

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA



PROGRAMA DE POSGRADO EN AGROPLASTICULTURA

**Caracterización proteómica de plantas de guayule (*Parthenium argentatum*)
nativas de México**

TESIS

Presentada por:

FLOR CRISTINA PACHECO REYES

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN AGROPLASTICULTURA

Saltillo, Coahuila, México.

Diciembre, 2017

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA APLICADA
Programa de Maestría en Ciencias en Agroplasticultura

TESIS

**Caracterización proteómica de plantas de guayule (*Parthenium argentatum*)
nativas de México**

Presentada por:

FLOR CRISTINA PACHECO REYES

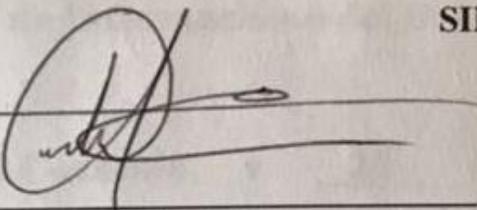
Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Agroplasticultura

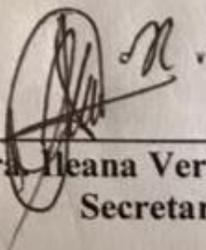
Asesorada por:

Dra. Ana Margarita Rodríguez Hernández
Dr. Marco Antonio Castillo Campohermoso

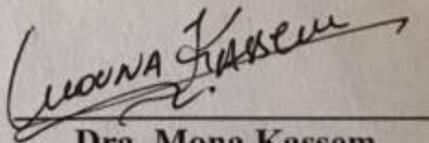
SINODALES



Dr. Antonio Cárdenas Flores
Presidente



Dra. Ileana Vera Reyes
Secretario



Dra. Mona Kassem
Vocal

Saltillo, Coahuila

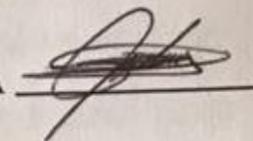
Diciembre, 2017

TESIS CON CARACTER ABIERTO

PROGRAMA: MAESTRÍA EN CIENCIAS EN AGROPLASTICULTURA

AUTOR: FLOR CRISTINA PACHECO REYES

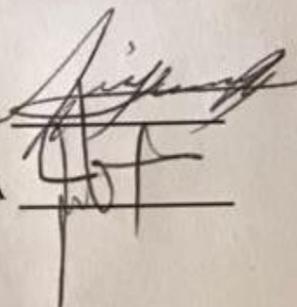
FIRMA



TITULO: Caracterización proteómica de plantas de guayule (Parthenium argentatum) nativas de México.

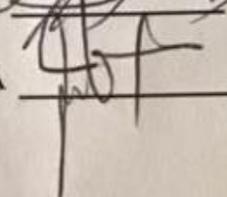
ASESORES: Dra. Ana Margarita Rodríguez Hernández

FIRMA



Dr. Marco A. Castillo Campohermoso

FIRMA



El Centro de Investigación en Química Aplicada clasifica el presente documento de tesis como ABIERTO.

Un documento clasificado como Abierto se expone en los estantes del Centro de Información para su consulta. Dicho documento no puede ser copiado en ninguna modalidad sin autorización por escrito del Titular del Centro de Información o del Director General del CIQA.

Saltillo, Coahuila, a 20 de diciembre de 2017



Sello de la Institución



Dr. Oliverio Santiago Rodríguez Fernández
Director General del CIQA

DECLARACIÓN

Declaro que la información contenida en la Parte Experimental así como en la Parte de Resultados y Discusiones de este documento y que forman parte de las actividades de investigación y desarrollo realizadas durante el período que se me asignó para llevar a cabo mi trabajo de tesis, será propiedad del Centro de Investigación en Química Aplicada.

Saltillo, Coahuila a 20 de diciembre de 2017



FLOR CRISTINA PACHECO REYES

Nombre y Firma



TESIS

**Caracterización proteómica de plantas de guayule (*Parthenium argentatum*)
nativas de México**

Presentada por:

FLOR CRISTINA PACHECO REYES

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Agroplasticultura

Asesorado por:

Dra. Ana Margarita Hernández Rodríguez

Dr. Marco Antonio Castillo Campohermoso

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento del presente trabajo de investigación a través del proyecto 247278 de la convocatoria “Proyectos de Desarrollo Científico para Atender Problemas Nacionales 2014” y por el apoyo económico brindado durante la realización de la maestría.

A mi directora de tesis la Dra. Ana Margarita Hernández Rodríguez por permitirme formar parte de este grupo de trabajo, por sus conocimientos científicos compartidos, pero sobre todo por sus consejos en la vida personal.

A mi director de tesis el Dr. Marco Castillo Campohermoso, por sus conocimientos brindados, por su labor en la colecta del material vegetal y revisión de este documento.

Al Dr. Carlos José Espinoza González por su disponibilidad y apoyo incondicional en el uso y manejo del ASE (primera parte del proyecto).

Al Dr. Antonio Serguei Ledezma Pérez por el aporte de conocimientos en la estandarización de las extracciones de resina y hule.

A la M.C. Brenda Baylon Palomino por el trabajo en equipo que realizamos para la estandarización del protocolo de extracción de resina y hule.

Al Dr. Eliel Ruiz May y al Instituto de Ecología (INECOL), por su colaboración en la segunda parte de esta investigación.

A la Q.F.B Brenda Hernández Cruz por toda la ayuda y conocimientos brindados en el laboratorio

A la Q.F.B. Claudia Vázquez Valencia por su ayuda en las extracciones de proteínas y por sus tips de laboratorio.

Al M.C José Miguel Elizalde Contreras, por su enorme paciencia al compartir sus conocimientos y técnicas en la preparación de muestras para los análisis proteómicos.

Al M.C Jiovany de los Santos por su valioso tiempo brindado en la integración de los datos proteómicos.

A la Dra. Mona Kassem por su ayuda y porras brindadas

A la Dra. Ileana por su colaboración en la revisión del documento de tesis

Al Dr. Antonio Cárdenas por sus aportes y revisión del documento de tesis.

Dedicatoria

A mis padres, con todo el amor de mi vida.

Sra. Flora Estela Reyes García

Sr. Rufino Erasto Pacheco Zaragoza

Índice

Índice	8
Índice de figuras	10
Índice de tablas	11
Significado de abreviaturas	11
Resumen	13
1. Introducción	15
2. Antecedentes	17
2.1. Importancia económica del guayule	17
2.2. Sitios de producción de hule en la planta	19
2.3. Proteínas involucradas en la producción de hule	20
2.4. Efecto de las bajas temperaturas en la producción de hule	22
2.5. Extracción y cuantificación de resina y hule del guayule	23
2.6. Técnicas de análisis de proteómica	25
2.6.1. Espectrometría de masas	26
3. Hipótesis	28
4. Objetivo general	29
3.1. Objetivos específicos	29
5. Metodología	30
5.1. Colecta del material vegetal	30
5.2. Preparación de muestras para la extracción de resina y hule	31
5.3. Extracción de hule y resina	31
5.3.1. Preparación de la celda de extracción	32
5.3.2. Condiciones de extracción programadas en el equipo de extracción	32
5.4. Concentración, secado y pesado del material extraído	33
5.5. Análisis proteómicos	33
5.6. Extracción de proteínas	34
5.7. Cuantificación de proteínas	35
5.8. Electroforesis de una dimensión	36
5.9. Preparación de muestras para el análisis por espectrometría de masas	36
5.9.1. Reducción y alquilación	36
5.9.2. Digestión	37

5.9.3.	Marcaje isobárico de las muestras con etiqueta de masas en tándem	37
5.9.4.	Fraccionamiento de la mezcla peptídica usando intercambio iónico fuerte (SCX)	38
5.9.5.	Desalación de muestras fraccionadas	38
5.9.5.1.	Mediante extracción en fase sólida C18 (SPE)	38
5.9.5.2.	Mediante fase reversa en columnas ZipTip® C18	39
5.10.	Análisis de muestras por nano LC-MS/MS	39
5.11.	Integración de datos proteómicos	40
6.	Resultados obtenidos y discusión	41
6.2.	Colecta de material vegetal	41
6.3.	Estandarización del método de extracción y cantidad de muestra	43
6.4.	Extracción de resina	45
6.4.1.	Extracción de resina en verano	46
6.4.2.	Extracción de resina en invierno	47
6.5.	Extracción de hule	49
6.5.1.	Extracción de hule en verano	49
6.5.2.	Extracción de hule en invierno	51
6.6.	Análisis proteómicos	55
6.7.	Cuantificación y verificación de la calidad de proteínas	55
6.7.1.	Número de proteínas presentes en Durango y San Luis Potosí	57
6.7.2.	Índice de abundancia de proteínas diferenciales	60
6.7.3.	Clasificación funcional de proteínas diferenciales presentes en Durango y San Luis Potosí	61
6.7.4.	Análisis del perfil proteómico de proteínas expresadas diferencialmente mediante un diagrama de Venn	63
6.7.5.	Clasificación funcional de proteínas comunes diferenciales presentes en Durango y San Luis Potosí	64
6.7.6.	Reconstrucción de la ruta de biosíntesis del hule de guayule	66
6.6.7.	Complejo de la partícula de hule	70
7.	Conclusiones	77
8.	Bibliografía	78

Índice de figuras

Figura 1. Micrografía electrónica de partículas de hule en células jóvenes epiteliales, los triángulos blancos indican un núcleo putativo. Barras: 20 μm (Kirajura, et al., 2017).....	20
Figura 2. Partículas de hule de <i>Parthenium argentatum</i> . Microscopía electrónica de barrido convencional (SEM) a 10 kV. (Wood y Cornish, 2000).....	21
Figura 3. Identificación de los 12 sitios de colecta en el estado de Durango.	42
Figura 4. Identificación de los 11 sitios de colecta en el estado de San Luis Potosí.	42
Figura 5. Porcentajes obtenidos en extracción de resina de cada sitio de colecta del estado de Durango en verano. Medias con letras diferentes son estadísticamente significativas ($P < 0.05$).	46
Figura 6. Porcentajes obtenidos en extracción de resina de cada sitio de colecta del estado de San Luis Potosí en verano. Medias con letras diferentes son estadísticamente significativas ($P < 0.05$).	47
Figura 7. Porcentajes obtenidos en extracción de resina de cada sitio de colecta del estado de Durango en invierno. Medias con letras diferentes son estadísticamente significativas ($P < 0.05$).	48
Figura 8. Porcentajes obtenidos en extracción de resina de cada sitio de colecta del estado de San Luis Potosí en invierno. Medias con letras diferentes son estadísticamente significativas ($P < 0.05$).	49
Figura 9. Porcentajes obtenidos en extracción de hule de cada sitio de colecta del estado de Durango en verano. Medias con letras diferentes son estadísticamente significativas ($P < 0.05$).	50
Figura 10. Porcentajes obtenidos en extracción de hule de cada sitio de colecta del estado de San Luis Potosí en verano. Medias con letras diferentes son estadísticamente significativas ($P < 0.05$).	50
Figura 11. Porcentajes obtenidos en extracción de hule de cada sitio de colecta del estado de Durango en invierno. Medias con letras diferentes son estadísticamente significativas ($P < 0.05$).	51
Figura 12. Porcentajes obtenidos en extracción de hule de cada sitio de colecta del estado de San Luis Potosí en invierno. Medias con letras diferentes son estadísticamente significativas ($P < 0.05$).	52
Figura 13. Electroforesis de una dimensión de las muestras de tallos de guayule. Patrón de proteínas totales de guayule. Gel SDS-PAGE Any KD Bio-Rad, teñido con SYPRO™ Ruby. Carril 1 pertenece al marcador de peso molecular, carriles del 2 a 4 y de 5 a 7 muestras de las tres muestras de S6 en verano e invierno, respectivamente. Carriles del 8 a 9 y de 11 a 13 muestras de las tres muestras de D6 en verano e invierno, respectivamente.	57
Figura 14. Proteínas expresadas diferencialmente en invierno respecto a verano en los sitios de colecta en los estados de Durango y San Luis Potosí.	59
Figura 15. Índice de abundancia de proteínas diferenciales en San Luis Potosí y Durango, en dos estaciones del año (verano e invierno).	61
Figura 16. Procesos biológicos presentes en Durango y San Luis Potosí.....	62
Figura 17. Número total de proteínas diferenciales presentes en Durango y San Luis Potosí. Identificación de proteínas únicas y comunes entre estados de acuerdo al perfil proteómico, mediante el programa BioVenn.....	64

Figura 18. Procesos biológicos comunes presentes en Durango y San Luis Potosí.	65
Figura 19. Identificación de proteínas con expresión diferencial en las rutas de biosíntesis del IPP.....	69
Figura 20. Simulación del complejo de la partícula de hule.	70
Figura 21. Índices de abundancias de proteínas PED. A) PED dentro de las rutas de biosíntesis del IPP, B) PED dentro del complejo de la partícula de hule.....	71

Índice de tablas

Tabla 1. Comparación de porcentajes de hule y resina obtenidos en relación a la cantidad de muestra procesada.....	45
Tabla 2. Contenido de proteínas en µg totales en los sitios de colectas con tres repeticiones biológicas en los estados de San Luis Potosí y Durango.....	56
Tabla 3. Número de proteínas identificadas en los sitios de colecta en los estados de Durango y San Luis potosí.....	58
Tabla 4. Descripción de proteínas identificadas en la biosíntesis del IPP.....	75
Tabla 5. Descripción de proteínas identificadas en el complejo de la partícula de hule. ...	76

Significado de abreviaturas

AACT: acetil CoA tiolasa

AOS: oxido aleno sintasa

ASE: extracción acelerada con solventes

ACN: acetonitrilo

BCA: ácido bicinconínico

CPT: cis-preniltransferasa

DTT: ditriotritol

HDS: 4-hidroxi-3-metilbutyl-2-1-difosfato sintasa

HMGR: 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa

HMGS: 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A sintasa

Itraq: etiquetas isobáricas para la cuantificación relativa y absoluta

LC: cromatografía líquida

MEP: 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato

MS: espectrometría de masas
msnm: metros sobre el nivel del mar
MVA: ácido mevalónico
MVK: mevalonato kinasa
NCBI: centro nacional para la información biotecnológica
PBS: solución salina tamponada con fosfato
PMSF: fenilmetilsulfonil fluoruro
PMVK: fosfomevalonato kinasa
RT: transferasa de hule
REF: factor de elongación del hule
rpm: revoluciones por minuto
S1-S11: sitios de colecta en el estado de San Luis Potosí (1-11)
D1-D12: sitios de colecta del estado de Durango (1-12)
SDS: dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SN: sobrenadante
SRPP: proteínas de partículas pequeñas de hule
TEAB: bromuro de tetraetilamonio
TCEP: tris (2-carboxietil) fosfina
TFA: ácido trifluoroacético
TMT: etiqueta de masas en tandem
SCX: intercambio iónico fuerte
xg: tiempos de gravedad

Resumen

El guayule (*Parthenium argentatum*) es un arbusto perenne nativo del desierto Chihuahuense y del suroeste de Texas, el cual es una fuente de hule natural hipoalergénico de alta calidad. En este estudio se realizó un muestreo de material vegetal silvestre de la planta de guayule en varios sitios de los estados de Durango y San Luis Potosí en la época de verano (2016) e invierno (2017). Los sitios de colecta se eligieron considerando diferentes características edafoclimáticas, coordenadas geográficas, asociación de plantas endémicas, características fisiológicas y de exposición. En total se analizaron 138 muestras de 23 sitios diferentes con el objetivo de: (1) identificar plantas de guayule con mayor y menor contenido de hule usando el método de extracción acelerada (ASE) y (2) realizar un estudio proteómico con las plantas identificadas de alta y baja concentración de hule, usando espectrometría de masas.

Para poder realizar el primer objetivo, se estandarizaron las condiciones de la extracción de hule y resina. Como resultado, se observó que, en las muestras de verano, de los dos estados, el contenido de hule es mayor que en las de invierno. Así como en general las muestras tomadas en los sitios de Durango tuvieron mayor contenido de hule que las de San Luis potosí.

El segundo objetivo de esta tesis fue el análisis del proteoma del guayule. Se identificaron 10,681 proteínas de las cuales 461 son expresadas diferencialmente, 270 para el estado de San Luis Potosí y 191 para el estado de Durango. En general existe un mayor número de proteínas sobre-expresadas en invierno en comparación al verano. De las proteínas implicadas en la ruta de biosíntesis del hule, se

identificaron 5 proteínas de las dos rutas MVA y MEV, 4 de ellas sobre-expresadas en invierno y 3 proteínas relacionadas con la partícula de hule en guayule.

1. Introducción

El hule natural o caucho es una sustancia sintetizada en más de 2000 especies de plantas distribuidas por todo el reino vegetal. Se forma en células especializadas llamadas laticíferas o en células del parénquima, encontrándose principalmente en las hojas y en la corteza de los tallos. El hule es un polímero cis 1-4 poliisopreno el cual consiste en unidades de isopreno unidas entre sí, estas unidades pueden ser biosintetizadas por medio de dos vías; la ruta del ácido mevalónico (MVA) en el citoplasma o la ruta del 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) en el cloroplasto (Estilai y Waines, 1990; Sola y Águila, 2014; Venkatachalam *et al.*, 2004).

Entre las plantas productoras de hule natural, la especie de mayor importancia económica es *Hevea brasiliensis* cuya explotación comercial alcanza el 99% de la producción mundial (George y Jacob, 2000). Sin embargo, especies como el diente de león (*Taraxacum koksaghyz*) y el guayule (*Parthenium argentatum*) son fuentes alternativas de la producción de hule natural con alto potencial de alcanzar en un plazo medio su comercialización a escala industrial (van Beilen y Poirier, 2007).

En México el guayule se encuentra distribuido en 6 estados ubicados en el Desierto Chihuahuense, es un arbusto que produce un hule de alta calidad y cuya principal característica es su propiedad hipoalérgica (Cornish *et al.*, 2008; Wood y Cornish, 2000). Uno de los factores que estimulan la síntesis de hule en guayule es una interacción de temperaturas bajas durante la noche y altas temperaturas durante el día y está relacionada directamente con los mecanismos que inducen la expresión de genes que codifican la síntesis de enzimas del hule (Benedict *et al.*, 2008; Madhavan *et al.*, 1989).

De entre las diferentes proteínas que pueden estar asociadas con la biosíntesis de hule de guayule, se encuentran la óxido aleno sintasa (AOS), cis-preniltransferasa (CPT), y proteínas de partículas pequeñas de hule (SRPP por sus siglas en inglés Small Rubber Particle Protein) (Backhaus *et al.*, 1991; Cornish, 2001; Cornish y Backhaus, 2003; Kim *et al.*, 2004; Pan *et al.*, 1995). Sin embargo, aún no se conoce el rol exacto de dichas proteínas en la regulación de la ruta biosintética del hule. Por lo anterior, en este proyecto se plantea trabajar en la colecta de poblaciones naturales de plantas de guayule identificando la zona y época del año (invierno/verano) con los mayores y menores contenidos de hule, así posteriormente realizar el análisis además de la caracterización de proteínas identificadas.

2. Antecedentes

El guayule (*Parthenium argentatum*) es un arbusto productor de hule, nativo de las zonas áridas del centro-norte de México, esta planta se encuentra distribuida en el llamado desierto Chihuahuense en los estados de Coahuila, Chihuahua, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí y Nuevo León y en el suroeste de Estados Unidos en áreas adyacentes al Big Bend en Texas, por lo general a altitudes entre 600 y 2133 msnm (Benedict *et al.*, 2008; Hammond y Polhamus, 1965).

2.1. Importancia económica del guayule

El máximo auge que tuvo el hule de guayule fue durante la Segunda Guerra Mundial, en donde toda la investigación y producción de hule para neumáticos (principalmente) se concentró en esta planta. Sin embargo, el descubrimiento de la polimerización de algunos monómeros derivados del petróleo inició la producción industrial del hule sintético por lo que se desplazó el uso del hule natural en la industria (van Beilen y Poirier, 2007).

Durante la década de los 90's se estimaba que el material polimérico proveniente de guayule representaba una derrama económica de hasta 4 millones de dólares, por lo tanto estos productos seguían teniendo un mercado potencial a nivel mundial, principalmente en el sector salud y en la industria de la juguetería (de Rodríguez *et al.*, 1993).

Actualmente la situación económica, geopolítica, el cambio climático, además de la variación de los precios del petróleo han generado cierta incertidumbre sobre el escenario de la oferta, la demanda y la garantía del suministro de hule (natural y

sintético). Por ello, existe la búsqueda nuevamente de fuentes alternativas de producción de hule. En este escenario el hule proveniente de guayule por sus propiedades físico-químicas que incluyen elasticidad, resistencia a la abrasión y al impacto, eficiente dispersión del calor y maleabilidad a bajas temperaturas; las cuales no han podido ser reemplazadas por algún hule sintético producido a partir de petróleo, polímeros o mezclas naturales con ausencia de hule (Cornish, 2001) dichas propiedades lo han posicionado como un material alternativo atractivo para la fabricación de productos médicos diferenciales con mayor valor agregado debido a que su principal ventaja es que carece de alérgenos los cuales desencadenan alergias sistémicas Tipo I en humanos, además de la fabricación de productos de consumo general (Cornish *et al.*, 2008; Hamilton y Cornish, 2010; Siler y Cornish, 1994; Siler *et al.*, 1996). Sin embargo, a pesar de los esfuerzos para tener una mejor y mayor extracción de hule, únicamente el 5-10% de la biomasa seca total de la planta pertenece al hule, el resto de la biomasa se distribuye en material resinoso (10 %) y bagazo (80 %) (Sabaini *et al.* 2018; Wagner y Parma, 1989). A pesar de que se sabe que estos coproductos tienen un importante valor económico y que su uso puede mejorar el manejo sostenible del guayule se le ha dado muy poca importancia (Wagner y Parma, 1989). Por su parte, la resina de guayule se ha descrito como un material que podría ser utilizado en la industria papelera, química, cosmética o como un conservador en las maderas (principalmente) (Chow *et al.*, 2008; Nakayama, 2005). Mientras que al bagazo se le han atribuido características sobre ser un biocombustible potencial, acerca de esto, un estudio reciente realizado por Sabaini *et al.*, (2018) mediante la tecnología de pirolisis lograron formular un bioaceite de buena calidad.

2.2. Sitios de producción de hule en la planta

El hule sintetizado en la planta de guayule es un compuesto complejo que resulta de un proceso de polimerización con diferentes etapas de desarrollo, se cree que diferentes factores afectan la síntesis y calidad del hule, tales como la edad, la morfología de la planta, las estaciones del año y sus diferentes condiciones ambientales (Benedict *et al.*, 1950; Cantú *et al.*, 1997).

Archer *et al.*, (1963) mencionan que el contenido de hule está determinado por la cantidad de tejido del parénquima. Años más tarde Mehta, (1982) informó que las partículas de hule producidas en las plantas de guayule se almacenaban en diferentes tejidos como la corteza del parénquima (figura 1), haces vasculares (xilema y floema) y en las células epiteliales alrededor de los canales de resina.

Backhaus y Walsh, (1983) determinaron que las partículas de hule se van desarrollando conforme a la edad de la planta, ya que al estudiar plantas de 2.5 meses de edad las partículas aparecen primero en el citosol parietal y más tarde en la vacuola central en plantas de 3 años de edad. Esto debido a que con la acumulación de las partículas de hule en el citosol parietal se inicia una presión hacia la vacuola a través del tonoplasto. Sin embargo, el desarrollo de la tecnología permitió realizar nuevos estudios, en los cuales se relacionó el secuestro de partículas de hule en la vacuola central de *P. argentatum* con cuerpos proteicos derivados del retículo endoplásmico los cuales se encuentran en la vacuola de las células de almacenamiento. Tras el secuestro en la vacuola, la membrana se digiere dejando las partículas de hule desnudas por lo que se forman auto-agregados en masas de hule más grandes (Chrispeels y Herman, 2000; Herman y Schmidt, 2004).

Recientemente Kajiura *et al.*, (2017) mediante análisis histoquímicos utilizando fluorescencia lipofílica y microscopía de escaneo laser cofocal espectral, sugieren que las células epiteliales del parénquima acumulan grandes cantidades de hule (figura 1), lo que podría indicar que estas células epiteliales son bifuncionales al biosintetizar pero al mismo tiempo almacenar partículas de hule.

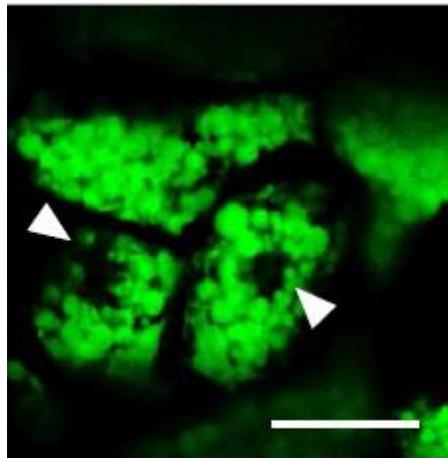


Figura 1. Micrografía electrónica de partículas de hule en células jóvenes epiteliales, los triángulos blancos indican un núcleo putativo. Barras: 20 μm (Kirajura, et al., 2017)

2.3. Proteínas involucradas en la producción de hule

Existen alrededor de 2,000 especies de plantas productoras de hule, todas éstas especies tienen en común a la enzima transferasa de hule (RT) [EC2.5.1.20] causante de la polimerización cis-1,4 de monómeros de isopreno derivados de isopentenil difosfato (IPP) (Archer *et al.*, 1963; Backhaus *et al.*, 1991; Cornish, 1993). Esta se localiza en las membranas de las partículas de hule, sin embargo, solo algunas de estas plantas producen hule de alto peso molecular debido a que

no todas comparten las mismas proteínas o enzimas en su metabolismo. El guayule es un arbusto del desierto productor de hule de alto peso molecular y dichas partículas (figura 2) se localizan dentro de las células epiteliales en el tejido del parénquima de los tallos (Backhaus *et al.*, 1991; Backhaus y Walsh, 1983; Kajiura *et al.*, 2017). Hasta la fecha se conoce muy poco acerca de las proteínas asociadas a las partículas de hule, así como de la regulación de la biosíntesis del hule.

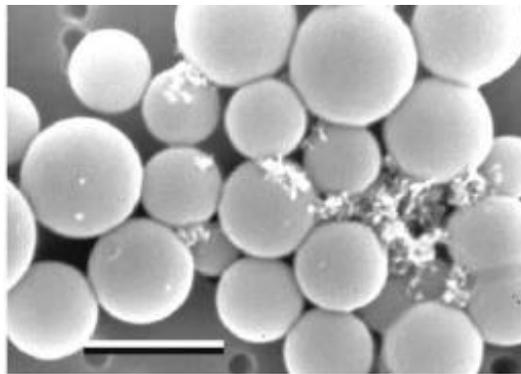


Figura 2. Partículas de hule de *Parthenium argentatum*. Microscopía electrónica de barrido convencional (SEM) a 10 kV. (Wood y Cornish, 2000).

Sin embargo, se han realizado estudios en los cuales se han encontrado algunas proteínas asociadas a la partícula de hule específicamente en guayule, entre ellas se encuentra la AOS que fue descrita en 1995 (Pan *et al.*, 1995), esta proteína es la más abundante en la partícula de hule y está altamente asociada con las respuestas al estrés de la planta (Kajiura *et al.*, 2017) . En 2004 fue identificada una proteína homóloga a la SRRP, la cual fue nombrada como GHS (Homólogo de Guayule SRPP) en *H. brasiliensis*, se sabe que dicha proteína desempeña un papel positivo en la incorporación del isopentenil difosfato en hule de alto peso molecular

como lo hace SRPP, de igual manera la GHS tiene una alta similitud con la proteína factor de elongación de hule (REF) también identificada en *H. Brasiliensis*, con la diferencia que la GHS no desencadena problemas de alergias como lo hace la REF (Kim *et al.*, 2004).

2.4. Efecto de las bajas temperaturas en la producción de hule

Para la inducción de la biosíntesis de hule es necesaria una interacción de temperaturas nocturnas y diurnas, la temperatura nocturna se encuentra entre los 10 °C y -4 °C (Angulo-Sánchez *et al.*, 2002; Macrae *et al.*, 1986; Veatch-Blohm *et al.*, 2006) y es requerida para aumentar la expresión de genes que codifican para enzimas implicadas en la síntesis del hule, mientras que la diurna entre los 20 °C y 35 °C (Macrae *et al.*, 1986) es indispensable para realizar procesos fisiológicos como la fotosíntesis, necesaria para la supervivencia de la planta. Lo anterior coincide con estudios que demuestran que la máxima producción de hule se alcanza en las épocas de otoño e invierno (Benedict *et al.*, 2008; Bonner, 1975; Healey y Mehta, 1986; Veatch-Blohm *et al.*, 2007). De acuerdo a esto, las bajas temperaturas son un precursor abiótico imprescindible para la estimulación de la actividad de las enzimas que actúan en la biosíntesis de hule como la transferasa de hule, la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa (HMGR) y la actividad de formación de partículas de hule citosólico en el parénquima cortical de las plantas de guayule (Benedict *et al.*, 2009; Benedict *et al.*, 1986; Ji *et al.*, 1993).

Pese a todo lo anterior, la estructura precisa y el proceso de biosíntesis del hule natural no se han aclarado completamente, algunos genes por ejemplo aquellos relacionados a la enzima de transferasa de hule siguen desconocidos debido a que

se trata de una enzima ligada a la membrana aunado a que su abundancia es relativamente baja (Cornish, 1993 y 2001). Por lo tanto, un conocimiento profundo del mecanismo natural de la síntesis de hule además de todas las herramientas involucradas en este proceso, incluyendo promotores, genes y proteínas, son necesarios, debido a que permitirán mejorar la producción de hule, sobreexpresando genes implicados en este mecanismo.

2.5. Extracción y cuantificación de resina y hule del guayule

La extracción y cuantificación de resina/hule es necesaria para evaluar el rendimiento de producción de las plantas, lo cual es indicativo de la cantidad y calidad del hule producido en las células del parénquima de los tallos del guayule. Diferentes técnicas de extracción y cuantificación de estos productos se han desarrollado a lo largo de la historia, debido a que una comercialización exitosa del hule se debe principalmente a una buena técnica de extracción (Pearson *et al.*, 2013; Siler *et al.*, 1996). Desde la década de los 40's se iniciaron los primeros trabajos de extracción de hule proveniente de guayule, sin embargo, la mayoría de estos protocolos requieren de una gran cantidad de muestra y disolventes. Benedict *et al.*, (1950) lograron extraer el 7 % de hule de los tallos, sin embargo, su técnica implica el uso de gran cantidad de material vegetal, así como el uso de tres solventes orgánicos (etanol, acetona y benceno) para la deshidratación y eliminación de resinas necesaria para la extracción de hule respectivamente, adicional a esto los tiempos de extracción llegaban a ser de hasta 7 días.

Schloman *et al.*, (1988) mediante la técnica de Soxhlet con el uso de solventes de acetona y hexano (para resina y hule respectivamente) lograron extraer 10.1 % de

resina y 6.8 % de hule. Estos autores mencionan que una molienda previa a la extracción hace que se rompan las células del tejido vegetal, lo cual permite una extracción más rápida y eficaz. de Rodriguez *et al.*, (1993) con la misma técnica de extracción, pero con el uso de solventes acetona/tolueno alcanzaron porcentajes de extracción en resina de 6.8 % y en hule de 9.5 %. Mientras que Cantú *et al.*, (1997), obtuvieron 13.7 % de resina y 12 % de hule. Por otro lado, Kuruvadi *et al.*, (1997) lograron extraer 9.8 % de hule y 9.6 % de resina. Cornish *et al.*, (1999) reportaron únicamente el contenido de resina de plantas cultivadas en Arizona, EUA alcanzando un porcentaje de 7.8.

En los últimos años, se han desarrollado nuevas técnicas de extracción con instrumentos analíticos como la extracción acelerada con solventes (ASE por sus siglas en inglés) también llamada extracción líquida presurizada, estas herramientas proporcionan un medio para automatizar una extracción secuencial rápida asimismo eficiente de resina y hule de guayule (Salvucci *et al.*, 2009; Thurbide y Hughes, 2000). Las dos principales ventajas del método ASE son: 1) la reducción del consumo de solventes orgánicos, por la poca cantidad de solvente necesario para cada ciclo de extracción y 2) eficiencia del factor tiempo, ya que mediante el uso de una alta presión y en combinación con una alta temperatura hace que el proceso sea más rápido (Thurbide y Hughes, 2000).

Mediante el uso de ASE, Salvucci *et al.*, (2009) reportan porcentajes de 8.3 % en resina y 7.7 % en hule, mientras que para el año 2013 hubieron reportes de extracción de resina 10.56 % y hule 9.05 %, (Suchat *et al.*, 2013). Estos autores mencionan que esta tecnología proporciona menores costes de mano de obra que

los equipos y procedimientos que históricamente se han utilizado para la cuantificación de hule y resina.

2.6. Técnicas de análisis de proteómica

El análisis del proteoma se está convirtiendo en una herramienta poderosa en la caracterización funcional de plantas. Adicionalmente, el progreso realizado en la secuenciación de genomas completos y el rápido aumento en la disponibilidad de etiquetas de secuencias expresadas (EST) han abierto nuevas perspectivas para analizar los sistemas biológicos y sus complejas funciones en diferentes niveles. Paralelamente a la acumulación de grandes cantidades de datos de ácidos nucleicos, los desarrollos tecnológicos han permitido el establecimiento de sistemas para el análisis multiparalelo de transcriptomas, así como de los niveles de proteína (Canovas *et al.*, 2004). Dichas técnicas son el puente que vincula la expresión génica y los procesos metabólicos, esto provee una herramienta decisiva para proporcionar mayor conocimiento sobre los mecanismos moleculares subyacentes a las respuestas metabólicas de plantas respecto a algún tipo de estrés (Ow *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011).

Varios estudios ya han demostrado que los cambios en la expresión génica a nivel de transcripción a menudo no se corresponden con los cambios a nivel de proteína. Por lo tanto, la investigación de los cambios en el proteoma de las plantas es muy importante ya que las proteínas, a diferencia de los transcritos, representan la maquinaria bioquímica y los procesos funcionales de cómo un organismo responde a un entorno cambiante (Kosová *et al.*, 2011). Sin embargo, la proteómica tradicional basada en geles está sesgada hacia proteínas hidrófilas con mayores abundancias,

en sus propiedades de masa molecular relativa (Mr) y su punto isoeléctrico (PI), haciendo esta técnica insuficiente para una mayor cobertura y una cuantificación más precisa en estudios proteómicos (Shi *et al.*, 2017).

2.6.1. Espectrometría de masas

En los últimos años, se han aplicado nuevas técnicas proteómicas basadas en espectrometría de masas (MS), gracias a esto ha sido posible un análisis exhaustivo y cuantitativo de proteomas en organismos completos, sin embargo, para mejorar esta técnica se han desarrollado nuevas tecnologías las cuales incluyen la determinación de concentraciones absolutas de proteínas, tales como las etiquetas de afinidad codificadas por isótopos (ICAT) o las técnicas basadas en etiquetas isobáricas como iTRAQ (etiquetas isobáricas para la cuantificación relativa y absoluta) o TMT (etiquetas de masas en tándem). Esta combinación tecnológica ya ha demostrado que puede aumentar la velocidad analítica en un grado compatible con el proteoma de alto rendimiento (Hausser *et al.*, 2013; Huttlin *et al.*, 2010; Megger *et al.*, 2014). Estas últimas dos técnicas, se han convertido en las más populares debido a sus múltiples capacidades. Donde iTRAQ permite analizar hasta ocho muestras, mientras que TMT se puede usar para analizar simultáneamente hasta diez muestras; iTRAQ y TMT en combinación con MS/MS es la tecnología proteómica actualizada, que proporciona una cuantificación más precisa de las proteínas expresadas diferencialmente, especialmente las proteínas de baja expresión (Ge *et al.*, 2013; Lan *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012).

Por lo tanto, en este trabajo, empleamos TMT y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) para comprender mejor los

mecanismos relacionados con la biosíntesis de hule de guayule en poblaciones silvestres.

3. Hipótesis

El análisis del proteoma de la corteza del tallo de plantas silvestres de guayule identificadas con mayor y menor concentración de hule, ayudará a identificar proteínas expresadas diferencialmente en el complejo de la partícula de hule, lo cual aportará información importante sobre el entendimiento de la ruta de biosíntesis de hule.

4. Objetivo general

Analizar el perfil proteómico de plantas silvestres de *Parthenium argentatum* con la finalidad de profundizar en el conocimiento de la ruta de biosíntesis de hule.

3.1. Objetivos específicos

- Identificar y seleccionar plantas silvestres de guayule con la mayor y menor cantidad de hule de las colectas realizadas en diferentes zonas y épocas del año, que serán utilizados para los análisis proteómicos.
- Crear una base de datos con las proteínas identificadas con una expresión diferencial, extraídas de tejidos de corteza del tallo de plantas silvestres de guayule con mayor y menor contenido de hule.

5. Metodología

5.1. Colecta del material vegetal

Para la extracción de hule y resina, se colectaron segmentos de tallos de guayule frescos de 7 cm de largo y 10 a 15 mm de diámetro los cuales fueron posteriormente secados en una estufa (Blue M Electric Co Stabil-Therm 04500C-2, EUA) durante 48 horas para su posterior molienda y extracción. Al mismo tiempo y de las mismas plantas se colectaron otros tallos con las mismas características los cuales se descortezaron y se congelaron al momento con nitrógeno líquido, estos fueron almacenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su procesamiento para realizar los análisis de proteínas.

Las colectas de material vegetal silvestre se realizaron en los estados de Durango (en la región de Mapimí) y San Luis Potosí (en la región de Vanegas). Estados que en los años 1980's fueron identificadas como unas de las de mayor y menor contenido de hule respectivamente (de Rodríguez *et al.*, 2006b). Además se realizaron dos colectas, una en la temporada de invierno (febrero, 2017) que es cuando se tiene registrado se acumula el mayor contenido de hule y otra en verano (septiembre, 2016) que es la temporada en la que se tiene reportada la menor acumulación de contenido de hule (Angulo-Sánchez *et al.*, 2002). La colecta en diferentes localidades y épocas del año, permitirá asegurar la identificación de al menos un sitio con material vegetal de alto contenido de hule y otro con bajo, esto para poder apreciar una expresión diferencial de proteínas presumiblemente involucradas en la biosíntesis de hule.

En cada estado, los sitios de colecta de material vegetal se eligieron considerando diferentes características edafoclimáticas, las coordenadas geográficas, asociación de plantas endémicas, características fisiológicas y de exposición. De cada sitio identificado se tomaron 6 muestras de tallo (3 para extracción de hule/resina y tres para análisis proteómicos) correspondientes a tres plantas diferentes las cuales pertenecían a un mismo rodal (manchón de plantas en su habitat silvestre), asegurando que las plantas muestreadas tuvieran más o menos las mismas características fenotípicas de altura (de 60 a 70 cm) y diámetro de copa de la planta entre 50 a 60 cm.

5.2. Preparación de muestras para la extracción de resina y hule

Una vez secos los tallos se realizó la molienda de estos, usando un molino de centrifugación (Retsch® ZM/100, Alemania), a 1400 rpm durante 10 segundos. Una vez terminada las moliendas, las muestras se secaron nuevamente en una estufa a una temperatura de 45 °C por 24 horas para mantener un umbral de humedad de la muestra entre 4 y 9 %. La medición del porcentaje de humedad se realizó mediante el detector de humedad (AnD, MF-50, Japón).

5.3. Extracción de hule y resina

Esta metodología se llevó a cabo con un equipo de extracción automatizado (Buchi, Speed Extractor E-916, Suiza), en el cual las muestras se exponen a una presión y temperatura elevadas y pueden realizarse hasta 6 extracciones en paralelo. De forma general, las muestras se colocan en celdas de extracción de 40 ml que son controladas individualmente, por lo tanto, los efectos de contaminación cruzada se

eliminan por completo, a cada celda se les inyecta el solvente por medio de una bomba. Cada ciclo de extracción consta de tres pasos: 1) calentar, que es el aumento de temperatura paso a paso para alcanzar la presión establecida; 2) mantener, una vez alcanzadas temperatura y presión deseadas, estas se mantienen por un tiempo determinado para finalmente 3) descargar, el extracto se descarga en viales de recolección de 240 ml.

Después de moler y secar las muestras colectadas se procedió a realizar la extracción de resina y hule siguiendo el protocolo reportado por Pearson *et al.*, (2013) con algunas modificaciones de acuerdo a las condiciones que exige el equipo de extracción automatizado utilizado en el Centro de Investigación en Química Aplicada (CIQA) quedando de la siguiente manera:

5.3.1. Preparación de la celda de extracción

Cada celda de extracción fue llenada con un filtro de celulosa, seguido de una capa de 5 g de arena de cuarzo, nuevamente se colocó un filtro de celulosa, enseguida una mezcla de 0.5 g de muestra molida y seca con 2.5 g de arena, sobre esta mezcla se colocó una capa de 5 g de arena de cuarzo para finalizar con un filtro de celulosa.

5.3.2. Condiciones de extracción programadas en el equipo de extracción

Las celdas se llevaron al extractor en el cual se manejaron las siguientes condiciones: se realizó una primera etapa de extracción específica para la extracción de resina en la cual se usó la acetona como solvente y consistió en 3 ciclos a una temperatura de 40 °C/ 100 bares de presión y 5, 10 y 15 min de retención cada uno. Posteriormente, una vez extraída la resina, a la misma muestra

se le realizó la segunda etapa de extracción para el hule usando hexano como solvente que también consistió en 3 ciclos seguidos a una temperatura de 60 °C/ 100 bares de presión y 5, 10 y 15 min de retención cada uno.

5.4. Concentración, secado y pesado del material extraído

Cada extracto obtenido, fue colectado en viales de 240 ml previamente etiquetados para su posterior concentración usando un equipo de evaporación múltiple con parámetros controlables (Buchi, Multivapor™ P-6, Suiza). Los parámetros para evaporación del extracto con acetona fueron: vacío (536 bares), temperatura (40 °C), agitación (100-180 rpm) y para el extracto con hexano: vacío (400 bares), temperatura (40 °C), agitación (100-180 rpm), hasta obtener 10 ml de concentrado de cada muestra. Posteriormente se pesaron y etiquetaron en viales de 50 ml para verter el material obtenido de cada muestra. En seguida los viales se llevaron a evaporación total bajo una campana de extracción y finalmente fueron sometidos al proceso de liofilización (Labconco® Free Dry System/freezone 4.5, EUA), durante 24 horas, para eliminar completamente la humedad que contenían las muestras. Finalmente, fueron llevados a la balanza analítica para ser pesados nuevamente y por diferencia de pesos y en relación a la cantidad de muestra inicial poder calcular los porcentajes de resina y hule.

5.5. Análisis proteómicos

Para los análisis de proteómica comparativa se seleccionaron 12 muestras de corteza almacenadas a -80 °C correspondientes a 4 sitios diferentes (con sus

repeticiones por muestra) los cuales después de analizar los resultados de extracción de hule, fueron los que presentaron resultados más contrastantes en cuanto al mayor y menor porcentaje de hule.

5.6. Extracción de proteínas

Se maceró 1 g de tejido de cada muestra agregando PVPP (Polivinilpirrolidona, 1 g: 10 g de peso fresco de muestra) con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. El macerado fue resuspendió y homogeneizó con el amortiguador de extracción que contenía la siguiente mezcla de reactivos: trizma® base (150 mM) pH 7.0 + sacarosa (1.4 mM) + KCl (100 mM) + tritón (0.3 %) + β-mercaptoetanol (Bio-Rad, EUA) (4.5 µl: 9 ml de buffer) + 20 µl/g de tejido vegetal de un coctel de inhibidor de proteasas + una mezcla de inhibidores de fosfatasas + 500 µl de PMSF (Fluoruro de fenilmetanosulfonilo. La mezcla se agitó con la ayuda de un vortex y en seguida se agregó fenol (1:1), se dejó incubando en hielo con oscuridad y agitación durante 30 minutos, las muestras se centrifugaron a 4 °C a 10,000 xg (tiempos de gravedad) por 30 min y se recuperó el sobre nadante (SN), para la precipitación se agregó acetona fría + 0.07 % de β-mercaptoetanol en un volumen de 1:4, se dejó incubar a -20 °C por 24 h, pasado este tiempo nuevamente se centrifugaron las muestras a 4 °C a 10,000 xg por 30 minutos para formar una pastilla, la cual se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 500 µl de PBS (solución salina tamponada con fosfato) 1X + SDS 0.1 % hasta disolver complemente con la ayuda de un sonicador, finalmente se centrifugó a 4 °C a 3,000 xg por 30 minutos se recuperó el SN y se almacenó a -20 °C.

Nota: Todos los reactivos aquí descritos pertenecen a la marca Sigma-Aldrich®, EUA.

5.7. Cuantificación de proteínas

Las concentraciones proteicas de las diferentes muestras se determinaron mediante la técnica del ácido bicinconínico (BCA) (Pierce™ BCA Assay Kit, Thermo Scientific, EUA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se realizó en primer lugar una curva de calibración (0 a 9 µg/µl). La concentración de la muestra fue 1:6 (5 µl de muestra y 30 µl de agua) para un volumen total de reacción de 300 µl (reactivo A+ reactivo B, en proporción 50:1), se dejó incubando la placa a 37 °C durante 30 min en seguida se realizó la lectura de absorbancia a una longitud de onda de 562 nm en el lector de placas epoch 2 (Bio Tek®, EUA) apoyado del software Gen5™ (Bio Tek®, EUA). Con los datos obtenidos se graficó la curva de calibración y se obtuvo la ecuación de la recta ($y=mx+b$), las lecturas de absorbancias de las muestras se interpolaron en la recta y los resultados finales muestran la concentración de proteínas (mg totales) de cada ejemplar analizado.

Se realizó una primera cuantificación para verificar que en los extractos de las muestras vegetales efectivamente se tuviera material proteico y saber qué cantidad de proteína se tenía en cada muestra. Una segunda cuantificación se realizó después del proceso de reducción y alquilación de las muestras, para corroborar las cantidades proteicas reales que se tenían en los extractos.

5.8. Electroforesis de una dimensión

La calidad y cantidad de proteínas fue confirmada por medio de electroforesis de una dimensión (1D SDS-PAGE), se utilizaron geles (pre-fabricados) mini-PROTEAN® TGX™ Any KD (Bio-Rad®, EUA). Se cargaron cada una de las muestras (5 µg/ µl de extracto + agua + colorante Leammli) y se corrieron utilizando un estándar de marcador de peso molecular (Bio-Rad®, EUA). La tinción se realizó con la técnica de SYPRO Ruby (Thermo Scientific®, EUA), finalmente el gel se observó en el equipo mager® Gel Doc™ XR System (modelo 1708195EDU, Bio-Rad®) apoyado del software Image Lab™.

5.9. Preparación de muestras para el análisis por espectrometría de masas

5.9.1. Reducción y alquilación

Se tomaron alícuotas de 300 µl de cada extracto de proteínas, se agregaron 10 mM de TCEP (tris (2-carboxietil) fosfina) (Sigma-Aldrich®, EUA) y se dejaron en incubación a 60 °C durante 45 min, pasado este tiempo, para la alquilación de las proteínas se adicionaron 30 mM de IAM (iodacetamida, Sigma-Aldrich®, EUA) se dejó incubar (a temperatura ambiente en oscuridad) por una hora, en seguida se agregaron 30 mM de DTT (ditriotritol, Sigma-Aldrich®, EUA) con un reposo de 10 min a temperatura ambiente, a continuación se adicionó 1 ml de acetona 100 % fría a cada muestra, y se dejó precipitar a -20 °C durante toda la noche. En seguida los tubos se centrifugaron a 10,000 xg a 4 °C por 15 min, la pastilla obtenida se llevó a sequedad total, luego se resuspendió en TEAB (bromuro de tetraetilamonio, Sigma-

Aldrich®, EUA) 50 mM + SDS 0.1 %. En esta etapa, se realizó una segunda cuantificación para corroborar el contenido de proteínas a utilizar en el proceso de digestión.

5.9.2. Digestión

Se tomaron 100 µg de las muestras reducidas y alquiladas, se aforaron a 100 µl con agua y se añadió la enzima tripsina (trypsin gold, Promega, EUA) en una relación 1:30 (enzima/proteína), se dejó en incubación por 16 h a 37 °C. Posteriormente se añadió más tripsina ahora en una proporción 1:60 y se dejó en incubación por 4 h más a 37 °C. Finalmente se adicionaron 20 µl de TFA (ácido trifluoroacético, Sigma-Aldrich®, EUA) para detener la reacción, después se llevó a evaporación total con la ayuda de un concentrador centriVap (LABCONCO®) y se almacenaron a -80 °C hasta su utilización para el marcaje isobárico.

5.9.3. Marcaje isobárico de las muestras con etiqueta de masas en tándem

El marcaje se realizó utilizando el kit TMT Sixplex™ Label Reagent Set (Thermo Scientific, EUA) se utilizaron seis marcajes diferentes de la siguiente manera: las muestras de verano se marcaron con TMT-126-127-128 y las muestras de invierno se marcaron con TMT-130-131-132. Se adicionaron 41 µl del etiquetado TMT correspondiente a cada una de las muestras antes digeridas, se dejó incubar la reacción durante 1 hora a temperatura ambiente y se agregaron 8 µl de hidroxilamina (Sigma-Aldrich®, EUA) al 5 % a cada muestra por 15 min. El siguiente paso fue combinar todas las muestras marcadas tanto de verano como de invierno, pero de un mismo sitio de colecta, en un solo tubo. Posteriormente el tubo con la

mezcla resultante se llevó a evaporación total con la ayuda del concentrador, finalmente se almacenó a -80 °C.

5.9.4. Fraccionamiento de la mezcla peptídica usando intercambio iónico fuerte (SCX)

Los péptidos provenientes del marcaje se reconstituyeron en 1 ml de amortiguador de equilibrio (5 Mm KH_2PO_4 / ACN (acetonitrilo, Sigma-Aldrich®) 25 % pH=3) el pH se ajustó con ácido fórmico. En seguida las fracciones se realizaron en columnas de intercambio iónico fuerte HyperSep SCX (Thermo Scientific, EUA) a estos cartuchos se les adicionó 2 ml de agua milli-Q, en seguida se hizo pasar 1 ml de amortiguador de elución (10 mM KH_2PO_4 / 500 mM KCl/ ACN (Sigma-Aldrich®, EUA) 25 % pH=3), nuevamente se pasaron 2 ml de agua milli-Q, seguido de 5 ml de amortiguador de equilibrio, finalmente se cargó la muestra al cartucho lentamente, en seguida comenzó el proceso de colecta de fracciones en total 4 diferentes la primera se colecto al adicionar 3 ml del amortiguador de equilibrio, después se realizaron 3 colectas más usando 1.5 ml del amortiguador de elución pero variando la concentración de cloruro de potasio (Sigma-Aldrich®, EUA) en 75, 250 y 500 mM respectivamente, las fracciones se colectaron en tubos eppendorf independientes y se llevaron a sequedad total nuevamente en el concentrador.

5.9.5. Desalación de muestras fraccionadas

5.9.5.1. Mediante extracción en fase sólida C18 (SPE)

Se reconstruyeron las muestras provenientes del SCX con 1 ml de 0.5 % de TFA (Sigma-Aldrich®, EUA) pH 3, ajustando el pH con ácido fórmico. La columna

HyperSep C18 (Thermo Scientific, EUA) se acondicionó pasando 3 ml de la solución de acondicionamiento (MeOH 90 %/TFA 0.1 %) y se equilibró con 2 ml de la solución de equilibrio/carga (0.1 % TFA), después se cargó el mililitro de la muestra pasando lentamente por el cartucho, a continuación, se adicionó nuevamente 1 ml de solución de equilibrio/carga. Las muestras se desalaron haciendo pasar 1 ml de la solución para desalar (MeOH 5 %/ TFA 0.1 %). La elución del contenido de los cartuchos se realizó pasando 1 ml de la solución de elución (ACN 50 %/ TFA 0.1 %), para después llevarla a sequedad total en el concentrador.

5.9.5.2. Mediante fase reversa en columnas ZipTip® C18

Finalmente, antes de inyectar las muestras en el Nano LC-MS/MS, estas fueron pasadas por las columnas ZipTip® C18 (MILIPORE, IRL). Primero, los péptidos previamente desalados se re-suspendieron en 20 µl de ACN (Sigma-Aldrich®, EUA) + 40 µl de agua grado masas y se concentraron durante 10 minutos en el CentriVap, después se adicionan 20 µl de la solución de equilibrio/carga. Las columnas ZipTip® C18 se hidrataron con 20 µl de ACN (Sigma-Aldrich®, EUA) y en seguida 20 µl de la solución de equilibrio/carga, después la muestra pasó 20 veces a través de la columna para asegurar la retención, está se desaló con la solución para desalar (2 veces/20 µl) finalmente, se agregaron 20 µl de la solución de elución y se colectó la muestra la cual llevó a sequedad total en el CentriVap.

5.10. Análisis de muestras por nano LC-MS/MS

Las muestras se analizaron mediante un sistema de cromatografía líquida (LC) Ultimate 3000 RSLC-nano (Dionex, EUA) acoplado a un espectro de masas Orbitrap

Fusion Tribrid™ (Thermo-Fisher Scientific, EUA) equipado con una fuente de iones nanos de “EASY Spray” (Thermo-Fisher Scientific, EUA). Cada muestra reconstituida en 5 µl de la solución 0.1% ácido fórmico se inyectó en una columna de trampa C18 de nanoviper (3 µm, 75 µm X 2 cm, Dionex) a 3 µl min⁻¹ de caudal, luego se separó en una columna EASY de pulverización C18 RSCL (2 µm, 75 µm x 25 cm), utilizando un gradiente de 100 min⁻¹ con un caudal de 300 nl min⁻¹ y usando ácido fórmico al 0,1 % como solvente A y ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo al 90 % como solvente B. El gradiente de elución fue el siguiente: solvente A durante 10 min, 7-20% de solvente B por 25 min, 20 % solvente B por 15 min, 20-25 % solvente B por 15 min, 25-95 % solvente B por 20 min y solvente A por 8 min. El espectrómetro de masas funcionó en modo de iones positivos, el nanospray utilizó un voltaje de 3,5 kV y la temperatura de la fuente fue de ionización se programó a 280 °C.

5.11. Integración de datos proteómicos

Los espectros obtenidos se procesaron con el programa de cómputo Proteome Discoverer 2.1.0.81 (ThermoFisher Scientific Inc.) acoplado a los algoritmos de búsqueda de MASCOT (Matrix Science) y SEQUEST HT. La búsqueda se dirigió con las siguientes bases de datos: Viridae plantae de UniProt y el transcriptoma de *Parthenium argentatum*. Los parámetros de búsqueda fueron los siguientes: especificidad proteolítica con tripsina, dos cortes perdidos permitidos, las modificaciones estáticas comprendieron carbamidometilación de cisteína (+57.021

Da). Además, las modificaciones dinámicas incluyeron oxidación de metionina (+15.995 Da) y deamidación en residuos de asparagina y glutamina (+0.984 Da).

6. Resultados obtenidos y discusión

6.2. Colecta de material vegetal

Finalmente se identificaron en Durango 12 sitios de colecta en la parte noreste (figura 3) (D1 a D12, los cuales serán mencionados así de aquí en adelante), abarcando las comunidades de Cuencamé, Santa Cruz de la Cuchilla, Rancho Espíritu Santo, 5 de Mayo, San Luis Cordero, Nazas, San Pedro del Gallo y Antón Martín y Gral. Simón Bolívar. En el estado de San Luis Potosí se identificaron un total de 11 puntos de colecta en la parte norte del estado de San Luis Potosí (figura 4) (S1 a S11 los cuales serán mencionados así de aquí en adelante). Abarcando las siguientes comunidades: Benito Juárez, Las Colonias, Ánimas, Salto de Huazo, Las Boquillas, Huertecillas y San Tiburcio. Las colectas realizadas en las épocas de verano e invierno constaron de 3 repeticiones biológicas (3 plantas diferentes) por cada sitio dando como resultado un total de 36 muestras para Durango y 33 para San Luis Potosí.

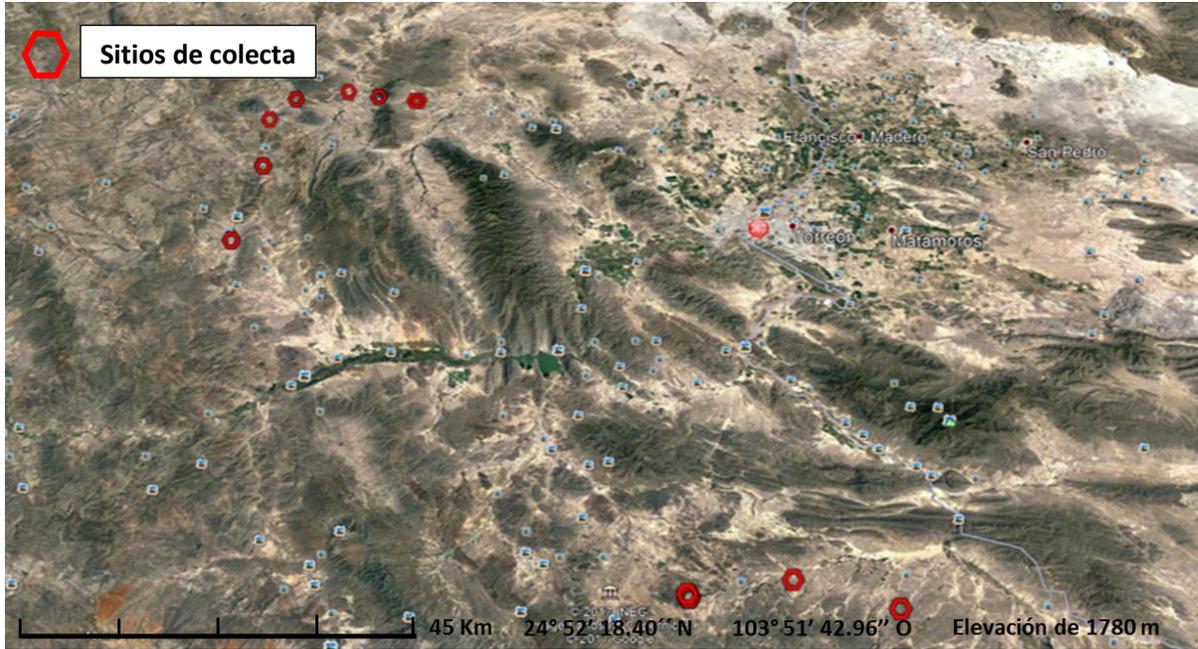


Figura 3. Identificación de los 12 sitios de colecta en el estado de Durango.

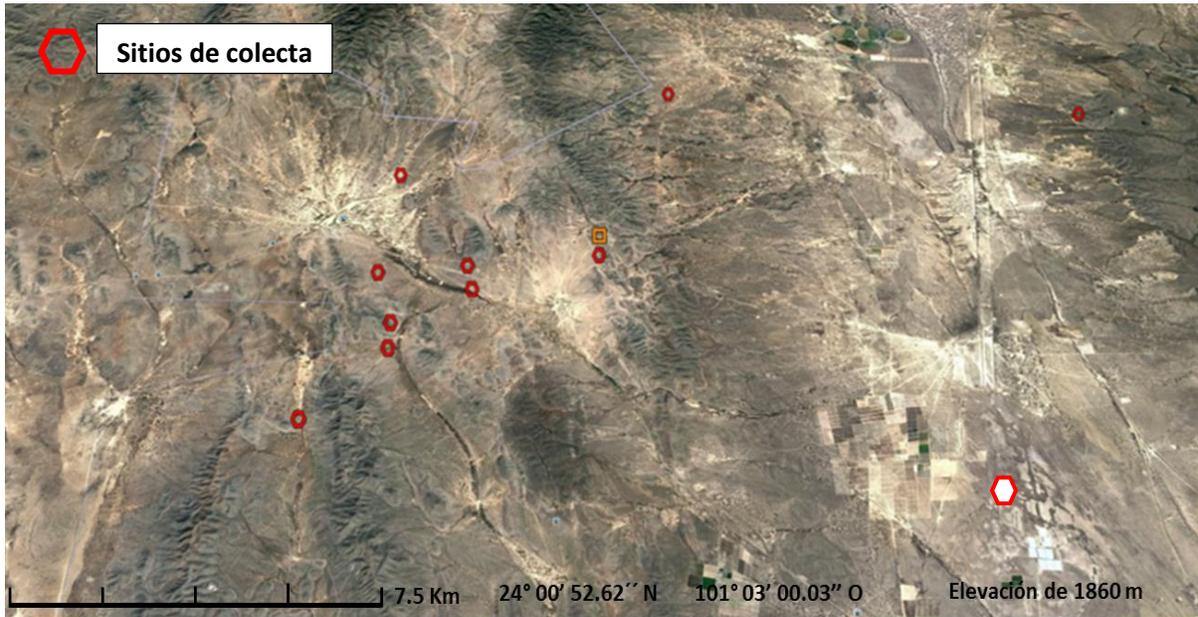


Figura 4. Identificación de los 11 sitios de colecta en el estado de San Luis Potosí.

6.3. Estandarización del método de extracción y cantidad de muestra

El proceso de extracción tanto de resina como de hule se basó en el procedimiento descrito por Pearson *et al.*, (2013). Sin embargo, se realizaron modificaciones en los tiempos de retención, presión y temperatura, adaptándose a los requerimientos del equipo y los puntos de ebullición de los solventes usados, dando como resultado dos rondas de extracción. La primera consistió en la extracción de resina de la muestra utilizando acetona como solvente, con 3 ciclos de 5, 10 y 15 min de retención a una temperatura de 40 °C a 100 bares de presión.

Esta temperatura fue propuesta por Pearson *et al.*, (2013) para evitar que la acetona alcance el punto de ebullición. Una acetona caliente (alrededor de 100 °C) permite mejorar extracción de resina sin embargo, provoca disolución y/o degradación de hule o hace que el hule sea irrecuperable en la extracción posterior (Salvucci *et al.*, 2009). Lo que se confirmó en el trabajo de Pearson *et al.*, (2013) quienes reportaron una pérdida de 26 % de la fracción de hule de alto peso molecular por el contacto directo del hule con la acetona caliente.

Seguido de la remoción de la fracción de resina, las muestras fueron sometidas a una segunda ronda de extracción específica para extraer el hule utilizando hexano como solvente, 3 ciclos de 5, 10 y 15 min de retención cada uno, a 60 °C /100 bares de presión. Cabe mencionar que Pearson *et al.*, (2013), utilizaron 140 °C para extracción de hule con ciclohexano, sin embargo bajo nuestras condiciones de trabajo no fue posible usar una temperatura por encima de los 60 °C sin que se tuvieran problemas de extracción. Revisando las condiciones recomendadas por el fabricante del equipo, mencionan que no es recomendable usar temperaturas de

extracción que vayan por encima de la temperatura de ebullición del solvente utilizado, en nuestro caso el hexano tiene una temperatura de ebullición de 68 °C, razón por la cual al bajar la temperatura de extracción a 60 °C no se presentaron problemas de taponamiento o elevada presión en el equipo por lo que se obtuvo un proceso de extracción fluido.

Otro factor a ajustar fue la cantidad de muestra a usar, principalmente por las limitaciones del material vegetal a analizar por lo que se realizaron varias pruebas con 0.5, 1 y 2.5 g del mismo tejido de corteza molido. Los valores obtenidos de hule y resina se muestran en la tabla 1. Como se puede observar, se presentó una correlación negativa entre la cantidad de muestra analizada y el rendimiento de hule y resina obtenido. Esto es fácil de explicar ya que las condiciones de extracción fueron fijas principalmente el número de ciclos de extracción y los tiempos de retención, lo cual nos indica que a mayor cantidad de muestra no se tiene mayor cantidad de hule y resina y por tanto se necesitarán más número de ciclos de extracción y/o mayores tiempos de retención. Basado en los resultados se eligió la cantidad de 0.5 g de muestra de corteza molida como punto de partida para todas las muestras a analizar, debido a que esta cantidad dio el mejor rendimiento de hule y resina.

Tabla 1. Comparación de porcentajes de hule y resina obtenidos en relación a la cantidad de muestra procesada

Cantidad de muestra (g)	Hule (%)	Resina (%)
0.5	7	17
1	6	15.6
2.5	5	14

También es importante resaltar que en este estudio, se decidió analizar solo los tallos ya que es la parte de la planta en donde se encuentra una mayor acumulación de dichos materiales, tal como lo demuestran (de Rodríguez *et al.*, 2006b), quienes mediante la metodología de Soxhlet utilizando tolueno para extraer hule obtuvieron un valor de 9.25 % en raíces, 10.2 % en el tallo principal y 8.9 % en las hojas. Según lo reportado por (Teetor *et al.*, 2009), el diámetro de los tallos también influye en la acumulación de hule, estos autores reportan que tallos mayores a 10 mm tienen un contenido de hule más alto indicando además que no hubo diferencias significativas entre las edades de la planta para el contenido de hule. Por lo tanto, en este estudio se decidió trabajar con los tallos de 10 a 15 mm de diámetro y 7 cm de largo para alcanzar valores más altos de concentración de hule y bloquear así las variaciones causadas por este factor.

6.4. Extracción de resina

A continuación, se presentan los resultados de la prueba de medias obtenidas de las extracciones de resina realizadas en la estación de verano e invierno, en los dos sitios de colecta (Durango y San Luis Potosí). Cada sitio constó de 3 repeticiones biológicas, de la cuales se obtuvieron las medias correspondientes. El análisis de

varianza se realizó mediante un diseño experimental completamente al azar y una prueba de medias Duncan ($P < 0.05$).

6.4.1. Extracción de resina en verano

La figura 5 muestra los valores (porcentajes) correspondientes de la extracción de resina para los doce sitios de colecta del estado de Durango, se puede observar que existe una diferencia significativa entre el sitio en donde se encontró una mayor acumulación de resina que fue el D7 con un 14.4 % de extracción y el sitio con una menor acumulación que fue el D2 con un 8.6 %. La figura 6 presenta los valores alcanzados para los once sitios de colecta del estado de San Luis Potosí, siendo el sitio con los mayores porcentajes el S3 con un valor de 14 % de extracción y la menor acumulación se dio en el S6 con un porcentaje de acumulación del 8.2 %. Como podemos observar en la misma época del año en dos sitios diferentes la acumulación de resina presenta los mismos patrones.

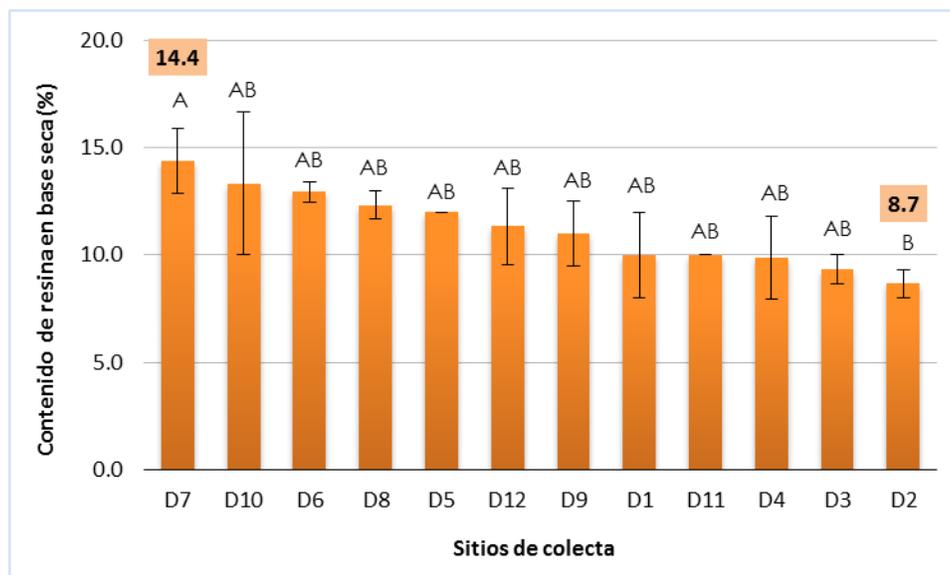


Figura 5. Porcentajes obtenidos en extracción de resina de cada sitio de colecta del estado de Durango en verano. Medias con letras diferentes son estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

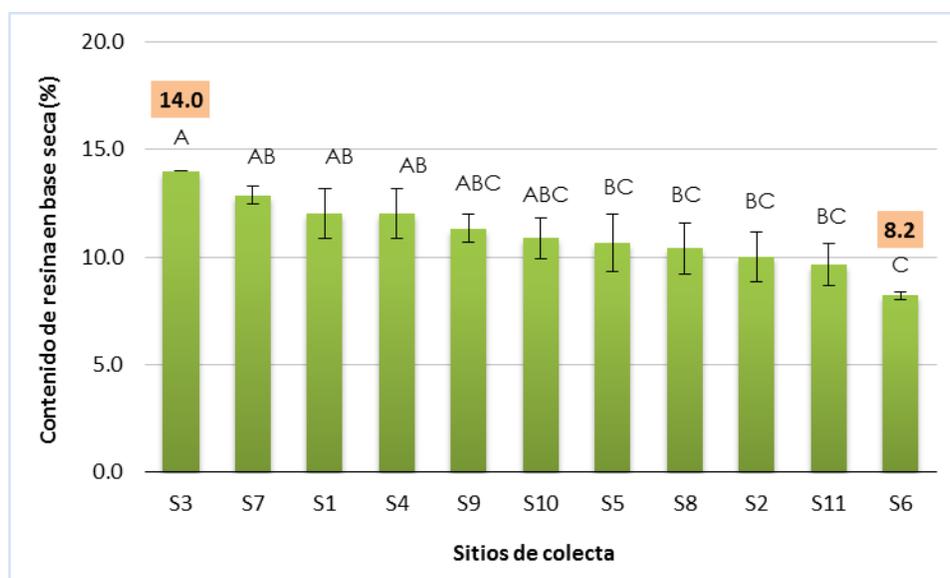


Figura 6. Porcentajes obtenidos en extracción de resina de cada sitio de colecta del estado de San Luis Potosí en verano. Medias con letras diferentes son estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

6.4.2. Extracción de resina en invierno

La figura 7 muestra los datos obtenidos del contenido de resina (porcentaje) del estado de Durango durante la época de invierno, los cuales oscilaron entre el 11 y 16 %, mientras que en la figura 8 muestra los datos obtenidos en el estado de San Luis Potosí, que oscilaron entre el 11 y 14 %. Estos resultados muestran un incremento de resina en todas las muestras en la época de invierno frente al verano en el estado de Durango. Es importante resaltar el sitio D7 en San Luis Potosí que se mantiene en ambas épocas con el mayor porcentaje de resina con 14.40 % para verano y 16.6 % en invierno. En San Luis Potosí, en las muestras analizadas en invierno no tuvieron el mismo comportamiento que en Durango en el que todas las

muestras fueron al alza, sin embargo, de 11 sitios identificados en San Luis Potosí, 6 sí incrementaron los porcentajes de resina en invierno comparado con verano, 4 de 11 se mantuvieron igual y solo uno el S3 bajo sus porcentajes de resina en invierno respecto a verano. Macrae *et al.*, (1986), mencionan que la producción de resina se ve favorecida cuando la temperatura alcanza los 40 °C, este dato podría indicar que las temperaturas en verano del año de colecta de nuestras muestras no alcanzaron los 40 °C.

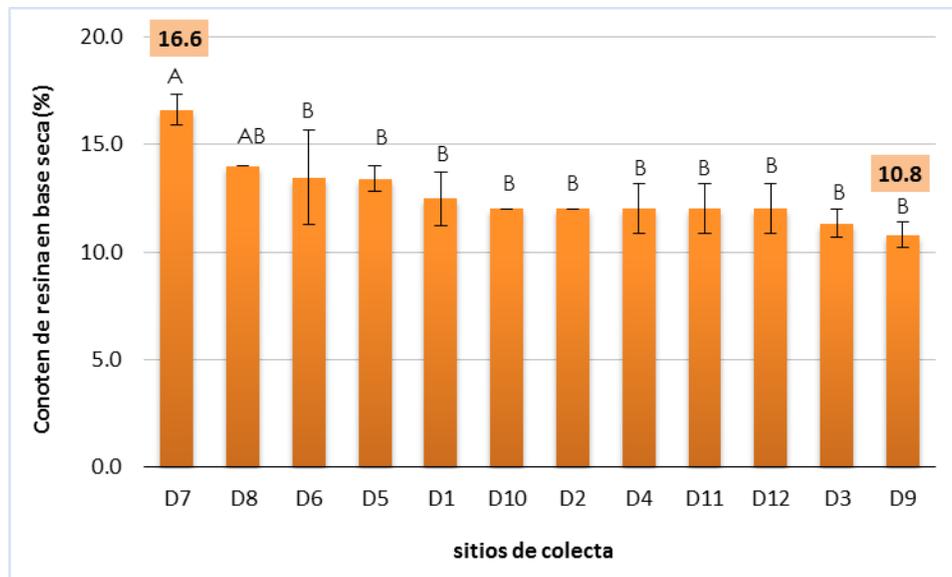


Figura 7. Porcentajes obtenidos en extracción de resina de cada sitio de colecta del estado de Durango en invierno. Medias con letras diferentes son estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

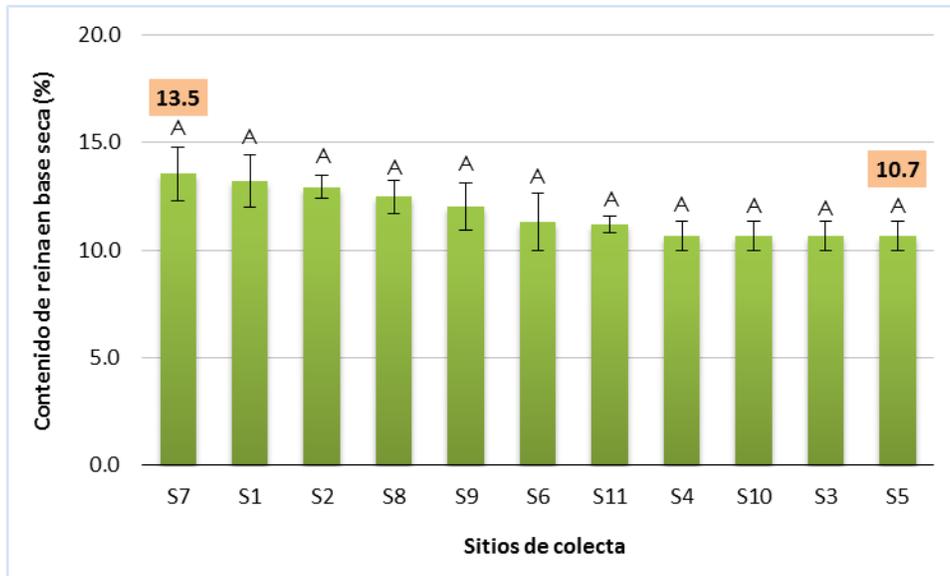


Figura 8. Porcentajes obtenidos en extracción de resina de cada sitio de colecta del estado de San Luis Potosí en invierno. Medias con letras diferentes son estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

6.5. Extracción de hule

6.5.1. Extracción de hule en verano

Observamos que para la extracción de hule correspondiente a los sitios del estado de Durango y San Luis Potosí existen diferencias significativas, la figura 9 muestra que el mayor valor para Durango se encuentra en el D4 con un 21.9 % y el menor en el D3 con un 11.3 %, mientras que la media más alta en San Luis Potosí se obtuvo en el sitio S6 con un 19.4 % y el menor valor en el S11 con 11.7 % (figura 10).

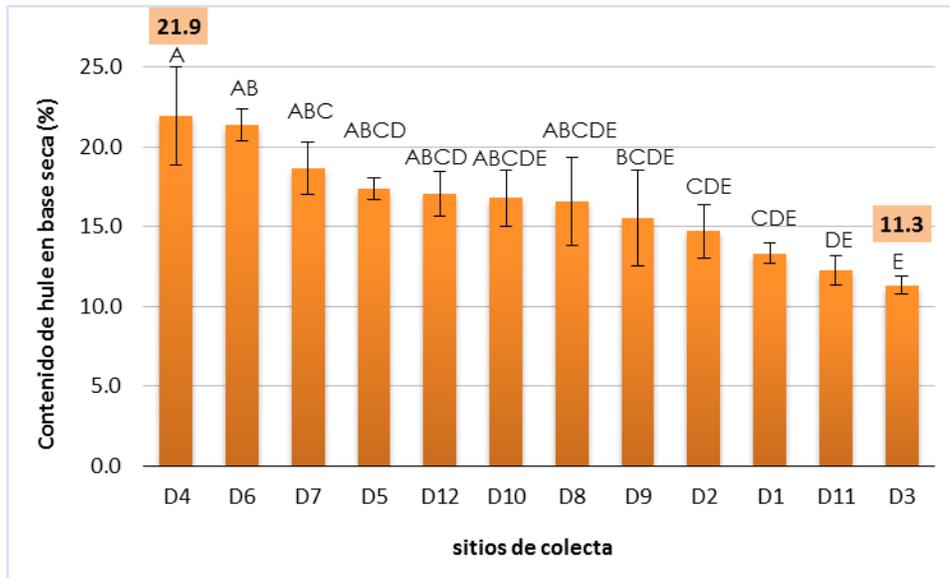


Figura 9. Porcentajes obtenidos en extracción de hule de cada sitio de colecta del estado de Durango en verano. Medias con letras diferentes son estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

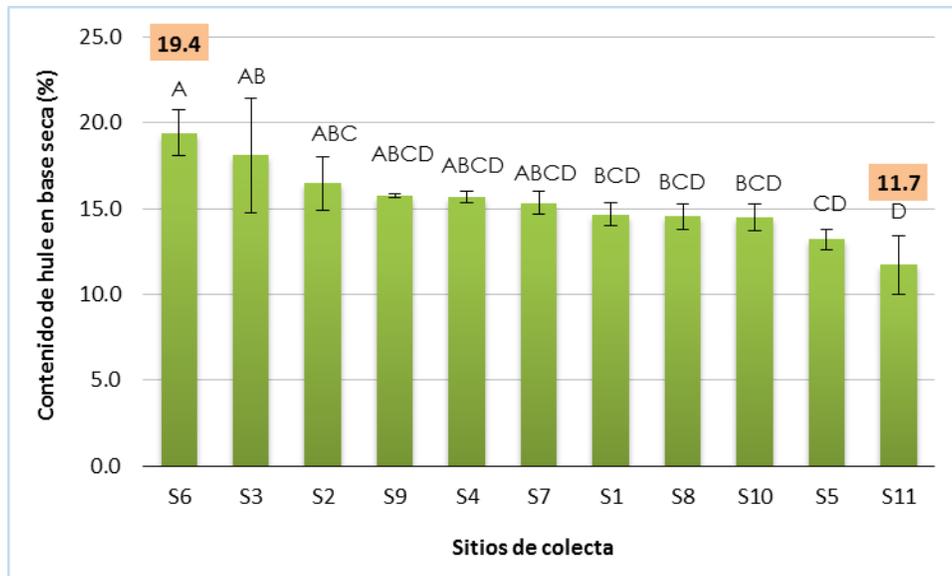


Figura 10. Porcentajes obtenidos en extracción de hule de cada sitio de colecta del estado de San Luis Potosí en verano. Medias con letras diferentes son estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

Con lo anterior podemos observar que en el estado de Durango se obtienen los mayores porcentajes en la extracción de hule. Esto concuerda con lo reportado por (de Rodríguez et al., 2006b), quienes encontraron una mayor (21 % de hule) acumulación de hule en el estado de Durango.

6.5.2. Extracción de hule en invierno

En las figuras 11 y 12 se muestran los valores de hule obtenidos en la época de invierno en Durango y San Luis Potosí respectivamente, el mayor porcentaje de extracción fue de 15.3 % tanto para el sitio D10 Y S2 (Durango y San Luis Potosí) y los porcentajes más bajos fueron de 8.6 % en el sitio D11 Y 7.1 % en el sitio S8. Al contrario de los resultados obtenidos con resina, el hule muestra mayores porcentajes en verano con respecto a la colecta realizada en invierno. El rango de porcentajes de hule en verano oscila entre 12 y 21.8 % y en invierno entre 9 y 15.3 %. En algunos sitios de colecta como D4, D6 y D7 este cambio fue muy contrastante.

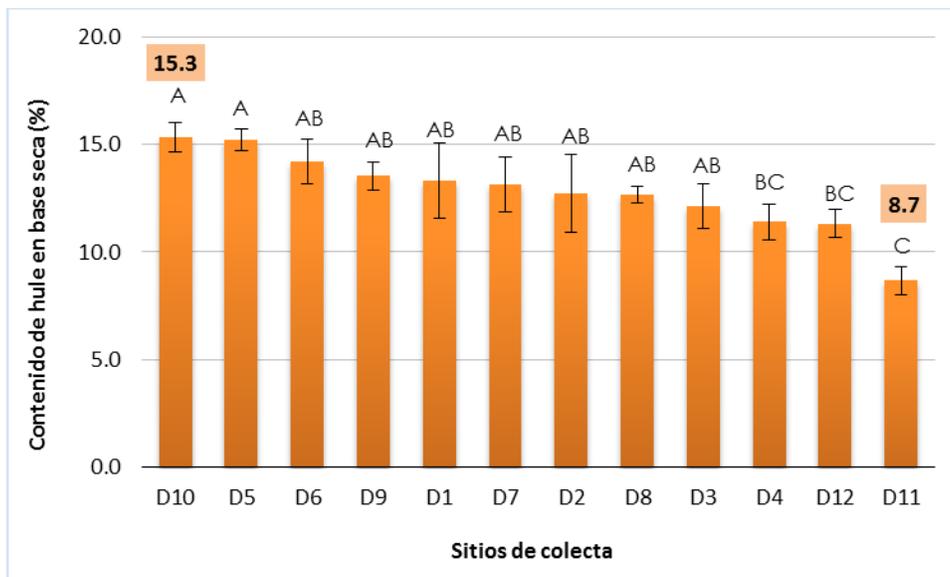


Figura 11. Porcentajes obtenidos en extracción de hule de cada sitio de colecta del estado de Durango en invierno. Medias con letras diferentes son estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

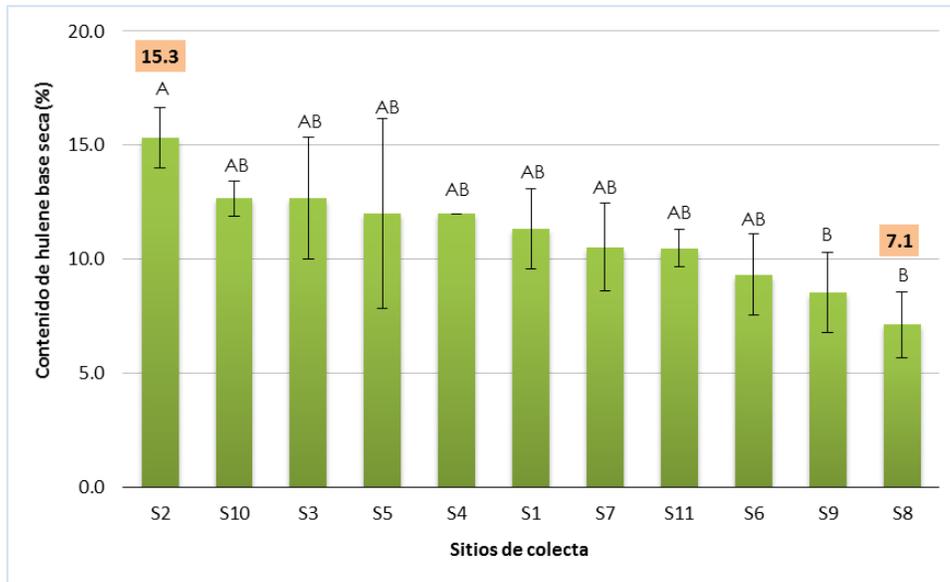


Figura 12. Porcentajes obtenidos en extracción de hule de cada sitio de colecta del estado de San Luis Potosí en invierno. Medias con letras diferentes son estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

De forma general, en este trabajo se obtuvieron valores altos de concentración de hule en guayule alcanzando casi el 22 % (muestra D4 de verano en Durango). Este porcentaje de hule se reportó también en plantas silvestres en el año 2004 (Jasso de Rodríguez *et al.* 2004, citado en de Rodríguez *et al.*, (2006a) Sin embargo, el promedio general del contenido de hule (10-15 %) en las plantas analizadas en este trabajo supera lo que esta reportado en el año 1997 (8-10 %) para plantas silvestres (Cantú *et al.*, 1997). Cabe mencionar que estos datos no pueden ser comparables considerando el método de extracción usado en su momento. El método ASE usado en este trabajo, tiene una alta repetibilidad, alta recuperación de la extracción, operación totalmente automática, bajo consumo y exposición a los solventes y menor tiempo de extracción en comparación a las técnicas previamente usadas como Soxhlet, y gravimétrica (Suchat *et al.*, 2013).

En 2013 dos grupos utilizaron la técnica de extracción acelerada de solventes para extraer el hule de guayule. El grupo de Suchat *et al.*, (2013) analizó 240 plantas procedentes de 6 variedades y plantas cultivadas en condiciones del mediterráneo, el valor más alto obtenido de hule fue 13.4 %. Es importante resaltar que el trabajo aquí presentado es la primera vez que utiliza la técnica de ASE para la extracción de hule y resina de plantas silvestres.

Comparando la producción de hule frente a la resina en invierno y verano, en nuestros datos vemos que en verano la producción global de hule es mayor que la de resina, mientras que en invierno la acumulación de hule y resina es prácticamente igual. Estos resultados en principio no coinciden con lo que demostró Macrae *et al.*, (1986), quienes encontraron que durante el verano las plantas de guayule producen más resina que hule y en invierno ocurre lo contrario. Sin embargo, ellos concluyen que dado que la resina y el hule se producen por la misma ruta biosintética del poli-isopreno, cuando uno es más alto el otro es más bajo, tomando esto en cuenta, si podemos observar este comportamiento en los datos en verano donde tenemos un mayor porcentaje de hule y por lo tanto una menor concentración de resina.

Así mismo, muchos autores coinciden con la hipótesis de que las bajas temperaturas favorecen la producción de hule. Veatch-Blohm *et al.*, (2006), han demostrado que la síntesis de hule parece ser altamente estimulada por temperaturas inferiores a 10 °C, específicamente durante la noche. Macrae *et al.*, (1986) proponen que las temperaturas bajas estimulan la producción de hule sin eliminar el posible efecto de otros factores ambientales tales como la intensidad de

luz y la precipitación los autores llegaron a determinar que la producción óptima de hule se produce a una temperatura de 27 °C durante el día seguidas por 7 °C durante la noche. Angulo-Sánchez *et al.*, (2002) concluyeron que temperaturas entre -4 °C y 2 °C aumenta la síntesis de hule. La tolerancia a la temperatura fría puede ser un factor en la producción de hule (Agrawal y Konno, 2009). Sin embargo, varios autores adicionan otros factores, que pueden tener igual importancia, solos o en combinación con la temperatura como las precipitaciones, así que, Angulo-Sánchez *et al.*, (2002) observó en sus experimentos que los bajos niveles de lluvia mejoraron la acumulación de hule, mientras que los altos niveles de lluvia no lo hicieron a pesar que la alta precipitación también mejoró la producción de biomasa. De igual forma Veatch-Blohm *et al.*, (2006) demostraron que plantas de guayule sometidas a estrés hídrico tuvieron mayores concentraciones de hule que las plantas bien regadas encontrado mayores concentraciones de hule en plantas sometidas a estrés hídrico en la época de verano comparada con invierno (Veatch-Blohm *et al.*, 2006). Este último resultado podría compararse de alguna manera con los obtenidos en este trabajo ya que se obtuvieron los mayores porcentajes de hule en verano.

Todo lo anterior, pone de manifiesto que el hecho de que nuestros datos indiquen que en 23 sitios diferentes de dos estados diferentes en dos épocas de colecta la concentración de hule sea mayor en verano que invierno, esto puede ser posible bien sea por que las condiciones de estrés hídrico en ese año fueron suficientes para promover la producción de hule y/o porque las temperaturas de día y noche en esa época de ese año fueron favorables para la producción de hule entre muchos

otros factores. Cabe mencionar que se intentó correlacionar con datos meteorológicos obtenidos de las estaciones del INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias) cercanas a los sitios de colecta, desafortunadamente no todas las estaciones contenían la misma frecuencia de registro y se dificultó hacer dicho análisis.

6.6. Análisis proteómicos

En base en estos resultados y tomando en consideración el criterio inicial de elegir plantas con la mayor y menor sobreexpresión de proteínas involucradas en la biosíntesis de hule. Para los análisis de proteómica comparativa, se eligieron 12 muestras de corteza almacenadas a -80 °C correspondientes a 2 sitios y 2 épocas de colecta diferentes (con 3 repeticiones). Se eligieron S6 y D4 por ser los que presentaron los más altos porcentaje de contenido de hule en verano y de los más bajos porcentaje de contenido de hule en invierno. Sin embargo, por problemas técnicos en el proceso de extracción de proteínas se perdieron las muestras del sitio D4 y por lo tanto se tuvo que trabajar con las muestras del sitio D6 que fue el segundo con respecto al contenido de hule.

6.7. Cuantificación y verificación de la calidad de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de BCA, con la finalidad de obtener datos que mostraran la cantidad de proteína contenida en cada una de las muestras elegidas. En la tabla 2 se muestran las concentraciones (μg

totales) de las muestras, después del proceso de reducción y alquilación, siendo esta la última verificación que se hizo de concentración total de proteína la cual sirvió para asegurarse que la misma cantidad de proteína era usada en cada muestra para el resto del procesamiento.

Tabla 2. Contenido de proteínas en μg totales en los sitios de colectas con tres repeticiones biológicas en los estados de San Luis Potosí y Durango.

Estado y sitio de colecta	Época de colecta	Concentración de proteínas (μg totales)	Muestra
San Luis Potosí Sitio 6	Verano	1446	1
		2934	2
		1802	3
	Invierno	1238	4
		1560	5
		880	6
Durango Sitio 6	Verano	2441	7
		1928	8
		2250	9
	Invierno	2097	10
		1692	11
		2099	12

Una vez realizada la cuantificación de las muestras (reducidas y alquiladas), se verificó la cantidad y la calidad de los extractos en un gel de electroforesis unidimensional (figura 13). En los carriles de las muestras (2-13) se observa claramente la presencia de bandas a lo largo de los carriles. Se aprecia una mayor concentración de proteínas entre los pesos moleculares de 21.5 KDa a 14.4 KDa.

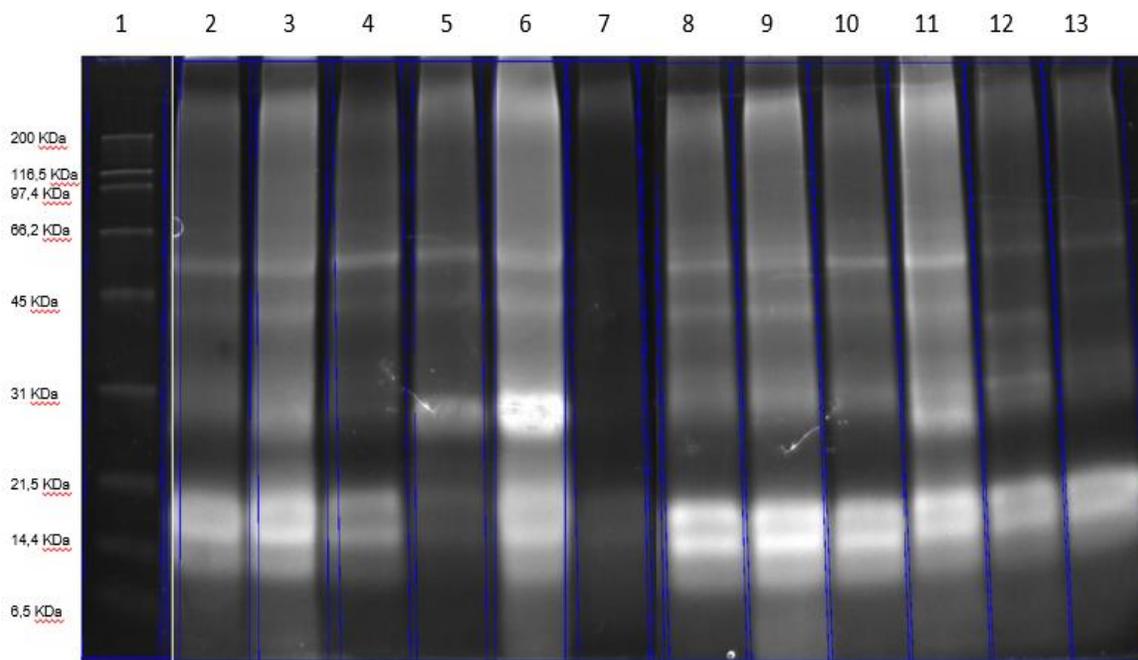


Figura 13. Electroforesis de una dimensión de las muestras de tallos de guayule. Patrón de proteínas totales de guayule. Gel SDS-PAGE Any KD Bio-Rad, teñido con SYPRO™ Ruby. Carril 1 pertenece al marcador de peso molecular, carriles del 2 a 4 y de 5 a 7 muestras de las tres muestras de S6 en verano e invierno, respectivamente. Carriles del 8 a 9 y de 11 a 13 muestras de las tres muestras de D6 en verano e invierno, respectivamente.

Una vez que se comprobó que las muestras contaban con calidad y cantidad suficiente de proteína se continuó con la determinación de la identidad de las proteínas mediante espectrometría de masas.

6.7.1. Número de proteínas presentes en Durango y San Luis Potosí

Después del filtrado de datos para eliminar los espectros de baja puntuación, se dejaron los espectros que cumplían los criterios de confianza y se identificó un total de 10,681 proteínas únicas para los dos sitios (Durango y San Luis Potosí). De estas proteínas prospecto y basándose nuevamente en el algoritmo de MASCOT se

identificaron secuencias que contaran con una cobertura >20 y al menos 1 péptido no coincidente y después en un segundo filtro con una cobertura >40 y al menos al menos 2 péptidos. Para posteriormente eliminar las secuencias que fueran iguales y finalmente se eliminaron secuencias que no fueron identificadas con algún organismo del reino plantae, se redujo la lista de proteínas identificadas en ambos estados a 794. De estas 794 proteínas, las que mostraron un cambio significativo ($P < 0.05$) en abundancia fueron 461, representando el 4.3% del total de las proteínas identificadas. Estas proteínas expresadas diferencialmente (PED) fueron elegidas por tener un índice de abundancia (invierno/verano) ≥ 1.50 o ≤ 0.67 (Tabla 3).

Tabla 3. Número de proteínas identificadas en los sitios de colecta en los estados de Durango y San Luis potosí.

Estado de colecta	Número de proteínas totales	Número de proteínas de buena calidad	Número de proteínas diferenciales invierno/verano
San Luis Potosí	7574	524	270
Durango	3107	270	191
Total	10,681	794	461

En San Luis Potosí se identificaron 223 proteínas con una mayor expresión (“up-regulated”) en invierno respecto a verano mientras que 47 fueron menormente expresadas (“down-regulated”). En Durango, el número de PED fue menor, pero la tendencia fue la misma, se encontró el mayor número de ellas (186) sobre

expresadas y solo 5 proteínas con una menor expresión en invierno frente a verano (figura 14).

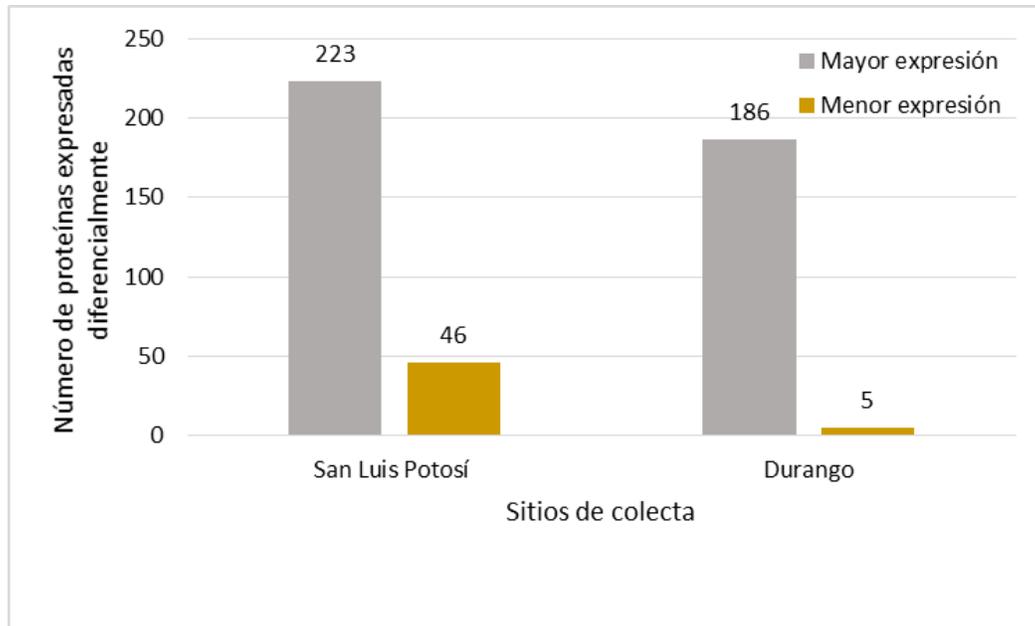


Figura 14. Proteínas expresadas diferencialmente en invierno respecto a verano en los sitios de colecta en los estados de Durango y San Luis Potosí.

Estos resultados muestran de forma general que existe un mayor número de proteínas sobre-expresadas en invierno en comparación al verano, esto puede ser debido a que muchos procesos biológicos y funciones moleculares, incluyendo respuesta al estrés y metabolitos secundarios, se activan durante el ciclo de frío. Las plantas modifican su metabolismo y crecimiento para adaptarse al estrés por frío mediante la reprogramación de la expresión génica durante la aclimatación en frío (Chinnusamy *et al.*, 2010; Skinner, 2015).

La producción de hule en la planta de guayule puede soportar altas fluctuaciones de temperaturas que pueden ir desde los $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $49\text{ }^{\circ}\text{C}$, de acuerdo a esto se sabe que las altas temperaturas no afectan las funciones biológicas de la planta, sin

embargo, temperaturas bajas (por debajo de los 16 °C) hacen que su crecimiento sea más lento, por otro lado, se sabe que en general estas bajas temperaturas y el estrés hídrico hacen que el rendimiento y calidad del hule aumente (Goss *et al.*, 1984; Ji *et al.*, 1993; Reddy y Das, 1988; Thompson y Ray, 1989).

Con las variaciones estacionales en el Desierto Chihuahuense las plantas modifican la tasa de biosíntesis del hule, por lo tanto, existe una mayor producción y mejor calidad en las cortezas del parénquima del guayule, esta modificación se debe precisamente a las bajas temperaturas en los meses fríos de invierno, a pesar de esto los procesos bioquímicos de las proteínas productoras de hule no se conoce completamente (Bonner, 1943; Sundar y Ramachandra Reddy, 2000; Veatch-Blohm *et al.*, 2006)

6.7.2. Índice de abundancia de proteínas diferenciales

El índice de abundancia es una relación que enfatiza que lo que se mide es realmente un equilibrio entre procesos biosintéticos y degradativos, esto, proporciona información valiosa sobre la función y regulación de las proteínas (Pan *et al.*, 2006; Xia *et al.*, 2007). En los índices de abundancia identificados en las proteínas diferenciales de ambos estados de colecta (figura 15) se observa que a pesar de identificar un menor número de proteínas diferenciales en Durango (figura 14), este, muestra una mayor abundancia en las proteínas (diferenciadas) encontradas, lo cual manifiesta que el número de proteínas diferenciales identificadas para cada estado no es indicativo de que pueda existir una mayor expresión o abundancia de las mismas.

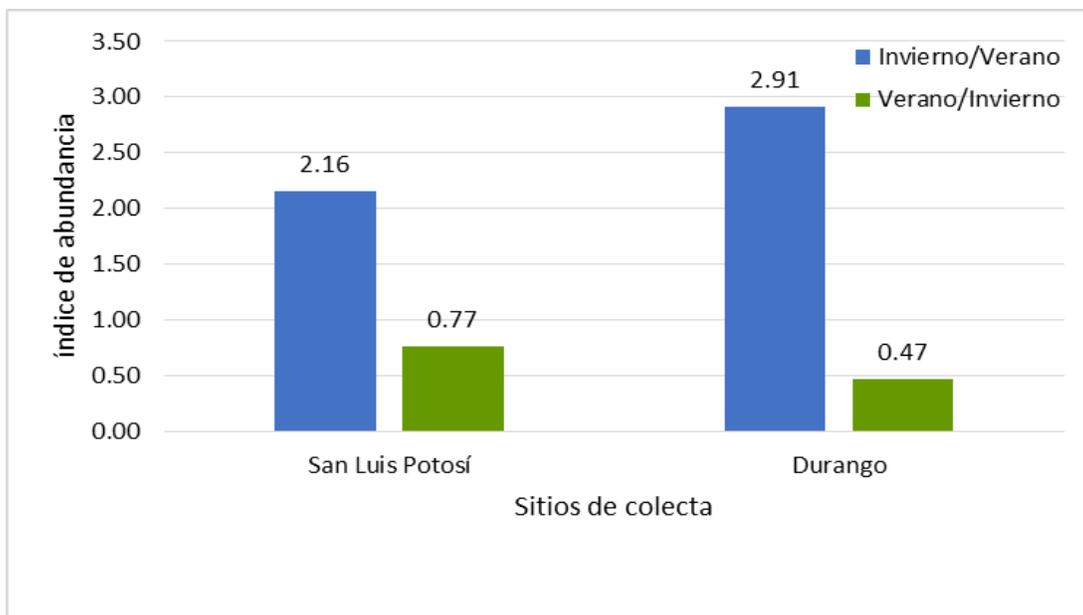


Figura 15. Índice de abundancia de proteínas diferenciales en San Luis Potosí y Durango, en dos estaciones del año (verano e invierno).

6.7.3. Clasificación funcional de proteínas diferenciales presentes en Durango y San Luis Potosí

Para conocer la relación de procesos biológicos en ambos estados se tomaron las proteínas diferenciales y se sometieron a un análisis de procesos biológicos en el programa **GORILLA** (Eden *et al.*, 2009) en el cual se realizó una búsqueda de genes que tuvieran similitud con los datos obtenidos de las muestras de Durango y San Luis Potosí, tomando la base de datos de *Arabidopsis thaliana* para la búsqueda de proteínas homologas, dado que es la base de datos en plantas disponible con mayor información.

Se identificaron 124 procesos biológicos en ambos estados de colecta, estos procesos se agruparon en 15 categorías (figura 16), la mayoría de las proteínas se clasifican en 2 categorías: metabolismo compuesto que contiene piridina (54 %) y

respuesta a iones metales (18 %), el resto de proteínas se clasifican en las siguientes categorías: metabolismo de sustancias orgánicas (7 %), metabolismo derivado de carbohidratos (5 %), metabolismo (3 %), respuesta a estímulos (3 %), metabolismo de la coenzima oxido reducción (3 %), metabolismo de carbohidratos (2 %), catabolismo (2 %), metabolismo de cofactores (2 %), metabolismo de precursores y energía (2 %), procesos celulares (1 %), metabolismo de compuestos nitrogenados (1 %), biosíntesis (1 %), y metabolismo de compuestos hidroxí orgánicos (1 %).

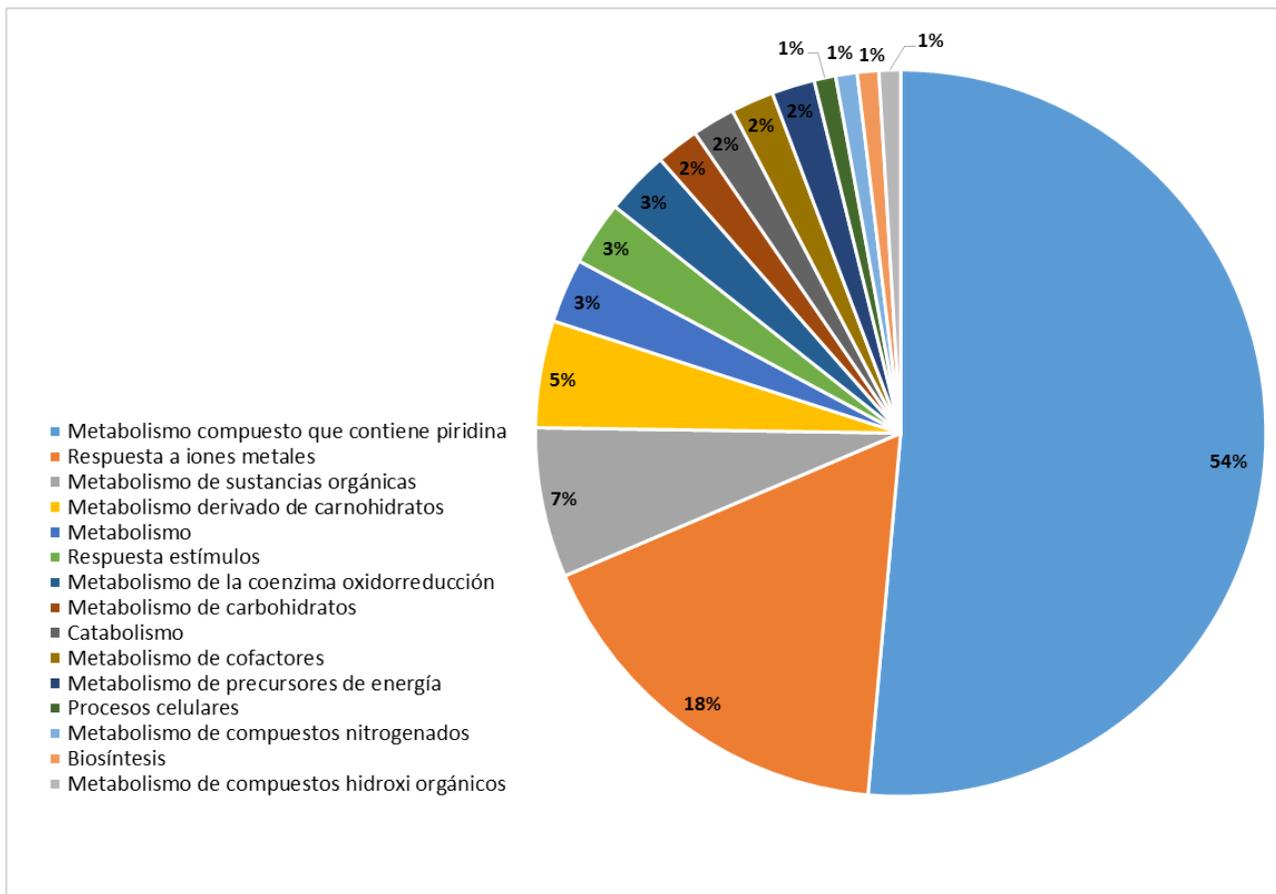


Figura 16. Procesos biológicos presentes en Durango y San Luis Potosí.

Dentro de la categoría del metabolismo de compuestos que contienen piridina se encuentran 36 subcategorías de las cuales destacan 1) procesos metabólicos del piruvato y 2) procesos metabólicos de moléculas pequeñas, resaltan debido a que en estos grupos se localiza el mayor número de proteínas que participan en la biosíntesis de la molécula del piruvato, la cual es el primer compuesto dentro de la ruta del MVA y del MEP que desencadena la formación del IPP. Dentro de la subcategoría de procesos metabólicos de moléculas pequeñas se identificó la proteína CPT, la cual forma parte del complejo de la partícula del hule.

Dentro de la categoría de los procesos metabólicos se encuentran involucrados nuevamente la proteína CPT y la proteína GHS.

6.7.4. Análisis del perfil proteómico de proteínas expresadas diferencialmente mediante un diagrama de Venn.

Las proteínas diferenciales identificadas fueron analizadas mediante la aplicación web Biovenn (<http://www.biovenn.nl/>) (Hulsen *et al.*, 2008), con el fin de comparar e identificar a las proteínas comunes, es decir, aquellas proteínas presentes en ambos estados de colecta.

En la figura 17 se muestra el diagrama de Venn obtenido de las proteínas diferenciales, se hace notoria una mayor presencia de proteínas diferentes para el estado de San Luis Potosí con un total de 175 proteínas, mientras que para Durango hubo un total de 98 proteínas diferentes.

Del total de proteínas analizadas, se encontró que ambos estados comparten únicamente 93 proteínas comunes. Esto significa que 93 proteínas diferenciales juegan probablemente una misma función en ambos estados.

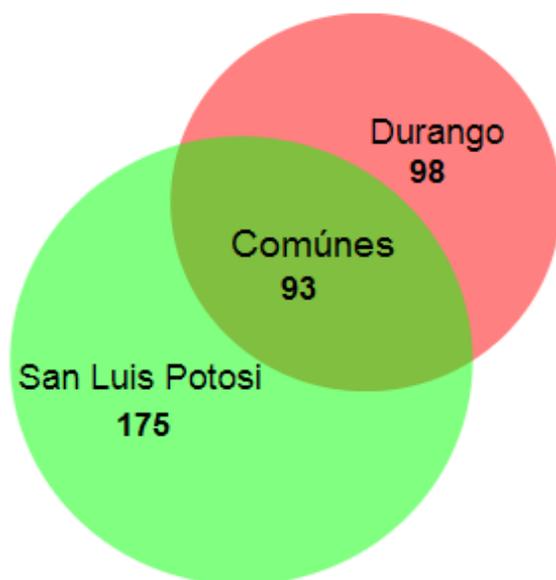


Figura 17. Número total de proteínas diferenciales presentes en Durango y San Luis Potosí. Identificación de proteínas únicas y comunes entre estados de acuerdo al perfil proteómico, mediante el programa BioVenn.

6.7.5. Clasificación funcional de proteínas comunes diferenciales presentes en Durango y San Luis Potosí

Con la finalidad de conocer qué procesos biológicos comparten ambos estados (Durango y San Luis Potosí), se llevó a cabo una clasificación funcional de las proteínas comunes, los resultados se muestran en la figura 18. De acuerdo a esto se identificaron 74 procesos biológicos, los cuales se clasificaron en 16 categorías, resaltando el catabolismo de moléculas pequeñas con el 38 % de agrupación,

seguido de la respuesta a iones metales con el 14 %, las categorías y porcentajes obtenidos de acuerdo al resto de las proteínas fueron las siguientes: metabolismo compuesto que contiene piridina (11 %), metabolismo de la ribosa fosfato (9 %), metabolismo de sustancias orgánicas (6 %), metabolismo derivado de carbohidratos (4 %), metabolismo (3 %), procesos celulares (2 %), respuesta a estímulos (2 %), catabolismo (2 %), metabolismo de carbohidratos (2 %), metabolismo de precursores de energía (2 %), biosíntesis (2 %), metabolismo de la coenzima (2 %), metabolismo de cofactores (2 %), metabolismo de compuestos nitrogenados (2 %).

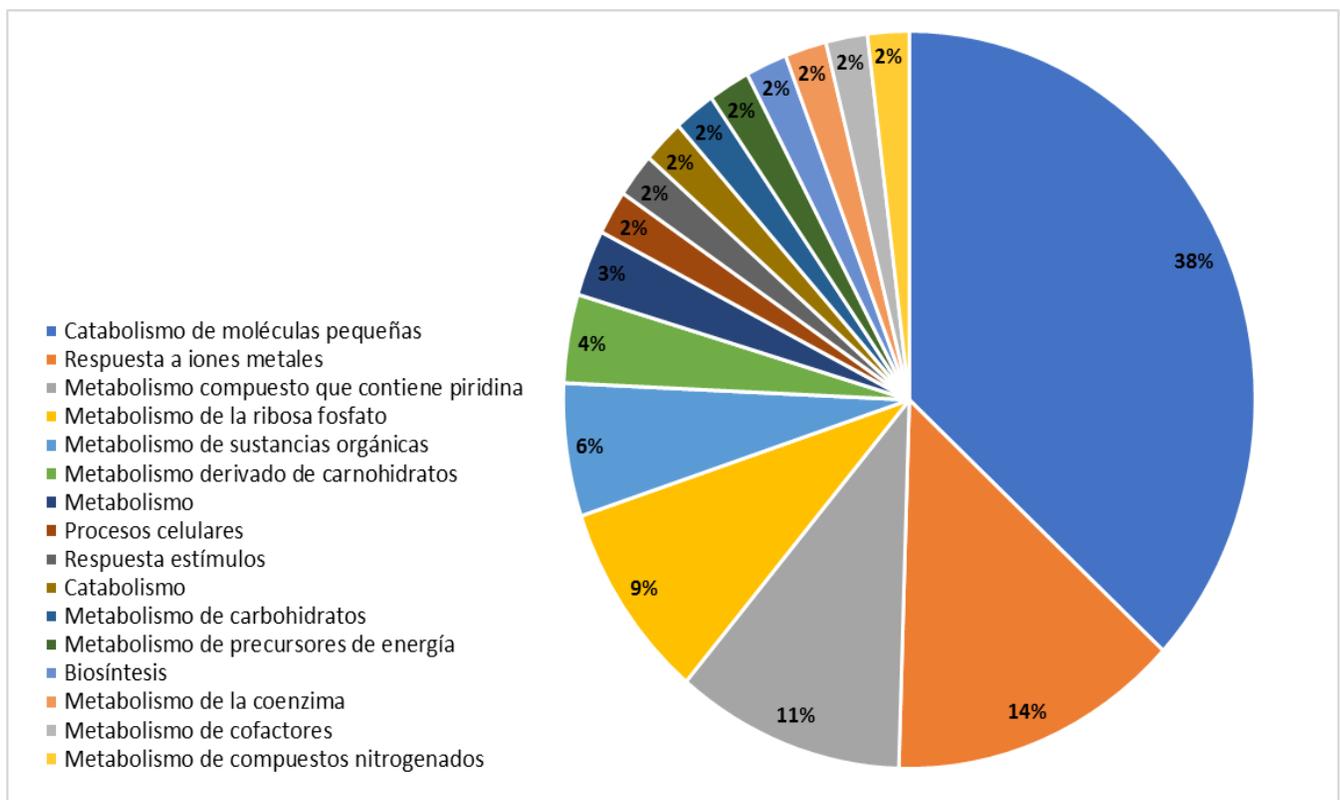


Figura 18. Procesos biológicos comunes presentes en Durango y San Luis Potosí.

De acuerdo a esta clasificación y al interés especial por algunas proteínas, se logró identificar la proteína GHS dentro de cuatro categorías que son las siguientes: procesos metabólicos, procesos celulares, procesos metabólicos de sustancias orgánicas (subcategoría: procesos de metabolismo celular) y metabolismo compuesto que contiene piridina (subcategoría: procesos de elongación traslacional), esto podría sugerir que esta proteína juega un rol amplio dentro del metabolismo del guayule y no necesariamente su función es exclusiva dentro del complejo de la partícula del hule.

6.7.6. Reconstrucción de la ruta de biosíntesis del hule de guayule

El mecanismo relacionado a la biosíntesis y acumulación de grandes cantidades de hule y resina en el tejido del parénquima de la corteza del tallo de guayule permanece sin respuesta hasta ahora (Kajiura *et al.*, 2017). Con el objetivo de tratar de conocer más sobre la ruta de biosíntesis de hule, tratamos de reconstruir dicha ruta al menos hasta el IPP y ubicar dentro de dicha ruta las proteínas PED encontradas en nuestro análisis proteómico (figura 19).

Dentro de la ruta del MVA se identificaron tres proteínas: Acetil CoA tiolasa (AACT), 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA sintasa (HMGS), 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa (HMGR), Mientras que para la vía del MEP se identificó la 4-hidroxi-3-metilbutyl-2-1-difosfato sintasa (HDS). Todas ellas con expresión diferencial común en ambos estados y con una mayor expresión en invierno que en verano.

Estos resultados junto con los generados del transcriptoma de guayule (Baylon 2017), podrían sugerir que la síntesis del IPP en guayule podría seguir ambas rutas metabólicas. Esto concuerda con los reportado por Bick y Lang, (2003), quienes mencionan que el IPP se produce principalmente por la vía del MVA, sin embargo, este proceso puede complementarse con las moléculas de IPP sintetizadas por la ruta del MEP, y de esta manera poder viajar hacia el citosol.

En trabajos realizados con *H. brasiliensis*, las proteínas AACT, HMGS, HMGR, MVK y PMVK se encontraron altamente expresadas en el látex en comparación con otros tejidos de la planta, lo que llevo a la conclusión del papel importante que juegan en la biosíntesis de hule dichas enzimas (Sando *et al.*, 2008; Sirinupong, *et al.*, 2005 y Suwanmanee *et al.* 2012).

En plantas de *T. brevicorniculatum*, la sobre expresión de tres genes a la vez: de HMGR, AACT y otro gen de la ruta MVA, aumentó su actividad enzimática y afectó a la acumulación de productos isoprenoides finales (Gronover, *et al.*, 2017). La sobreexpresión del gen HMGR en plantas de guayule, no produjo un aumento en los niveles de resinas o hule natural (Dong, *et al.*, 2013). Estos resultados, podrían sugerir que la biosíntesis de hule en guayule, puede estar regulada por la sobreexpresión de más de una enzima clave dentro de la ruta MVA como podrían ser las 3 enzimas encontradas en este estudio: AACT, HMGR y HMGS.

La HMGR, es considerada una enzima reguladora clave del flujo de carbono en la ruta del MVA en mamíferos y en sistemas microbianos, en plantas funciona de manera similar hacia una mayor producción de isoprenoides (Wang y Keasling, 2002; Kirby y Keasling, 2009). Existen estudios los cuales indican que la actividad

de la HMGR en plantas es mayor en la época de primavera, otoño e invierno, siendo esta mayor actividad en primavera atribuida a un mayor crecimiento de la planta, mientras que en otoño e invierno la expresión de esta enzima se relaciona con un aumento de la biosíntesis del hule (Benedict *et al.*, 2008; Benedict *et al.*, 2014 y Ji *et al.*, 1993). De acuerdo a los resultados encontrados en nuestra investigación, la mayor expresión de esta proteína se obtuvo en invierno.

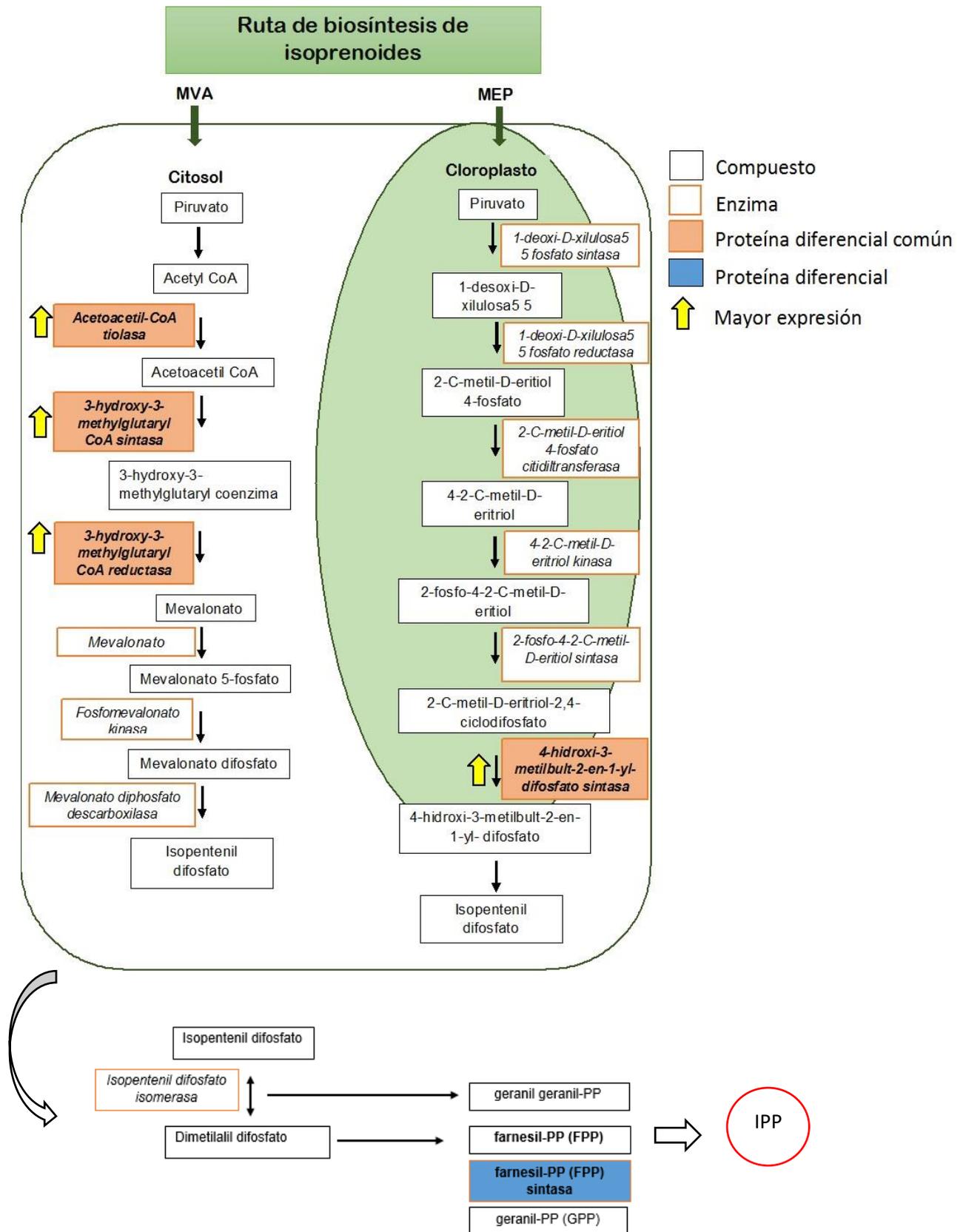


Figura 19. Identificación de proteínas con expresión diferencial en las rutas de biosíntesis del IPP.

6.6.7. Complejo de la partícula de hule

Las proteínas que se cree que están asociadas con el complejo de la partícula de hule de guayule incluyen la AOS (Backhaus *et al.*, 1991; Pan *et al.*, 1995), CPT y GHS (Kim *et al.*, 2004). Sin embargo, el papel preciso de estas tres proteínas en la biosíntesis del hule in vivo aún no se conoce.

En este trabajo, se identificaron las tres secuencias proteínicas descritas para guayule relacionadas con el complejo de la partícula de hule, dichas proteínas tuvieron una mayor expresión diferencial en la relación invierno/verano (figura 20), al mismo tiempo que dichas proteínas mostraron un alto índice de abundancia (figura 21). En la tabla 5 se describen dichas proteínas.

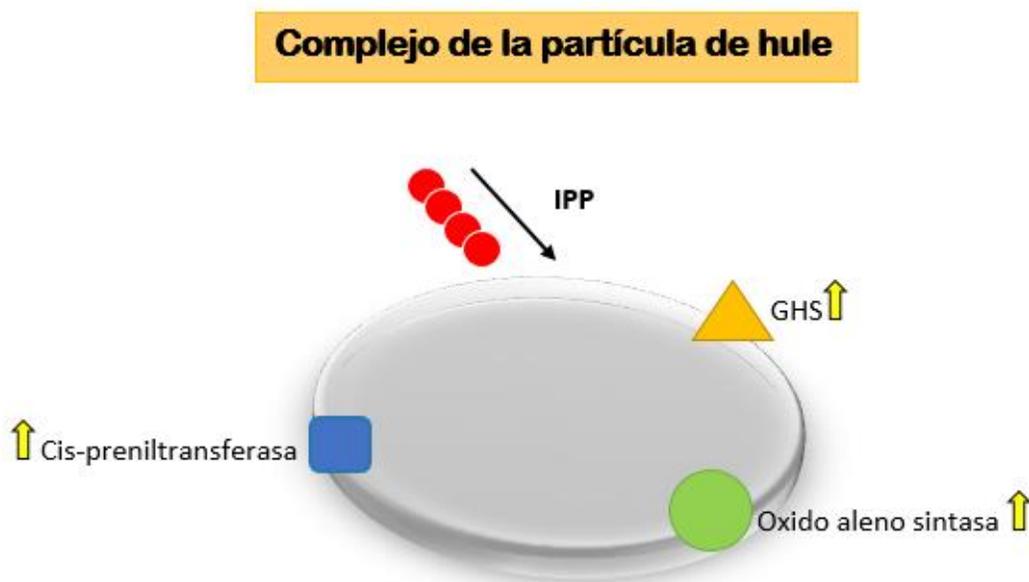


Figura 20. Simulación del complejo de la partícula de hule.

Esta alta expresión diferencial, puede estar relacionada con un alto rendimiento de producción de hule, ya que como se muestra en la figura 21, existe un mayor índice de abundancia en Durango, en comparación con los valores encontrados en San Luis Potosí, esto coincide con los valores de porcentajes de extracción de hule. Tanto la GHS como la AOS se encontraron en ambos estados de colecta, sin embargo, la CPT se identificó únicamente en San Luis Potosí con un alto índice de abundancia. En la tabla 5 se describen dichas proteínas.

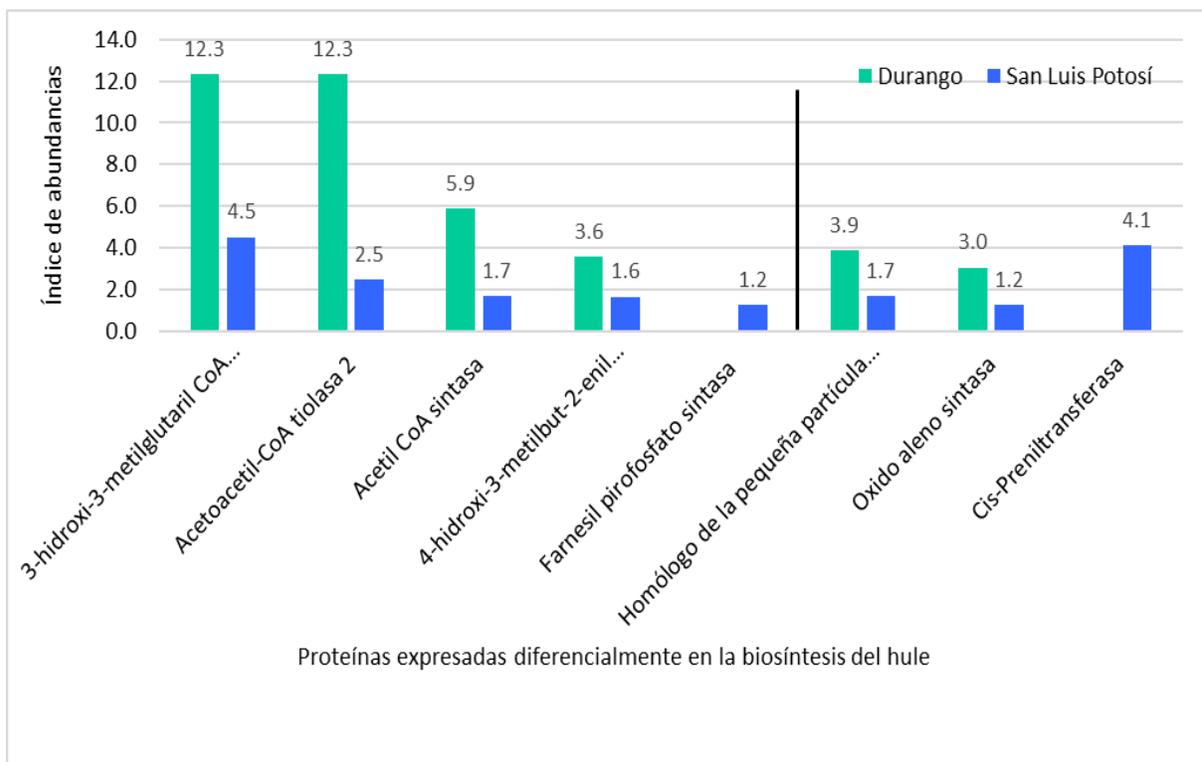


Figura 21. Índices de abundancias de proteínas PED. **A)** PED dentro de las rutas de biosíntesis del IPP, **B)** PED dentro del complejo de la partícula de hule.

La GHS ha sido clonada y secuenciada por primera vez por Kim *et al.*, (2004), esta es una proteína homóloga de la SRPP descrita en *H. brasiliensis* y en *T.*

bremiculatum. La secuencia proteica identificada en nuestro trabajo comparte una identidad de aminoácidos del 99.9 % con la proteína guayule previamente aislada, así como aproximadamente un 65 % de similitud con la SRPP de *T. bremiculatum* y un 52 % con la SRPP de *H. brasiliensis*. Existe otra proteína descrita en *H. brasiliensis*, que interacciona con la SRPP esta es la REF, ambas proteínas son inducibles por estrés y juegan un papel importante en la estabilización de las partículas de hule por su interacción entre el interior hidrofóbico y el citosol acuoso (Berthelot *et al.*, 2014). Dado que GHS en guayule, tiene una relación directa con la biosíntesis de hule como se ha demostrado en otros trabajos (Kajiura *et al.*, 2017; kim *et al.*, 2004) y puesto que nuestros resultados muestran también una sobreexpresión en invierno, podría ser que la GHS no solo contribuye en la biosíntesis de hule sino también ayuda en la estabilización de las partículas de hule de forma similar como lo hace la SRPP en *H. brasiliensis*. De hecho, Kajiura *et al.*, (2017) demostraron que GHS se localiza principalmente en la superficie de las partículas de hule y está unida a membrana, pero puede ser fácilmente solubilizada con detergente, esto coincide con el modelo de interacción de SRPP con monocapas de membrana lipídica en las partículas de hule en Hevea.

La AOS es la proteína más abundante del complejo de la partícula de hule en guayule razón por la cual se cree que podría tener un papel estructural dentro del complejo (Pan *et al.*, 1995) y es un miembro de la familia CYP74 de citocromos P450 (Ponciano *et al.*, 2012). El papel que juega la AOS ha sido muy poco estudiado, sin embargo, se cree que pueda estar implicada en la biosíntesis de hule (Siler y Cornish, 1994b). Pan *et al.*, (1995), describen esta proteína como un

miembro de la vía de las lipoxigenasas, la cual es una ruta mediadora del metabolismo de las plantas, uno de los productos finales de esta vía es un metabolito llamado ciclopentenilo, el cual es un precursor directo de la ruta del ácido jasmónico, se sabe que esta ruta se activa cuando la planta sufre algún tipo de estrés, especialmente en la defensa contra insectos, sin embargo, en guayule no se conoce su rol exacto (Farmer, 1992; Vick, B.A., 1993).

Finalmente, la otra proteína descrita dentro del complejo de la partícula de hule es la CPT, que en realidad es una familia de enzimas (CPTs), que sintetizan varios tipos de isoprenoides y que se han identificado tanto en procariotas como en eucariotas (Yang *et al.*, 2015). Se sabe que ésta realiza la polimerización enzimática *cis* 1-4 de las moléculas de isopreno lo cual da como resultado cadenas largas de hule (poliisopreno), por lo tanto, es una enzima crucial para la formación de hule (Benedict, 1985). Para que la CPT pueda llevar a cabo su actividad como transferasa de hule e iniciar la biosíntesis de moléculas nuevas de hule, requiere de cofactores como el Magnesio (Mg^{+2}) y de un sustrato alílico o iniciador como pueden ser DMAPP, GPP, GGPP y el FPP (Archer y Audley, 1987; Cornish, 1993; Cornish y Siler, 1995).

La secuencia proteica de CPT de guayule identificada en este trabajo, se encontró mayormente expresada en invierno que en verano en el estado de San Luis Potosí. Cornish, 2003 mencionan que la actividad de esta proteína es estimulada por bajas temperaturas, lo cual coincide con nuestros resultados.

Las CPTs que se han identificado en los diversos organismos, poseen cinco regiones altamente conservadas (Nguyen *et al.*, 2017). Los cambios de

aminoácidos dentro o cerca de estas regiones conservadas parecen ser importantes para determinar la longitud del producto de la cadena de poliisopreno sintetizada por las enzimas CPTs (Kharel *et al.*, 2006). En *H. brasiliensis* se han identificado 11 proteínas CPTs y en *T. breviculatum*, se han identificado 3 (Lau *et al.*, 2016; Schmidt *et al.*, 2010a; Schmidt *et al.*, 2010b y Tang *et al.*, 2016). Para el caso de guayule Ponciano *et al.*, (2012), en su estudio del transcriptoma de guayule, identificaron 4 secuencias de proteínas deducidas del tipo CPTs, similares a *H. brasiliensis*. En nuestro trabajo solo pudimos identificar por homología en secuencia de aminoácidos, 1 proteína CPT, la cual presenta mayor homología con la CPT 1 de *H. brasiliensis*, además de que se identificó una de las cinco regiones altamente conservadas entre las CPTs correspondiente a la región 5.

Tabla 4. Descripción de proteínas identificadas en la biosíntesis del IPP.

Unigen (Transcriptoma de <i>Parthenium argentatum</i>)	Identificación en Uniprot	Identificación en TAIR (Recurso de Información de Arabidopsis)	Nombre	Índice de abundancia de expresión diferencial en Durango		Índice de abundancia de expresión diferencial en San Luis Potosí		Especie
				Invierno/ Verano	Verano/ Invierno	Invierno/ Verano	Verano/ Invierno	
UN008769	A0A103XI64	AT2G45340	3-hidroxi-3- metilglutaril CoA reductasa	12.349	0.081	4.513	0.222	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>/Cynara cardunculus</i> <i>var. Scolymus</i>
UN030060	A0A103XLZ3	AT5G48230	Acetoacetyl- CoA tiolasa 2	12.321	0.081	2.476	0.404	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>/Cynara cardunculus</i> <i>var. scolymus</i>
UN037293	A0A1V0EM44	AT5G49460	3-hidroxi-3- metilglutaril CoA sintasa	5.865	0.17	1.679	0.595	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>/Taraxacum</i> <i>brevicorniculatum</i>
UN038106	F4K0E8	AT5G60600	4-hidroxi-3- metilbut-2-enil difosfato sintasa	3.553	0.281	1.644	0.608	<i>Arabidopsis thaliana</i> / <i>Taraxacum kok-</i> <i>saghyz</i>
O24241	O24241	AT5G47770	Farnesil pirofosfato sintasa	-	-	1.238	0.808	<i>Arabidopsis thaliana</i> / <i>Parthenium</i> <i>argentatum</i>

Tabla 5. Descripción de proteínas identificadas en el complejo de la partícula de hule.

Unigen (Transcriptoma de <i>Parthenium argentatum</i>)	Identificación en Uniprot	Identificación en TAIR (Recurso de Información de Arabidopsis)	Nombre	Índice de abundancia de expresión diferencial en Durango		Índice de abundancia de expresión diferencial en San Luis Potosí		Especie
				Invierno/ Verano	Verano/ Invierno	Invierno/ Verano	Verano/ Invierno	
UN023765	Q719L3	AT3G05500	Homólogo de la pequeña partícula de hule en guayule (GHS)	3.854	0.259	1.69	0.592	<i>Parthenium argentatum/ Arabidopsis thaliana</i>
Q40778	Q40778	AT5G42650	Oxido aleno sintasa (AOS)	3.044	0.329	1.249	0.801	<i>Parthenium argentatum/ Arabidopsis thaliana</i>
UN520719	A0A118K597	AT2G17570	Cis- Preniltransferasa (CPT)	-	-	4.125	0.242	<i>Cynara cardunculus var. Scolymus/ Arabidopsis thaliana</i>

7. Conclusiones

Se desarrolló y estandarizó un protocolo para la extracción de resina y hule de la planta *Parthenium argentatum* utilizando un sistema ASE (Buchi, Speed Extractor E-916).

La concentración de resina, en Durango y San Luis Potosí, para las épocas de verano e invierno no presenta una diferencia significativa caso contrario para el hule ya que este tuvo porcentajes mayores en verano que en invierno.

De acuerdo al número total de proteínas expresadas diferencialmente identificadas, existe mayor cantidad de estas en San Luis Potosí respecto a Durango

De acuerdo al índice de abundancia de proteínas expresadas diferencialmente hay una mayor abundancia de proteínas en la estación de invierno respecto a la de verano en ambos estados de colecta.

De acuerdo al índice de abundancia de proteínas expresadas diferencialmente identificadas, hay una mayor abundancia en Durango respecto a San Luis Potosí.

Se identificaron 5 proteínas de las dos rutas MVA y MEV, 4 de ellas sobre-expresadas en invierno

Se identificaron 3 proteínas sobre-expresadas en invierno relacionadas con la partícula de hule en guayule.

8. Bibliografía

- Agrawal, A. A. y Konno, K. (2009). Latex: a model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 40: 311-331
- Angulo-Sánchez, J. L., De Rodríguez, D. J. y Rodríguez-García, R. (2002). Relationship between guayule biomass production, rubber synthesis, and climatic conditions. *Trends in New Crops and New Uses, Am. Soc. Hort. Sci., Alexandria, VA.* 234-237
- Archer, B., Audley, B., Cockbain, E. y McSweeney, G. (1963). The biosynthesis of rubber. Incorporation of mevalonate and isopentenyl pyrophosphate into rubber by *Hevea brasiliensis*-latex fractions. *Biochemical Journal.* 89(3): 565
- Backhaus, R. A., Cornish, K., Chen, S.-F., Huang, D.-S. y Bess, V. H. (1991). Purification and characterization of an abundant rubber particle protein from guayule. *Phytochemistry.* 30(8): 2493-2497
- Backhaus, R. A. y Walsh, S. (1983). The ontogeny of rubber formation in guayule, *Parthenium argentatum* Gray. *Botanical Gazette.* 391-400
- Benedict, C., Goss, R., Foster, M. y Greer, P. J. (2009). The formation of rubber particles in developing cortical parenchyma of *Parthenium argentatum* plants exposed to the low temperatures of fall and winter of the Chihuahuan Desert. *Industrial Crops and Products.* 30(3): 403-406
- Benedict, C., Greer, P. J. y Foster, M. (2008). The physiological and biochemical responses of guayule to the low temperature of the Chihuahuan Desert in the biosynthesis of rubber. *Industrial crops and products.* 27(3): 225-235
- Benedict, C., Rosenfield, C., Gale, M. y Foster, M. The biochemistry and physiology of isopentenyl pyrophosphate incorporation into cis-polyisoprene in guayule plants. En *Biochemistry and Regulation of cis-Polyisoprene in Plants. NSF Sponsored Workshop, College Station, TX, 1986.* 85-105.
- Benedict, H., Brooks, P. y Puckett, R. (1950). The molecular weight of rubber in different parts of the guayule plant. *Plant physiology.* 25(1): 120
- Berthelot, K., Lecomte, S., Estevez, Y., Zhendre, V., Henry, S., Thévenot, J., Dufourc, E., Alves, I. y Peruch, F. (2014). Rubber particle proteins, HbREF and HbSRPP, show different interactions with model membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes,* 1838(1), 287-299.
- Bonner, J. (1943). Effects of temperature on rubber accumulation by the guayule plant. *Botanical Gazette.* 105(2): 233-243
- Bonner, J. Physiology and chemistry of guayule. En *International Conference on the Utilization of Guayule; Proceedings of Meeting, 1975.*
- Canovas, F. M., Dumas-Gaudot, E., Recorbet, G., Jorin, J., Mock, H. P. y Rossignol, M. (2004). Plant proteome analysis. *Proteomics.* 4(2): 285-298
- Cantú, D. J., Angulo-Sánchez, J., Rodríguez-García, R. y Kuruvadi, S. (1997). Seasonal growth, rubber and resin yield characteristics of guayule under natural environmental conditions. *Industrial Crops and Products.* 6(2): 131-137
- Cornish, K. (1993). The separate roles of plant cis and trans prenyl transferases in cis-1, 4-polyisoprene biosynthesis. *European Journal of Biochemistry.* 218(1): 267-271
- Cornish, K. (2001). Similarities and differences in rubber biochemistry among plant species. *Phytochemistry.* 57(7): 1123-1134

- Cornish, K. y Backhaus, R. A. (2003). Induction of rubber transferase activity in guayule (*Parthenium argentatum* Gray) by low temperatures. *Industrial Crops and Products*. 17(2): 83-92
- Cornish, K., Chapman, M. H., Nakayama, F. S., Vinyard, S. H. y Whitehand, L. C. (1999). Latex quantification in guayule shrub and homogenate. *Industrial Crops and Products*. 10(2): 121-136
- Cornish, K., Williams, J., Hall, J. L. y McCoy III, R. G. (2008). Production and Properties of Yulex®-The Natural Solution to Latex Allergy. *Rubber Chemistry and Technology*. 81(4): 709-722
- Chinnusamy, V., Zhu, J.-K. y Sunkar, R. (2010). Gene regulation during cold stress acclimation in plants. *Plant Stress Tolerance: Methods and Protocols*. 39-55
- Chrispeels, M. J. y Herman, E. M. (2000). Endoplasmic reticulum-derived compartments function in storage and as mediators of vacuolar remodeling via a new type of organelle, precursor protease vesicles. *Plant Physiology*. 123(4): 1227-1234
- de Rodríguez, D. J., Angulo-Sánchez, J. y Rodríguez-García, R. (2006a). An overview of guayule research and development in Mexico. *Industrial crops and products*. 24(3): 269-273
- de Rodríguez, D. J., Angulo-Sanchez, J. y Rodriguez-Garcia, R. (2006b). Mexican high rubber producing guayule shrubs: A potential source for commercial development. *Journal of Polymers and the Environment*. 14(1): 37-47
- de Rodriguez, D. J., Sánchez, J. L. A., Godina, F. R., Reza, R. M. y Garcia, R. R. (1993). Productivity and cytogenetic characteristics of guayule. Screening of plants from the Mapimi region. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 70(12): 1229-1234
- Dong, N., Ponciano, G., McMahan, C. M., Coffelt, T. A., Johnson, L., Creelman, R., Whalen M. C y Cornish, K. (2013). Overexpression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in *Parthenium argentatum* (guayule). *Industrial crops and products*, 46, 15-24.
- Estilai, A. y Waines, J. (1990). Improved guayule germplasm for domestic production of natural rubber. *Advances in new crops*. 242-244
- Farmer, E. E., Johnson, R. R., y Ryan, C. A. (1992). Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. *Plant Physiology*, 98(3), 995-1002.
- Ge, P., Hao, P., Cao, M., Guo, G., Lv, D., Subburaj, S., Li, X., Yan, X., Xiao, J., et al. (2013). iTRAQ-based quantitative proteomic analysis reveals new metabolic pathways of wheat seedling growth under hydrogen peroxide stress. *Proteomics*. 13(20): 3046-3058
- George, P. y Jacob, C. K. (2000). Natural rubber agromanagement and crop processing.
- Goss, R. A., Benedict, C. R., Keithly, J. H., Nessler, C. L. y Stipanovic, R. D. (1984). cis-Polyisoprene synthesis in guayule plants (*Parthenium argentatum* Gray) exposed to low, nonfreezing temperatures. *Plant physiology*. 74(3): 534-537
- Gronover, C. S., Prüfer, D., Pütter, K. M., Unland, K., y van Deenen, N. (2017). Isoprenoid biosynthesis in dandelion latex is enhanced by the overexpression of three key enzymes involved in the mevalonate pathway. *BMC plant biology*, 17(1), 88.
- Hamilton, R. G. y Cornish, K. (2010). Immunogenicity studies of guayule and guayule latex in occupationally exposed workers. *Industrial Crops and Products*. 31(1): 197-201
- Hammond, B. L. y Polhamus, L. G. (1965). Research on guayule (*Parthenium argentatum*), 1942-1959. Vol. ed. US Department of Agriculture.
- Hausser, J., Syed, A. P., Selevsek, N., Van Nimwegen, E., Jaskiewicz, L., Aebersold, R. y Zavolan, M. (2013). Timescales and bottlenecks in miRNA-dependent gene regulation. *Molecular systems biology*. 9(1): 711

- Healey, P. y Mehta, I. (1986). Cell growth and rubber accumulation in guayule stems. En *Biochemistry and Regulation of cis-Polyisoprene in Plants*. (Eds.). ed. Vol. NSF Sponsored Workshop College Station, TX. pp. 119-128
- Herman, E. y Schmidt, M. (2004). Endoplasmic reticulum to vacuole trafficking of endoplasmic reticulum bodies provides an alternate pathway for protein transfer to the vacuole. *Plant physiology*. 136(3): 3440-3446
- Hosfield, D. J., Zhang, Y., Dougan, D. R., Broun, A., Tari, L. W., Swanson, R. V. y Finn, J. (2004). Structural basis for bisphosphonate-mediated inhibition of isoprenoid biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*. 279(10): 8526-8529
- Hulsen, T., de Vlieg, J. y Alkema, W. (2008). BioVenn – a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams. *BMC Genomics*. 9(1): 488
- Huttlin, E. L., Jedrychowski, M. P., Elias, J. E., Goswami, T., Rad, R., Beausoleil, S. A., Villén, J., Haas, W., Sowa, M. E., *et al.* (2010). A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression. *Cell*. 143(7): 1174-1189
- Ji, W., Benedict, C. R. y Foster, M. A. (1993). Seasonal variations in rubber biosynthesis, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, and rubber transferase activities in *Parthenium argentatum* in the Chihuahuan desert. *Plant physiology*. 103(2): 535-542
- Kajiura, H., Suzuki, N., Mouri, H., Watanabe, N. y Nakazawa, Y. (2017). Elucidation of rubber biosynthesis and accumulation in the rubber producing shrub, guayule (*Parthenium argentatum* Gray). *Planta*. 1-14
- Kharel, Y., Takahashi, S., Yamashita, S., y Koyama, T. (2006). Manipulation of prenyl chain length determination mechanism of cis-prenyltransferases. *The FEBS journal*, 273(3), 647-657.
- Kim, I. J., Ryu, S. B., Kwak, Y. S. y Kang, H. (2004). A novel cDNA from *Parthenium argentatum* Gray enhances the rubber biosynthetic activity in vitro*. *Journal of experimental botany*. 55(396): 377-385
- Kirby, J., y Keasling, J. D. (2009). Biosynthesis of plant isoprenoids: perspectives for microbial engineering. *Annual review of plant biology*, 60, 335-355.
- Kosová, K., Vítámvás, P., Prášil, I. T. y Renaut, J. (2011). Plant proteome changes under abiotic stress—contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of proteomics*. 74(8): 1301-1322
- Kuruvadi, S., Benitez, A. L. y de Rodríguez, D. J. (1997). Rubber and resin contents of native guayule germplasm of Mexico. *Industrial Crops and Products*. 6(2): 139-145
- Laibach, N., Hillebrand, A., Twyman, R. M., Prüfer, D. y Schulze Gronover, C. (2015). Identification of a *Taraxacum brevicorniculatum* rubber elongation factor protein that is localized on rubber particles and promotes rubber biosynthesis. *The Plant Journal*. 82(4): 609-620
- Lan, P., Li, W., Wen, T.-N. y Schmidt, W. (2012). Quantitative phosphoproteome profiling of iron-deficient *Arabidopsis* roots. *Plant physiology*. 159(1): 403-417
- Lau, N. S., Makita, Y., Kawashima, M., Taylor, T. D., Kondo, S., Othman, A. S., Shu-Chein, A y Matsui, M. (2016). The rubber tree genome shows expansion of gene family associated with rubber biosynthesis. *Scientific reports*, 6, 28594.
- Li, Z., Adams, R. M., Chourey, K., Hurst, G. B., Hettich, R. L. y Pan, C. (2012). Systematic comparison of label-free, metabolic labeling, and isobaric chemical labeling for quantitative proteomics on LTQ Orbitrap Velos. *Journal of proteome research*. 11(3): 1582-1590
- Liang, P.-H. (2009). Reaction kinetics, catalytic mechanisms, conformational changes, and inhibitor design for prenyltransferases. *Biochemistry*. 48(28): 6562-6570

- Lu, Y.-P., Liu, H.-G., Teng, K.-H. y Liang, P.-H. (2010). Mechanism of cis-prenyltransferase reaction probed by substrate analogues. *Biochemical and biophysical research communications*. 400(4): 758-762
- Macrae, S., Gilliland, M. G. y Van Staden, J. (1986). Rubber production in guayule: determination of rubber producing potential. *Plant physiology*. 81(4): 1027-1032
- Madhavan, S., Greenblatt, G. A., Foster, M. A. y Benedict, C. R. (1989). Stimulation of isopentenyl pyrophosphate incorporation into polyisoprene in extracts from guayule plants (*Parthenium argentatum* Gray) by low temperature and 2-(3, 4-dichlorophenoxy) triethylamine. *Plant physiology*. 89(2): 506-511
- Megger, D. A., Pott, L. L., Ahrens, M., Padden, J., Bracht, T., Kuhlmann, K., Eisenacher, M., Meyer, H. E. y Sitek, B. (2014). Comparison of label-free and label-based strategies for proteome analysis of hepatoma cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 1844(5): 967-976
- Mehta, I. J. (1982). Stem anatomy of *Parthenium argentatum*, *P. incanum* and their natural hybrids. *American Journal of Botany*. 502-512
- Nguyen, N. Q., Lee, S. C., Yang, T. J., y Lee, O. R. (2017). cis-Prenyltransferase interacts with a Nogo-B receptor homolog for dolichol biosynthesis in *Panax ginseng* Meyer. *Journal of Ginseng Research*.
- Ow, S. Y., Salim, M., Noirel, J., Evans, C. y Wright, P. (2011). Minimising iTRAQ ratio compression through understanding LC-MS elution dependence and high-resolution HILIC fractionation. *Proteomics*. 11(11): 2341-2346
- Pan, C., Kora, G., McDonald, W. H., Tabb, D. L., VerBerkmoes, N. C., Hurst, G. B., Pelletier, D. A., Samatova, N. F. y Hettich, R. L. (2006). ProRata: a quantitative proteomics program for accurate protein abundance ratio estimation with confidence interval evaluation. *Analytical chemistry*. 78(20): 7121-7131
- Pan, Z., Durst, F., Werck-Reichhart, D., Gardner, H. W., Camara, B., Cornish, K. y Backhaus, R. A. (1995). The major protein of guayule rubber particles is a cytochrome P450 characterization based on cDNA cloning and spectroscopic analysis of the solubilized enzyme and its reaction products. *Journal of Biological Chemistry*. 270(15): 8487-8494
- Pearson, C., Cornish, K. y Rath, D. (2013). Extraction of natural rubber and resin from guayule using an accelerated solvent extractor. *Industrial crops and products*. 43: 506-510
- Reddy, A. R. y Das, V. R. (1988). Enhanced rubber accumulation and rubber transferase activity in guayule under water stress. *Journal of plant physiology*. 133(2): 152-155
- Salvucci, M. E., Coffelt, T. A. y Cornish, K. (2009). Improved methods for extraction and quantification of resin and rubber from guayule. *Industrial crops and products*. 30(1): 9-16
- Sando, T., Takeno, S., Watanabe, N., Okumoto, H., Kuzuyama, T., Yamashita, A., Hattori, M., Owasawara, N., Fukusaki, E. y Kobayashi, A. (2008). Cloning and characterization of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway genes of a natural-rubber producing plant, *Hevea brasiliensis*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 72(11), 2903-2917.
- Schloman, W. W., Carlson, D. W. y Hilton, A. S. (1988). Guayule extractables: influence of extraction conditions on yield and composition. *Biomass*. 17(4): 239-249
- Schmidt, T., Hillebrand, A., Wurbs, D., Wahler, D., Lenders, M., Gronover, C. S., y Prüfer, D. (2010). Molecular cloning and characterization of rubber biosynthetic genes from *Taraxacum koksaghyz*. *Plant molecular biology reporter*, 28(2), 277-284.

- Schmidt, T., Lenders, M., Hillebrand, A., van Deenen, N., Munt, O., Reichelt, R., Eisenreich, W., Fischer, R., y Gronover C. S. (2010). Characterization of rubber particles and rubber chain elongation in *Taraxacum koksaghyz*. *BMC biochemistry*, 11(1), 11.
- Shi, J., Chen, Y., Xu, Y., Ji, D., Chen, C. y Xie, C. (2017). Differential Proteomic Analysis by iTRAQ Reveals the Mechanism of *Pyropia haitanensis* Responding to High Temperature Stress. *Scientific Reports*. 7: 44734
- Siler, D. J. y Cornish, K. (1994). Hypoallergenicity of guayule rubber particle proteins compared to *Hevea latex* proteins. *Industrial Crops and Products*. 2(4): 307-313
- Siler, D. J., Cornish, K. y Hamilton, R. G. (1996). Absence of cross-reactivity of IgE antibodies from subjects allergic to *Hevea brasiliensis* latex with a new source of natural rubber latex from guayule (*Parthenium argentatum*). *Journal of allergy and clinical immunology*. 98(5): 895-902
- Sirinupong, N., Suwanmanee, P., Doolittle, R. F. y Suvachitanont, W. (2005). Molecular cloning of a new cDNA and expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene from *Hevea brasiliensis*. *Planta*. 221(4): 502-512
- Skinner, D. Z. (2015). Genes upregulated in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) during mild freezing and subsequent thawing suggest sequential activation of multiple response mechanisms. *PloS one*. 10(7): e0133166
- Sola, M. Á. R. y Águila, M. 2014. Canalización de precursores hacia la biosíntesis de isoprenoides plastídicos en *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Universitat de Barcelona.
- Suchat, S., Pioch, D., Palu, S., Tardan, E., Van Loo, E. N. y Davrieux, F. (2013). Fast determination of the resin and rubber content in *Parthenium argentatum* biomass using near infrared spectroscopy. *Industrial crops and products*. 45: 44-51
- Sundar, D. y Ramachandra Reddy, A. (2000). Low Night Temperature-Induced Changes in Photosynthesis and Rubber Accumulation in Guayule (*Parthenium Argentatum* Gray). *Photosynthetica*. 38(3): 421-427
- Suwanmanee, P., Sirinupong, N., y Suvachittanont, W. (2012). Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and rubber biosynthesis of *Hevea brasiliensis* (BHK) Mull. Arg. In *Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms* (pp. 315-327). Springer New York.
- Tang, C., Yang, M., Fang, Y., Luo, Y., Gao, S., Xiao, X., Zewei, A., Binhui, Z., Bing, Z., Xinyu, T., Yet, Y.H., Yunxia, Q., Jianghua, Y., Qiang, L., Hailiang, M., Pascal, M., Xiangyu, L., Jiyang, Q., Yuwei, H., Zilong, H., Min, S., Wenjie, L., Xia, Z., y Yeang, H. Y. (2016). The rubber tree genome reveals new insights into rubber production and species adaptation. *Nature plants*.
- Tarshis, L. C., Proteau, P. J., Kellogg, B. A., Sacchettini, J. C. y Poulter, C. D. (1996). Regulation of product chain length by isoprenyl diphosphate synthases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93(26): 15018-15023
- Teetor, V., Ray, D. y Schloman, W. (2009). Evaluating chemical indices of guayule rubber content: Guayulins A and B. *industrial crops and products*. 29(2): 590-598
- Thompson, A. E. y Ray, D. T. (1989). Breeding guayule. *Plant Breeding Reviews*, Volume 6. 93-165
- Thurbide, K. B. y Hughes, D. M. (2000). A rapid method for determining the extractives content of wood pulp. *Industrial & engineering chemistry research*. 39(8): 3112-3115
- van Beilen, J. B. y Poirier, Y. (2007). Establishment of new crops for the production of natural rubber. *Trends in biotechnology*. 25(11): 522-529
- Veatch-Blohm, M., Ray, D. y Gehrels, A. (2007). Night temperature, rubber production, and carbon exchange in guayule. *Industrial Crops and Products*. 25(1): 34-43

- Veatch-Blohm, M. E., Ray, D. T. y McCloskey, W. B. (2006). Water-stress-induced changes in resin and rubber concentration and distribution in greenhouse-grown guayule. *Agronomy journal*. 98(3): 766-773
- Venkatachalam, P., Priya, P., Amma, C. S. y Thulaseedharan, A. (2004). Identification, cloning and sequence analysis of a dwarf genome-specific RAPD marker in rubber tree [*Hevea brasiliensis* (Muell.) Arg.]. *Plant cell reports*. 23(5): 327-332
- Vick, B. A. (1993). Oxygenated fatty acids of the lipoxygenase pathway. *Lipid metabolism in plants*, 167-191.
- Wang, G. Y., y Keasling, J. D. (2002). Amplification of HMG-CoA reductase production enhances carotenoid accumulation in *Neurospora crassa*. *Metabolic engineering*, 4(3), 193-201.
- Wood, D. F. y Cornish, K. (2000). Microstructure of purified rubber particles. *International journal of plant sciences*. 161(3): 435-445
- Xia, Q., Hendrickson, E. L., Wang, T., Lamont, R. J., Leigh, J. A. y Hackett, M. (2007). Protein abundance ratios for global studies of prokaryotes. *Proteomics*. 7(16): 2904-2919
- Yang, Y., Qiang, X., Owsiany, K., Zhang, S., Thannhauser, T. W. y Li, L. (2011). Evaluation of different multidimensional LC-MS/MS pipelines for isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ)-based proteomic analysis of potato tubers in response to cold storage. *Journal of proteome research*. 10(10): 4647-4660