

Expresión de una α -expansina implicada en la maduración del fruto de guayaba (*Psidium guajava* L.)

Expression of an α -expansin involved in guava (*Psidium guajava* L.) fruit ripening

José Francisco Morales Domínguez^{1*}, Ruth Elena Soria Guerra²,
Ángel Gabriel Alpuche Solís³, Cristina Garcidueñas Piña¹

Morales Domínguez, J. F.; Soria Guerra, R. E.; Alpuche Solís, A. G.; Garcidueñas Piña, C., Expresión de una α -expansina implicada en la maduración del fruto de guayaba (*Psidium guajava* L.). *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. 58, 5-11, 2013.

RESUMEN

El segmento parcial de un cDNA designado como *PgEXP1*, codificante para un homólogo de expansinas, fue aislado y caracterizado de fruto maduro de guayaba (*Psidium guajava* L.). El análisis bioinformático reveló que *PgEXP1* contiene parte de los dos dominios característicos de las α -expansinas. Asimismo, el árbol filogenético mostró gran relación con la α -expansina de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) que es específica de la maduración de este fruto. Los estudios de expresión mediante RT-PCR, realizados en diferentes tejidos de la planta y en el estado ocho de maduración del fruto, demostraron que la expresión sólo es en fruto maduro. Mediante Northern blot se analizó la expresión en ocho estados diferentes de maduración del fruto, que se encontró principalmente en los últimos tres estados. Esta investigación demuestra que *PgEXP1* es específico de la maduración del fruto de guayaba.

Palabras clave: *Psidium guajava* L., *Solanum lycopersicum* L., α -expansinas, maduración, homólogo, expresión.

Keywords: *Psidium guajava* L., *Solanum lycopersicum* L., α -expansins, ripening, homologous, expression.

Recibido: 21 de Noviembre de 2012, aceptado: 1 de Febrero de 2013

¹ Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes.

² Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

³ Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.

* Autor para correspondencia: jfmoral@correo.uaa.mx

ABSTRACT

The partial segment of a cDNA, designated *PgEXP1*, coding for a homologue of expansins, was isolated and characterized from ripe guava fruit (*Psidium guajava* L.). The bioinformatics analysis revealed that *PgEXP1* contains part of two domains characteristic of the α -expansins. Also, the phylogenetic tree shows a great relationship with the α -expansin of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) which is specific for fruit ripening. Expression studies by RT-PCR performed in different tissues of the plant and fruit ripening of eight states, showed that the expression is only in ripe fruit. Expression in eight different states of ripeness was analyzed by Northern blot and found mainly in the last three states. The analysis of these results shows that the *PgEXP1* is specific for guava fruit ripening.

INTRODUCCIÓN

Durante la maduración de frutos ocurren cambios fisiológicos, bioquímicos y estructurales. Entre estos destacan la producción de azúcares solubles, síntesis de pigmentos y compuestos volátiles, e hidrólisis de polisacáridos de almacenamiento (BenNET, 2002); en consecuencia, el fruto sufre un ablandamiento que determina la calidad y vida después de la cosecha (Nishiyama *et al.*, 2007). El ablandamiento se debe en gran medida al desembalaje de los componentes de la pared celular primaria, y provoca principalmente la despolimerización y solubilización de polisacáridos como pectinas y hemicelulosas. Así, durante el proceso de maduración hay una alta expresión

de genes específicos, proteínas y actividades enzimáticas asociadas con la hidrólisis de la pared celular (Giovannoni, 2004).

Existen proteínas y enzimas relacionadas en la modificación de la pared celular, como las poligaracturonasas (PGs) que contribuyen a la modificación de la pectina y el desembalaje, y las endoglucanasas (EGs) relacionadas con el inicio de la maduración y ablandamiento de muchos frutos (Libertini *et al.*, 2004). Sin embargo, en plantas transgénicas de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.), donde se expresan los genes alterados de PG y EG, los frutos muestran un ablandamiento normal, lo que sugiere que la expresión de un sólo gen relacionado con la pared celular es insuficiente para ocasionar los efectos del ablandamiento (Hiwasa *et al.*, 2003).

La maduración del fruto requiere múltiples enzimas que actúen sinérgicamente al modificar la pared celular; una clase de proteínas, llamadas expansinas, actúa primero sobre la pared celular, promueve el ablandamiento y la extensión de la pared, y permite que enzimas específicas ejerzan su actividad (Cosgrove *et al.*, 2002). En estudios con células *in vitro*, las expansinas inducen la modificación de la pared celular de manera dependiente de pH, pero no hay actividad de hidrolasas o transglicolasas. Estas proteínas están conformadas por una gran familia de genes y están divididas en varias subfamilias: α -expansinas (EXPA), β -expansinas (EXPB), γ -expansinas, δ -expansinas y las parecidas a las α (EXPLA) y las parecidas a β (EXPLAB).

Las expansinas son importantes en el alargamiento celular, abscisión, germinación, respuesta a estrés, parasitismo, mediadores de acción hormonal y en el ablandamiento del tejido del fruto (Choi *et al.*, 2006). En este último proceso, las expansinas son diferencialmente reguladas y la expresión de algunos genes está correlacionada con el aumento en el tamaño del fruto, mientras que otros genes se incrementan en el proceso de maduración, como en tomate, fresa (*Fragaria x ananassa* L.) y pera (*Pyrus communis* L.) (Civello *et al.*, 1999; Harrison *et al.*, 2001; Dotto *et al.*, 2006). Estas investigaciones muestran que varios genes de expansinas se expresan en diferentes estados de maduración y otros actúan en órganos específicos; por ejemplo, una expansina (*LeEXP1*) específica de la maduración del fruto del jitomate exhibe muchos RNA mensajeros

(Rose *et al.*, 1997); además, se han identificado muchos cDNAs relacionados con *LeEXP1* durante la maduración; por ejemplo, en melón (*Cucumis melo* L.) y fresa, que muestran la característica de un rápido ablandamiento durante el proceso de maduración (Dotto *et al.*, 2006).

El fruto de guayaba (*Psidium guajava* L.) es climatérico con sobremaduración en poscosecha, lo que repercute en grandes pérdidas económicas para los productores. Los estudios bioquímicos de la maduración en este fruto muestran, pérdida de firmeza y ablandamiento en corto tiempo, coincidente con la despolimerización de la pared celular ocasionada por enzimas como poligaracturonasa, celulasa y pectina metil esterase (Jain *et al.*, 2001a; Jain *et al.*, 2003b). Sin embargo, hay pocos estudios moleculares sobre la actividad de estas enzimas y en especial de expansinas que podrían estar implicadas durante la maduración del fruto de guayaba. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar un gen de una α -expansina y analizar su expresión en diferentes órganos de la planta y en ocho diferentes estados de maduración del fruto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Frutos de guayaba var. Media China de la selección 126, así como hojas, tallos y raíces fueron colectados de un único árbol, del banco de germoplasma Campo experimental Los cañones del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), que se localiza a 21° 45' N; 102° 58' W y 1500 msnm en el estado de Zacatecas, México. Las muestras de fruto fueron clasificadas con base en la caracterización visual de firmeza y pigmentación, en ocho estados de maduración. Las muestras de hojas, tallos y raíces fueron recolectadas del mismo árbol e inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C hasta su uso.

Extracción de ARN y amplificación mediante RT-PCR

La extracción de RNA total de las muestras se realizó siguiendo el protocolo del fabricante RNA reagent (Invitrogen™). El RNA total de muestras de fruto y de tejido vegetativo de raíz, tallo y hoja se usó para sintetizar la primera cadena de ADNc con la enzima AMV reverse transcriptase first-strand cDNA synthesis kit (Invitrogen™), y subsecuente fueron utilizadas como molde para la amplificación por PCR. Los oligonucleótidos utilizados

fueron: 5'gcatgctacatftttacggg y 3'aattgggga-caaaattggcaa; para la amplificación se utilizó el propuesto por Rose *et al.* (1997). Se utilizaron 0.5 µg de ADNc por 40 ciclos (94 °C por 1 min, 50 °C por 1 min, y 72 °C por 3 min) en el termociclador Corbett research. El fragmento amplificado fue purificado mediante el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (ZIMO), y posteriormente clonado en el vector pGEM-easy (Promega). El fragmento fue enviado al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGE BIO) para su secuenciación.

Análisis bioinformático de la secuencia del cDNA

La secuencia de nucleótidos (PgEXPA1) fue traducida a aminoácidos mediante el servidor <http://expasy.org/proteomics>; posteriormente se realizó una búsqueda de similitud mediante BLAST, herramienta de búsqueda básica mediante alineamiento global (Altschul *et al.*, 1990), en el sitio web de la NCBI. El árbol filogenético fue generado a partir de la secuencia deducida de aminoácidos de PgEXPA1 y 30 expansinas homólogas de otras plantas con el programa de alineamiento múltiple ClustalW2 del website del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI), por medio del método de UPGMA basado en el porcentaje de identidad de las secuencias, con la indicación en cada rama del árbol de la distancia media (Larkin *et al.*, 2007). El número de acceso de las secuencias que se analizaron registradas en el GenBank son: durazno (*Prunus persica* L.), PpEXPA1 (BAC66787.1); arroz (*Oryza sativa* L.), EXPA3_ORYSJ (Q40637.2), EXB15_ORYSJ (Q7XT40.2), EXLA2_ORYSJ (Q7XCLO), EXLB1_ORYSJ (Q850K7.2) y EXPB2_ORYSJ (O24230); tomate, LeEXP1 (AAC63088); *Arabidopsis thaliana*, expansinA6 (NP_180461.1A6), EXPB2_ARATH (Q9SHY6.2), EXLA1_ARATH (Q9LZT4.1) y EXLB1_ARATH (O23547.2); maíz (*Zea mays* L.), beta-expansin 1 (ZmEXPB; AAK56124.1); pepino (*Cucumis sativus* L.), expansin S1 precursor (EXPS1pre_CS; AAB37746.1), expansin S2 precursor (EXPS2pre_CS; AAB37749.1) y *Dictyostelium discoideum*: Dicdi (XP_647352.1). La identificación de los dominios conservados de la secuencia putativa de aminoácidos se realizó en el servidor de PROSITE (De Castro *et al.*, 2006).

Análisis tipo Northern blot

Se extrajo RNA total de los ocho estados de maduración de fruto de acuerdo al protocolo del fabricante RNA Reagent (Invitrogen). Se analizaron muestras de 30 µg de RNA por electroforesis en geles de agarosa al 1.2% (w/w) y en geles desnaturalizantes de formaldehído al 1%. Dichos geles se transfirieron a membranas Hybond-N (Amersham-Pharmacia Biotech). El marcaje de PgEXPA1 y la

hibridación de la membrana fueron acordes al protocolo de Alkaphos (GE, Healthcare). La membrana fue expuesta 2 h a película de rayos X (X-OMATAR, Kodak™) a temperatura ambiente. La película fue revelada con los reactivos de revelado y fijador de Kodak™.

RESULTADOS

Los resultados de este estudio revelaron la presencia de un fragmento de aproximadamente 885 pb sólo en fruto; para tallo, raíz y hoja no se detectó señal (Figura 1A). Como testigo de este análisis se llevó a la par un RT-PCR con oligonucleótidos dirigidos para genes de actina. Se detectó la banda correspondiente en todos los tejidos analizados (Figura 1B).

Análisis bioinformático

La secuenciación parcial del cDNA de fruto maduro reveló una longitud de 885 pb. El análisis de nucleótidos en la base de datos del GenBak mostró que el fragmento aislado tiene alto grado de homología con otros genes de expansinas de plantas. La secuencia parcial del cDNA fue designada como PgEXPA1 y con número de acceso a la base de datos de FJ744120.

La proteína deducida de PgEXPA1 presenta parte de los dos dominios conservados de las expansinas; un dominio parecido al de la familia de las 45 endoglucanasas (Expansin_EG45) porque muestra cuatro residuos de cisteínas (C) y el mo-

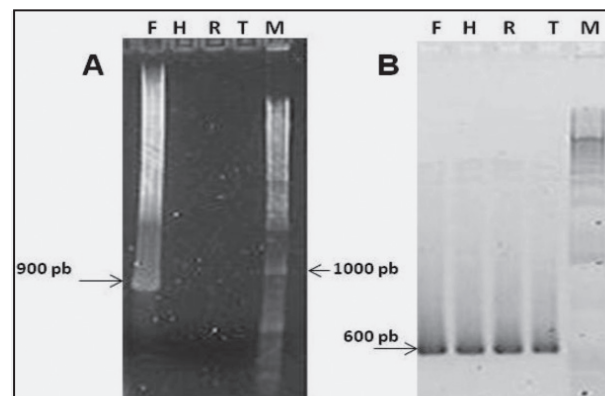


Figura 1. Análisis de la expresión de PgEXPA1 mediante RT-PCR en diferentes tejidos de guayaba. **A.** F) fruto maduro estado 8, H) hoja, R) raíz, T) tallo y M) marcador peso molecular 1 Kb. **B.** Expresión para genes de actina en diferentes tejidos de guayaba. F) Fruto maduro estado 8, H) hoja, R) raíz, T) tallo y M) marcador peso molecular 1 Kb.

tivo HFD, y el otro dominio hacia el extremo del carboxilo terminal (Expansin_CBD), donde están presentes residuos de triptófano (W) (Figura 2).

El alineamiento múltiple de la secuencia deducida de aminoácidos de PgEXPA1 con diferentes secuencias de aminoácidos de expansinas mostró un rango de homología desde 65% hasta 90%, mostrando la mayor homología con la LeEXP1. A partir de este alineamiento, se generó un árbol filogenético que muestra cuatro grupos diferentes de las expansinas; indicó que la PgEXP1 está clasificada dentro del grupo de las α -expansinas, quedó fuera del grupo la secuencia de *Dictyostelium discoideum* (Dicdi) clasificada como una proteína que contiene un dominio parecido a las expansinas pero no tiene función biológica de expansina (Figura 3).

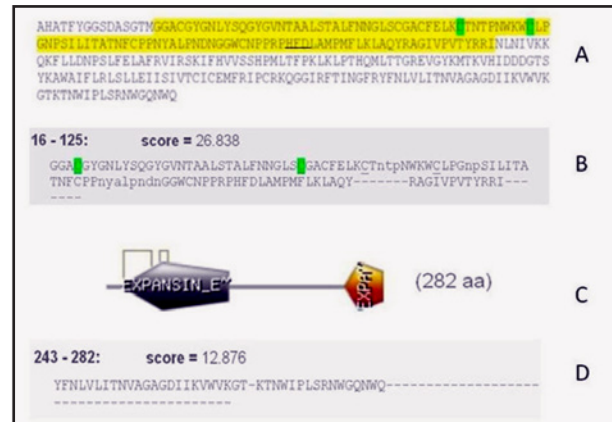


Figura 2. Dominios conservados de las expansinas. A. Secuencia parcial deducida de la PgEXPA1, donde se marca el motivo conservado HFD, B. Dominio parecido a la EG45; en verde se presentan dos de los residuos de Cisteína, C. Esquema de los dos dominios de PgEXPA1, D. Secuencia parcial del dominio de unión a polisacáridos (PROSITE).

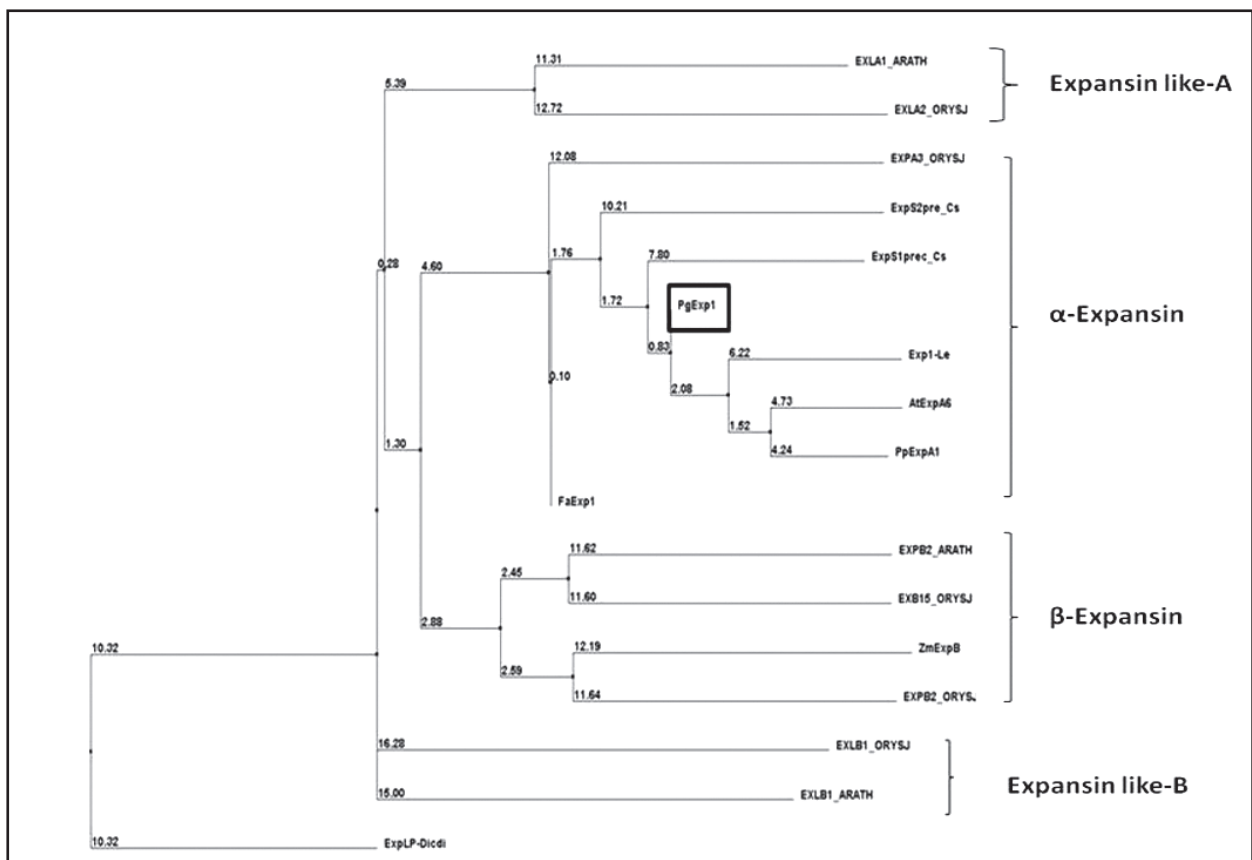


Figura 3. Árbol filogenético con 14 secuencias correspondiente a la secuencia de aminoácidos de expansinas y la secuencia deducida de PgEXP1. Como control externo se incluyó la expansina (Dicdi). El árbol filogenético se generó mediante el programa de Clustal W2 (Larkin et al., 2007) y las secuencias de aminoácidos se describen en la sección de metodología. Las diferentes secuencias pertenecen a la superfamilia de expansinas que fueron agrupadas en cuatro diferentes familias; " α -expansinas, β -expansinas, expansinas parecidas a α y β -expansinas" (Sampedro y Cosgrove, 2005), donde PgEXP1 fue incluido en la familia de α -expansinas. Cada rama indica la distancia media basada en el porcentaje de identidad de secuencia.

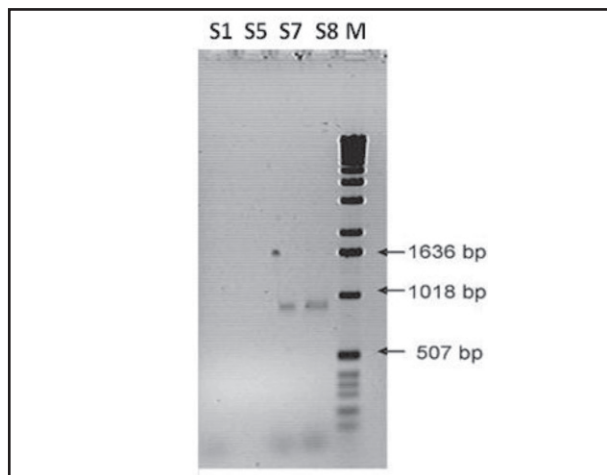


Figura 4. Análisis de la expresión mediante RT-PCR de *PgEXPA1* en cuatro diferentes estados de desarrollo del fruto de guayaba. S1 y S5 son los estados verdes de maduración, S7 y S8 son los estados de fruto maduro.

Análisis de la expresión

Para verificar que la expresión de *PgEXPA1* es en fruto maduro, se realizó un RT-PCR, tomando los estados verdes del fruto (S1 y S5) y los dos últimos (S7 y S8); este análisis indicó la expresión en los estados S7 y S8 (Figura 4). Tomando en cuenta lo anterior, se realizó un análisis tipo Northern blot en los ocho estados de maduración del fruto y se mostró que *PgEXPA1* tiene una expresión en los últimos tres estados: premaduro (S6), maduro (S7) y sobremaduro (S8) (Figura 5).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos son muy similares a los de Rose *et al.* (1997), quienes reportaron la identificación de una expansina específica de la maduración del fruto de tomate (*LeEXP1*), que exhibe altos niveles de ARNm en este estado. Los oligonucleótidos utilizados en este estudio se diseñaron con base en los propuestos por Rose *et al.* (1997), pero la secuencia de nucleótidos fue de acuerdo a la serie reportada del gen *LeEXP1*, por lo cual se deduce la identificación de una expansina específica de maduración en guayaba.

Según estudios bioinformáticos, las expansinas son codificadas por miembros de una familia multigénica, que constan de tres dominios conservados: un péptido señal en el extremo amino terminal, un dominio que se postula de unión a polisacáridos (CBD; por las siglas en inglés) hacia el carboxilo terminal, y un dominio central pare-

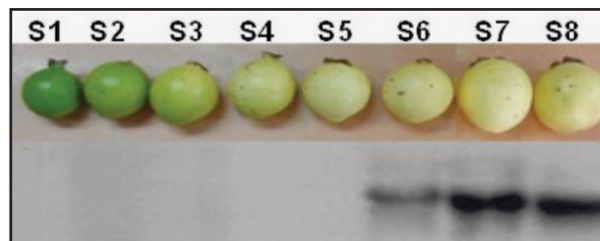


Figura 5. Análisis por Northern blot de *PgEXPA1* en diferentes estados de maduración del fruto de guayaba. En los últimos tres estados de maduración, se observa una fuerte expresión del gen.

cido al de la familia de las 45 endoglucanasas (EG45) que contiene un motivo histidina-fenilalanina-aspartato (HFD) y varios residuos de cisteínas (C) que se cree funcionan en la actividad catalítica (Cosgrove *et al.*, 2002).

PgEXPA1 sólo muestra dos de estos dominios, ya que la región de amplificación no abarcó el extremo del amino terminal completo, donde está presente el péptido señal; sin embargo, tiene parte de los dos dominios característicos presentes en muchas α -expansinas. Choi *et al.* (2006) indican que la mayoría de las α -expansinas contienen ocho residuos de C en el extremo amino terminal, cuatro residuos de triptófano (W) hacia el carboxilo terminal y el motivo HDF en la región central.

Una de las características principales de la *LeEXP1* es que exhibe alta acumulación de ARNm durante el estado climatérico del fruto del tomate y lo hace específico de este estado; en lo que respecta a *PgEXPA1*, también fue identificado en el estado maduro de guayaba, lo que demuestra que es específica de esta etapa (Figura 5). En diferentes estudios de la expresión mediante Northern blot y de hibridación *in situ*, diversos genes de expansinas son expresados en diferentes órganos, tejidos y tipos de célula y responden distinto a tratamientos hormonales de luz y polinización, así como la programación endógena de desarrollo, mostrando que las expansinas están implicadas en una gran variedad de respuestas al desarrollo y crecimiento, desde germinación y maduración de frutos hasta polinización (Cosgrove *et al.*, 2002).

Para confirmar la expresión específica de las expansinas en la maduración de frutos, Brummell *et al.* (1999) obtuvieron transformantes de tomate

con *LeEXP1*, en las que observaron sobreexpresión y aumento del ablandamiento del fruto y rompimiento de la pared celular. En otros estudios con fresa, pera y durazno, se ha visto la existencia de una familia multigénica de expansinas que se expresan en diferentes órganos de la planta y en las etapas de desarrollo y maduración del fruto (Dotto *et al.*, 2006; Hiwasa *et al.*, 2003). En las fresas y otros frutos, las expansinas muestran diferentes perfiles de expresión durante la maduración del fruto y algunos se presentan en otros tejidos como hoja, raíz, tallo y estolón (Civello *et al.*, 1999; Harrison *et al.*, 2001). Con base en lo anterior, se han postulado tres perfiles de expresión para las expansinas: 1) durante la maduración (*up-down-up*); 2) sin cambios significativos durante la maduración (*down-up-down*), y 3) indetectables durante la maduración (Harrison *et al.*, 2001). Sobre estos datos y con los resultados de expresión mediante Northern blot, se considera que el gen de guayaba pertenece al perfil de expresión 1, al igual que *LeEXPA1*. Estos resultados de expresión de genes específicos también se han observado en otros frutos climatéricos y no climatéricos, como en fresa para los genes *FaEXP2* y *FaEXP 5*, y para pera con *pcEXP1*, que pertenecen al perfil

1 (Dotto *et al.*, 2006; Hiwasa *et al.*, 2003). Por otra parte, Jain *et al.* (2003b), realizaron estudios bioquímicos sobre la presencia y actividad de varias enzimas hidrolíticas de la pared celular en cuatro estados diferentes de maduración del fruto de la guayaba, y coincidieron en que la maduración está acompañada principalmente por el ablandamiento y despolimerización de varios polisacáridos de la pared celular, donde actúan varias enzimas específicas.

CONCLUSIONES

Se identificó y caracterizó una secuencia parcial de ADNc codificante para un homólogo de las α -expansinas. La secuencia de aminoácidos encontrada contiene parte de los dos dominios conservados de las familias de las α -expansinas. La expresión sugiere que es específico de la maduración del fruto, ya que no se expresa en otros órganos de la planta ni en estados iniciales de maduración del fruto, pero sí en las últimas etapas.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes por el apoyo en esta investigación.

LITERATURA CITADA

- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., LIPMAN, D. J., Basic Local Alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410, 1990.
- BENNETT, A., Biochemical and genetic determinants of cell wall disassembly in ripening fruit: A general model. *Hort Science*, 37, 447-450, 2002.
- BRUMMELL, D. A., HARPSTER, M. H., DUNSMUIR, P., Differential expression of expansin gene family members during growth and ripening of tomato fruit. *Plant Molecular Biology*, 39, 161-169, 1999.
- CHOI, D., CHO, H. T., LEE, Y., Expansins: expanding importance in plant growth and development. *Physiologia Plantarum*, 126, 511-518, 2006.
- CIVELLO, P. M., POWELL, A. L., SABEHAT, A., BENNETT, A. D., An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit. *Plant Physiology*, 121, 1273-1279, 1999.
- COSGROVE, D. J., CHAO LI, L., HYUNG-TAEG, C., HOFFMANN-BENNING, S., MOORE, R. C., BLECKER, D., The growing world of expansins. *Plant and Cell Physiology*, 43, 1436-1444, 2002.
- DE CASTRO, E., SIGRIST, C. J. A., GATTIKER, A., BULLIARD, V., LANGENDIJK-GENEVAUX, P. S., GASTEIGER, E., BAIROCH, A., HULO, N., ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Research*, W362-W365, 2006.
- DOTTO, M. C., MARTÍNEZ, G. A., CIVELLO, P. M., Expression of expansin genes in strawberry varieties with contrasting fruit firmness. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44, 301-307, 2006.
- GIOVANNONI, J. J., Genetic Regulation of Fruit Development and Ripening. *The Plant Cell*, 16, S170-S180, 2004.
- HARRISON, E. P., MCQUEEN-MASON, S. J., MANNING, K., Expression of six expansins genes in relation to extension activity in developing strawberry fruit. *Journal of Experimental Botany*, 52, 1437-1446, 2001.

- HIWASA, K., ROSE, J. K. C., NAKANO, R., INABA, A., KUBO, Y., Differential expression of seven α -expansin genes during growth and ripening of pear fruit. *Physiologia Plantarum*, 117, 564-572, 2003.
- JAIN, N., DHAWAN, K., MALHOTRA, S. P., SIDDIQUI, S., SINGH, R., Compositional and enzymatic changes in guava (*Psidium guajava* L.) fruits during ripening. *Acta Physiologiae Plantarum*, 23, 357-362, 2001a.
- JAIN, N., DHAWAN, K., MALHOTRA, S. P., SINGH, R., Biochemistry of Fruit Ripening of Guava (*Psidium guajava* L.): Compositional and Enzymatic Changes. *Plant Foods for Human Nutrition*, 58, 309-315, 2003b.
- LARKIN, M., BLACKSHIELDS, A. G., BROWN, N. P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P. A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I. M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., HIGGINS, D. J., ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics*, 23, 2947-2948, 2007.
- LIBERTINI, E., LI, Y., MCQUEEN-MASON, S. J., Phylogenetic Analysis of the Plant Endo- β -1, 4-Glucanase Gene Family. *Journal Molecular Evolution*, 58, 506-515, 2004.
- NISHIYAMA, K., GUI, M., ROSE, J. K. C., KUBO, Y., BENNETT, K. A., WANGJIN, L., KATO, K., USHIJIMA, K., NAKANO, R., INABA, A., BOUZAYEN, M., LATSCH, A., PECH J. C., BENNETT, A. B., Ethylene regulation of fruit softening and cell wall disassembly in Charentais melon. *Journal of Experimental Botany*, 58, 1281-1290, 2007.
- ROSE, J. N. C., LEE, H. H., BENNETT, A. B., Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 5955-5960, 1997.

Diccionario de topografía

- EXPASY BIOINFORMATICS RESOURCE PORTAL. De: <http://expasy.org/proteomics>
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). De: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- PROSITE. De: <http://www.expasy.ch/prosite/>
- THE EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE (EBI) De: <http://www.ebi.ac.uk/>