahashi, H.; Fukao, Y.; Hara-Nishimura, I. A novel role for oleosins in freezing tolerance of oilseeds in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **55**, 798-809 (2008) .
- 14 Shimada, T.L.; Hara-Nishimura, I. Oil-body-membrane proteins and their physiological functions in plants. *Biol. Pharm. Bull.* **33**, 360-363 (2010) .
- 15 Ho, L.; Nair, A.; Yusof, H. Morphometry of lipid bodies in embryo, kernel and mesocarp of oil palm: Its relationship to yield. *Am. J. Plant Sci.* **5**, 1163-1173 (2014) .
- 16 Huang, M.-D.; Huang, A.H.C. Subcellular lipid droplets in vanilla leaf epidermis and avocado mesocarp are coated with oleosins of distinct phylogenetic lineages. *Plant Physiol.* **171**, 1867-1878 (2016) .
- 17 Ross, J.H.E.; Sanchez, J.; Millan, F.; Murphy, D.J. Differential presence of oleosins in oleogenic seed and mesocarp tissues in olive *Olea europaea* and avocado *Persea americana* . *Plant Science* **93**, 203-210 (1993) .
- 18 Giannoulia, K.; Banilas, G.; Hatzopoulos, P. Oleosin gene expression in olive. *J. Plant Physiol.* **164**, 104-107 (2007) .
- 19 Tzen, J. T., Peng, C. C., Cheng, D. J., Chen, E. C. & Chiu, J. M. A new method for seed oil body purification and examination of oil body integrity following germination. *J. Biochem.* **121**, pp. 762-768 (1997) .
- 20 The European Pharmacopoeia Commission. Identification of fatty oils by thin-layer chromatography. in *European pharmacopoeia 8.0* p. 106 (2008) .
- 21 Platt, K.A.; Thomson, W.W. Idioblast oil cells of avocado: distribution, isolation, ultrastructure, histochemistry, and biochemistry. *Int. J. Plant Sci.* **153**, 301-310 (1992) .
- 22 Degenkolbe, T.; Giavalisco, P.; Zuther, E.; Seiwert, B.; Hinch, D.K.; Willmitzer, L. Differential remodeling of the lipidome during cold acclimation in natural accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **72**, 972-982 (2012) .
- 23 Barrientos, A.; López, L. Historia y genética del aguacate. *Mem. Fund. Salvador Sánchez Colín* 100-121 (1998) .
- 24 Kilaru, A.; Cao, X.; Dabbs, P.B.; Sung, H.-J.; Rahman, M.M.; Thrower, N.; Zynda, G.; Podicheti, R.; Ibarra-Laclette, E.; Herrera-Estrella, L.; Mockaitis, K.; Ohlrogge, J.B. Oil biosynthesis in a basal angiosperm: transcriptome analysis of *Persea americana* mesocarp. *BMC Plant Biol.* **15**, 203 (2015) .
- 25 Meyer, M.D.; Terry, L.A. Development of a rapid method for the sequential extraction and subsequent quantification of fatty acids and sugars from avocado mesocarp tissue. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 7439-7445 (2008) .
- 26 Takenaga, F., Matsuyama, K., Abe, S., Torii, Y. & Itoh, S. Lipid and Fatty Acid Composition of Mesocarp and Seed of Avocado Fruits Harvested at Northern Range in Japan. *J. Oleo Sci.* **57**, 591-597 (2008) .
- 27 Gutfinger, T. Polyphenols in olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **58**, 966-968 (1981) .
- 28 Micha, R.; Mozaffarian, D. Saturated fat and cardiometabolic risk factors, coronary heart disease, stroke, and diabetes: A fresh look at the evidence. *Lipids* **45**, 893-903 (2010) .
- 29 Rodríguez-López, C.E.; Hernández-Brenes, C.; Treviño, V.; Díaz de la Garza, R.I. Avocado fruit maturation and ripening: Dynamics of aliphatic acetogenins and lipidomic profiles from mesocarp, idioblasts and seed. *BMC Plant Biol.* **17**, 9-12 (2017) .

## 11. Bibliografía

- Barrientos, A. and López, L. (1998) 'Historia y genética del aguacate', *Mem. Fund. Salvador Sánchez Colín*, (6), pp. 100-121. Available at: [www.avocadosource.com/.../CICTAMEX\\_1998-2001\\_PG\\_100-121.pdf](http://www.avocadosource.com/.../CICTAMEX_1998-2001_PG_100-121.pdf).
- Barrientos Priego, A. F. (2010) *El aguacate*. México D.F.: A.G.T. Editor (88), pp. 1-7.
- Barrientos-Priego, A., García-Villanueva, E. and Avitia-García, E. (1996) 'Anatomía del fruto de aguacate, ¿drupa o baya?', *Rev. Chapingo Ser. Hortic.*, 2(2), pp. 189-198.
- Biale, J. and Young, R. (1971) 'The avocado Pear', in Hulme, A. C. (ed.) *Biochem. fruits their prod.* New York.: Academic Press.
- Bora, P. S. et al. (2001) 'Characterization of the oils from the pulp and seeds of avocado (cultivar: Fuerte) fruits', *Grasas y Aceites*, 52(3-4), pp. 171-174. doi: 10.3989/gya.2001.v52.i3-4.353.
- Chen, J. C., Tsai, C. C. and Tzen, J. T. (1999) 'Cloning and Secondary Structure Analysis of Caleosin, a Unique Calcium-Binding Protein in Oil Bodies of Plant Seeds', *Plant Cell Physiol.*, 40(10), pp. 1079-1086. doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a029490.
- Chua, A. C. N. et al. (2008) 'Characterization of oil bodies in jelly fig achenes', *Plant Physiol. Biochem.*, 46(5-6), pp. 525-532. doi: 10.1016/j.plaphy.2008.03.001.
- Cummings, K. and Schroeder, C. (1942) 'Anatomy of the avocado fruit', *Calif. Avocado Soc.*, 27, pp. 56-64. Available at: [http://www.avocadosource.com/CAS\\_Yearbooks/CAS\\_27\\_1942/CAS\\_1942\\_PG\\_056-064.pdf](http://www.avocadosource.com/CAS_Yearbooks/CAS_27_1942/CAS_1942_PG_056-064.pdf).
- Degenkolbe, T. et al. (2012) 'Differential remodeling of the lipidome during cold acclimation in natural accessions of *Arabidopsis thaliana*', *Plant J.*, 72(6), pp. 972-982. doi: 10.1111/tpj.12007.
- Dreher, M. L. and Davenport, A. J. (2013) 'Hass avocado composition and potential health effects.', *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* Taylor & Francis, 53(7), pp. 738-50. doi: 10.1080/10408398.2011.556759.
- Europe, C. of (2008) 'Identification of fatty oils by thin-layer chromatography', in *Eur. pharmacopoeia 8.0*. (8.0), p. 106.
- FAO, O. de las N. U. para la A. y la A. (2017) 'FAOSTAT'. Available at: <http://www.fao.org/faostat/>

es/#data (Accessed: 22 October 2018).

Giannoulia, K., Banilas, G. and Hatzopoulos, P. (2007) 'Oleosin gene expression in olive', *J. Plant Physiol.*, 164(1), pp. 104–107. doi: 10.1016/j.jplph.2006.03.016.

Gutfinger, T. (1981) 'Polyphenols in olive oils', *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 58(11), pp. 966–968. doi: 10.1007/BF02659771.

Hall, T. (1999) 'BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT', *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 41, pp. 95–98. doi: citeulike-article-id:691774.

Ho, L., Nair, A. and Yusof, H. (2014) 'Morphometry of Lipid Bodies in Embryo, Kernel and Mesocarp of Oil Palm: Its Relationship to Yield', *Am. J. ...*, (April), pp. 1163–1173. doi: 10.4236/ajps.2014.59129.

Horn, P. J. *et al.* (2013) 'Identification of a new class of lipid droplet-associated proteins in plants.', *Plant Physiol.*, 162(4), pp. 1926–36. doi: 10.1104/pp.113.222455.

Hsieh, K. and Huang, A. H. C. (2005) 'Lipid-rich tapetosomes in Brassica tapetum are composed of oleosin-coated oil droplets and vesicles, both assembled in and then detached from the endoplasmic reticulum.', *Plant J.*, 43(6), pp. 889–99. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02502.x.

Hsieh, K. and Huang, A. H. C. (2007) 'Tapetosomes in Brassica tapetum accumulate endoplasmic reticulum-derived flavonoids and alkanes for delivery to the pollen surface.', *Plant Cell*, 19(2), pp. 582–96. doi: 10.1105/tpc.106.049049.

Huang, A. H. (1996) 'Oleosins and oil bodies in seeds and other organs.', *Plant Physiol.*, 110(4), pp. 1055–61. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=160879&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Huang, C. Y. *et al.* (2013) 'Tandem oleosin genes in a cluster acquired in Brassicaceae created tapetosomes and conferred additive benefit of pollen vigor.', *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110(35), pp. 14480–5. doi: 10.1073/pnas.1305299110.

Huang, C.-Y. *et al.* (2009) 'Oil Bodies and Oleosins in Physcomitrella Possess Characteristics Representative of Early Trends in Evolution', *PLANT Physiol.*, 150(3), pp. 1192–1203. doi: 10.1104/pp.109.138123.

Huang, M.-D. and Huang, A. H. (2015) 'Bioinformatics Reveal Five Lineages of Oleosins and the Mechanism of Lineage Evolution Related to Structure/Function from Green Algae to Seed

- Plants', *Plant Physiol.*, 169(1), pp. 453–470. doi: 10.1104/pp.15.00634.
- Huang, M.-D. and Huang, A. H. (2016) 'Subcellular lipid droplets in vanilla leaf epidermis and avocado mesocarp are coated with oleosins of distinct phylogenetic lineages', *Plant Physiol.*, 171(July), pp. 1867–1878. doi: 10.1104/pp.16.00322.
- Ibarra-Laclette, E. *et al.* (2015) 'Deep sequencing of the Mexican avocado transcriptome, an ancient angiosperm with a high content of fatty acids.', *BMC Genomics*, 16(1), p. 599. doi: 10.1186/s12864-015-1775-y.
- Kanellis, a K., Solomos, T. and Mattoo, a K. (1989) 'Hydrolytic Enzyme Activities and Protein Pattern of Avocado Fruit Ripened in Air and in Low Oxygen, with and without Ethylene.', *Plant Physiol.*, 90(1), pp. 259–266. doi: 10.1104/pp.90.1.259.
- Kilaru, A. *et al.* (2015) 'Oil biosynthesis in a basal angiosperm: transcriptome analysis of *Persea Americana* mesocarp', *BMC Plant Biol.* *BMC Plant Biology*, 15(1), p. 203. doi: 10.1186/s12870-015-0586-2.
- Kim, H. U. (2002) 'A Novel Group of Oleosins Is Present Inside the Pollen of *Arabidopsis*', *J. Biol. Chem.*, 277(25), pp. 22677–22684. doi: 10.1074/jbc.M109298200.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. (2016) 'MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets', *Mol. Biol. Evol.*, 33(7), pp. 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.
- Lee, K. *et al.* (1994) 'Oleosins in the gametophytes of *Pinus* and *Brassica* and their phylogenetic relationship with those in the sporophytes of various species', *Planta*. Springer-Verlag, 193(3), pp. 461–469. doi: 10.1007/BF00201827.
- Lersten, N. and Czapinski, A. (2006) 'Oil bodies in leaf mesophyll cells of angiosperms: overview and a selected survey', ... *J. Bot.*, 93(12), pp. 1731–1739. Available at: <http://www.amjbot.org/content/93/12/1731.short>.
- Lewis, C. E. (1978) 'The maturity of avocados—a general review', *J. Sci. Food Agric.* Wiley-Blackwell, 29(10), pp. 857–866. doi: 10.1002/jsfa.2740291007.
- Lin, L.-J. *et al.* (2002) 'Steroleosin, a sterol-binding dehydrogenase in seed oil bodies.', *Plant Physiol.*, 128(4), pp. 1200–11. doi: 10.1104/pp.010928.
- Liu, Q. *et al.* (2012) 'Species-specific size expansion and molecular evolution of the oleosins in angiosperms.', *Gene*. Elsevier B.V., 509(2), pp. 247–57. doi: 10.1016/j.gene.2012.08.014.
- Lopez-Gomez, R. *et al.* (1992) 'A Method for Extracting Intact RNA from Fruits Rich in Polysac-

charides using Ripe Mango Mesocarp', *HortScience*, 27(5), pp. 440–442. Available at: <http://hortsci.ashspublications.org/content/27/5/440.short>.

Lopez-Gomez, R. et al. (2007) 'Genomics of Avocado Criollo Fruit (Persea americana Mill. VAR. Drymifolia)', in *Proceeding vi world avocado congr.* (978). Available at: <http://www.avocadosource.com/WAC6/en/Extenso/1c-42.pdf>.

Lu, H.-C. et al. (2010) 'Characterization of Oil Bodies in Adlay ( Coix lachryma-jobi L)', *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74(9), pp. 1841–1847. doi: 10.1271/bbb.100247.

Meyer, M. D. and Terry, L. A. (2008) 'Development of a rapid method for the sequential extraction and subsequent quantification of fatty acids and sugars from avocado mesocarp tissue', *J. Agric. Food Chem.*, 56(16), pp. 7439–7445. doi: 10.1021/jf8011322.

Micha, R. and Mozaffarian, D. (2010) 'Saturated fat and cardiometabolic risk factors, coronary heart disease, stroke, and diabetes: A fresh look at the evidence'. Wiley-Blackwell. doi: 10.1007/s11745-010-3393-4.

Ohlrogge, J. and Browse, J. (1995) 'Lipid biosynthesis.', *Plant Cell*, 7(July), pp. 957–970. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC160893/>.

Ozdemir, F. and Topuz, A. (2004) 'Changes in dry matter, oil content and fatty acids composition of avocado during harvesting time and post-harvesting ripening period', *Food Chem.*, 86(1), pp. 79–83. doi: 10.1016/j.foodchem.2003.08.012.

Pasaribu, B. et al. (2014) 'Identification of caleosin and two oleosin isoforms in oil bodies of pine megagametophytes', *Plant Physiol. Biochem.* Elsevier Masson SAS, 82, pp. 142–150. doi: 10.1016/j.plaphy.2014.05.015.

Platt, K. A. and Thomson, W. W. (1992) 'Idioblast oil cells of avocado: distribution, isolation, ultrastructure, histochemistry, and biochemistry', *Int. J. Plant Sci.*, 153(3), pp. 301–310. doi: 10.1086/297033.

Platt-Aloia, K. a., Oross, J. W. and Thomson, W. W. W. (1983) 'Ultrastructural study of the development of oil cells in the mesocarp of avocado fruit', *Bot. Gaz.*, 144(1), p. 49. doi: 10.1086/337343.

Platt-Aloia, K. and Thomson, W. (1981) 'Ultrastructure of the mesocarp of mature avocado fruit and changes associated with ripening', *Ann. Bot.* Available at: <http://aob.oxfordjournals.org/content/48/4/451.short>.

Pliego-Alfaro, F. et al. (2013) *Biotechnology In The Avocado Botany, Production and Uses*. 2nd

Editio. Edited by B. Schaffer, B. Wolstenholme, and A. Whiley. CAB International.

Rodríguez Suppo, F. (1992) *El aguacate*. México: AGT Edit.

Rodríguez-López, C. E. *et al.* (2017) 'Avocado fruit maturation and ripening: Dynamics of aliphatic acetogenins and lipidomic profiles from mesocarp, idioblasts and seed', *BMC Plant Biol.* *BMC Plant Biology*, 17(1), pp. 9–12. doi: 10.1186/s12870-017-1103-6.

Rooijen, G. van and Moloney, M. M. (1995) 'Structural Requirements of Oleosin Domains for Subcellular Targeting to the Oil Body', *Plant Physiol.*, 109(4), pp. 1353–1361. doi: 10.1104/pp.109.4.1353.

Ross, J. H. *et al.* (1993) 'Differential presence of oleosins in oleogenic seed and mesocarp tissues in olive (*Olea europaea*) and avocado (*Persea americana*)'. doi: 10.1016/0168-9452(93)90050-A.

SAGARPA-SIAP (2016) 'Producción anual por estado desde el sitio: <http://www.siap.gob.mx> consultado Noviembre del 2013.'

Saravanan, R. S. and Rose, J. K. C. (2004) 'A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues', *Proteomics*, 4(9), pp. 2522–2532. doi: 10.1002/pmic.200300789.

Shimada, T. L. and Hara-Nishimura, I. (2010) 'Oil-body-membrane proteins and their physiological functions in plants.', *Biol. Pharm. Bull.*, 33(3), pp. 360–363. doi: 10.1248/bpb.33.360.

Shimada, T. L. and Hara-Nishimura, I. (2015) 'Leaf oil bodies are subcellular factories producing antifungal oxylipins.', *Curr. Opin. Plant Biol.*, 25, pp. 145–50. doi: 10.1016/j.pbi.2015.05.019.

Shimada, T. L. *et al.* (2008) 'A novel role for oleosins in freezing tolerance of oilseeds in *Arabidopsis thaliana*', *Plant J.*, 55(5), pp. 798–809. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03553.x.

Takenaga, F. *et al.* (2008) 'Lipid and Fatty Acid Composition of Mesocarp and Seed of Avocado Fruits Harvested at Northern Range in Japan', *J. Oleo Sci.*, 57(11), pp. 591–597. doi: <http://doi.org/10.5650/jos.57.591>.

Team, R. core (2017) 'R: A Language and Environment for Statistical Computing'. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Available at: <https://www.r-project.org/>.

Tzen, J. T. *et al.* (1997) 'A new method for seed oil body purification and examination of oil body integrity following germination.', *J. Biochem.*, 121(4), pp. 762–768. Available at: <http://jb.oxfordjournals.org/content/121/4/762.short>.

Villa-Rodríguez, J. (2011) 'Effect of maturity stage on the content of fatty acids and an-

tioxidant activity of 'Hass' avocado', *Food Res.* .... Elsevier Ltd, 44(5), pp. 1231–1237. doi: 10.1016/j.foodres.2010.11.012.

Whiley, A. W., Schaffer, B. and Wolstenholme, B. N. (2002) *The avocado : botany, production and uses*. CABI Pub, p. 560. Available at: [https://books.google.com.mx/books?id=m708ngEACAAJ&hl=es&source=gbs\\_book\\_other\\_versions](https://books.google.com.mx/books?id=m708ngEACAAJ&hl=es&source=gbs_book_other_versions).

Yatsu, L. Y., Jacks, T. J. and Hensarling, T. P. (1971) 'Isolation of spherosomes (oleosomes) from onion, cabbage, and cottonseed tissues.', *Plant Physiol.*, 48(6), pp. 675–682. doi: 10.1104/pp.48.6.675.

Zou, J. *et al.* (1995) 'Induction of Lipid and Oleosin Biosynthesis by (+)-Abscisic Acid and Its Metabolites in Microspore-Derived Embryos of *Brassica napus* L.cv Reston (Biological Responses in the Presence of 8[prime]-Hydroxyabscisic Acid).', *Plant Physiol.*, 108(1575), pp. 563–571. doi: 108/2/563 [pii].