

INFORME TECNICO DE RESIDENCIA PROFESIONAL

INGENIERIA BIOQUÍMICA EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

PRESENTA
MARTIN DE JESÚS RUÍZ NANGA

NOMBRE DEL PROYECTO
“Biología molecular de la ruta de biosíntesis de
carotenoides en frutos de chile (*Capsicum eximium*
accesión 1546)”

PERIODO DE REALIZACIÓN
AGOSTO-DICIEMBRE 2014

ASESOR EXTERNO
DR. NEFTALÍ OCHOA ALEJO
PROFESOR- INVESTIGADOR
CINVESTAV- IRAPUATO

ASESOR INTERNO
DRA. PATRICIA GUADALUPE SÁNCHEZ ITURBE
PROFESOR-INVESTIGADOR
ITTG

Residencia desarrollada en Irapuato, Guanajuato y presentada en Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

ÍNDICE

1. Justificación -----	1
2. Objetivos -----	2
2.1 Objetivo general-----	2
2.1.1 Objetivos específicos-----	2
3. Problemas a resolver -----	3
4. Procedimientos y descripción de las actividades realizadas -----	3
-----	3
4.1 Muestras biológicas-----	3
4.2 Construcción de los vectores de silenciamiento-----	4
4.2.1 Obtención del ADNc-----	4
4.2.2 Amplificación de los fragmentos de los genes <i>GGPS</i> y <i>PSY</i> -----	5
4.2.3 Purificación del ADN-----	5
4.2.4 Clonación de los fragmentos del gen <i>GGPS</i> y <i>PSY</i> en el vector TOPO8 ^R -----	6
4.2.5 PCR de colonia-----	7
4.2.6 Digestión del plásmido con enzimas de restricción EcoR I-----	7
-----	7
4.2.7 Obtención y preparación del vector TRV2-----	8
4.2.8 Linearización del vector TOPO8-GEN-----	8
4.2.9 Reacción de recombinación del vector TOPO8 con el vector TRV2-----	9
4.2.10 Diálisis del vector TRV2-GEN-----	9
4.2.11 Transformación de <i>E. coli</i> -----	9

4.2.12 Verificación de la construcción del vector TRV2-GEN-----	10
4.2.13 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -----	11
4.3 Agroinfección de plántulas de chile con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> transformadas con TRV2-GGPS y TRV2-PSY-----	11
4.4 Detección del TRV en las plantas de chile agroinfectadas-----	12
4.4.1 Extracción de ARN-----	12
4.4.2 Obtención del ADNc-----	13
4.4.3 Amplificación de un fragmento del virus TRV2-----	14
4.5 Colecta de frutos-----	14
4.6 Análisis de la expresión génica en frutos de chile-----	14
4.6.1 Obtención del ADNc-----	15
4.6.2 qPCR-----	15
4.7 Extracción y cuantificación de fitoeno por HPLC-----	16
5. Resultados y discusiones-----	16
5.1 Construcción de los vectores de silenciamiento-----	16
5.2 Detección del TRV en las plantas de chile agroinfectadas-----	21
5.2.1 Detección genotípica-----	21
5.2.2 Detección fenotípica-----	22
5.3 Análisis de la expresión génica de <i>GGPS</i> y <i>PSY</i> a distintos días de maduración en frutos de <i>Capsicum eximium</i> accesión 1546-----	25
5.4 Cuantificación de fitoeno en frutos de 40 DPA en plantas control-----	27
6. Conclusiones y recomendaciones-----	27
-----	-----
6.1 Conclusiones-----	27

6.2 Recomendaciones-----	28
7. Competencias desarrolladas-----	29
8.-Bibliografía -----	31
9. Anexos-----	33
Anexo 1. Protocolo para la cuantificación de fitoeno por HPLC-----	33
Anexo 2. Protocolo para extracción de fitoeno -----	36

1. Justificación

El chile es uno de los cultivos agrícolas más importantes en México y en el mundo, porque sus frutos se consumen tanto en fresco como en seco para proporcionar color, sabor y aroma a infinidad de platillos, lo que lo sitúa entre las principales especias. México es el país con la mayor diversidad de *Capsicum annuum*, donde se cultiva prácticamente en todo el territorio, con sistemas de producción y problemáticas muy diversos. Por ello, es de suma importancia contar con nueva información sobre el cultivo del chile (Zegbe y Valdez, 2012).

México sobresale en la generación de variedades de chile en el mundo, alrededor del 90% de los frutos de chile que se consumen a nivel mundial es de origen mexicano. Otros países productores son China, Indonesia, Turquía, España, Estados Unidos y Nigeria. No hay un elemento que por sí solo garantice el éxito de la producción del cultivo de chile. Es la conjunción de factores de diversa índole, así como el aprovechamiento de los mismos, lo que convierte a México en una potencia. Los principales tipos de chile que se cultivan en el país son el jalapeño, el serrano, el poblano, el morrón y el habanero (SAGARPA, 2012).

En la dieta humana los carotenoides son aportados fundamentalmente por las frutas y las hortalizas y en pequeña porción a partir de fuentes animales y a través de los aditivos alimentarios (pigmentos). De los casi 50 carotenoides disponibles en la dieta humana, que pueden ser absorbidos y metabolizados, solo seis representan más del 95% de los carotenoides totales en la sangre la mitad de estos compuestos que tienen actividad provitamínica A, son el β -caroteno, el α -caroteno y la β -criptoxantina, y los otros tres que no tienen dicha capacidad son el licopeno, la luteína y la zeaxantina (Beltrán et al., 2012).

Los frutos del chile (*Capsicum* spp.) son una rica fuente de metabolitos con posibles propiedades que promueven la salud, por ejemplo carotenoides (provitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), tocoferoles (vitamina E), flavonoides y capsaicinoides (compuestos picantes). Muchos de estos compuestos son antioxidantes que ejercen sus efectos biológicos a través de barrido de radicales libres, la unión a proteínas y la interacción con las vías de transducción de señales humano. Los frutos de diferentes variedades de chile muestran variaciones en la composición y el nivel de metabolitos relacionados con la salud. La composición metabólica de los frutos de chile depende de su constitución genética y de los factores ambientales (Wahuyni et al., 2011).

La aparición de color naranja de la fruta de *Capsicum* spp. es debido a la acumulación de β -caroteno, o debido a que solo acumulan carotenoides rojos y amarillos (Guzmán et al., 2010).

Varios grupos de investigación de distintos países, han encaminado esfuerzos a incrementar el aporte de vitamina A de los alimentos de la dieta básica humana mediante la biotecnología; entre estas especies se encuentra el arroz, la canola y el tomate, en las cuales se ha logrado la inserción de genes que codifican a enzimas de la ruta de biosíntesis de carotenoides, obteniéndose variedades con niveles aumentados de carotenoides (Arango, 2006). Es por esta razón que en el presente trabajo se abordó el estudio de la función de los genes *GGPS* y *PSY* de la ruta de biosíntesis de carotenoides en plantas de *Capsicum eximium* accesión 1546.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Estudiar la función de los genes *GGPS* y *PSY* en la ruta de biosíntesis de carotenoides en frutos de chile (*Capsicum eximium* accesión 1546) por medio del silenciamiento génico inducido por virus.

2.1.1 Objetivos específicos

- 1) Realizar la construcción del vector de silenciamiento *GGPS* y *PSY* con base al *Virus del cascabeleo del tabaco* (pTRV2).
- 2) Infectar a plantas de *Capsicum eximium* accesión 1546 con *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con el vector de silenciamiento.
- 3) Cuantificar y comparar la expresión de los genes *GGPS* y *PSY* a diferentes tiempos de maduración, en plantas control contra las plantas silenciadas.
- 4) Cuantificar por HPLC los niveles de fitoeno en las plantas silenciadas y en las testigos.

3. Problemas a resolver

En la actualidad se han descrito a detalle la ruta de biosíntesis de carotenoides en una gran variedad de chiles (*Capsicum* spp.) pero para las plantas de Chile de la especie *Capsicum eximium* accesión 1546 no se encuentra definida y no se cuenta con datos bibliográficos. Además, para la futura manipulación genética de esta ruta metabólica por ingeniería genética es necesario primero demostrar la función de los genes a ser manipulados.

Solamente se encuentran trabajos acerca de los factores de transcripción que regulan la biosíntesis de las antocianinas, trabajo realizado en el Cinvestav-Unidad Irapuato (Ochoa-Alejo y Aguilar-Barragán, 2014).

Con el fin de obtener una visión más completa de la diversidad bioquímica se determinó la composición de carotenoides estudiando así los dos primeros genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides.

4. Procedimientos y descripción de las actividades realizadas

4.1 Muestras biológicas

Las semillas de *Capsicum eximium* accesión 1546 fueron donadas por el IPK Gatersleben, Genebank Department Foundation Leibniz, Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Gatersleben, Germany. No hay variabilidad fenotípica con respecto a los frutos.

Se tomaron 50 semillas y se sumergieron en etanol al 70% por 30seg. Se descartó el etanol. Se colocaron las semillas en un vaso de precipitados donde se les agregó solución de blanqueador comercial (Cloralex) al 30% (v/v) y se agitaron por 5 min. Posteriormente se lavaron las semillas con agua destilada hasta quitarles el olor a blanqueador. Se desecharon las semillas que flotaban, y las del fondo se dejaron en agua por 19 horas para su posterior siembra.

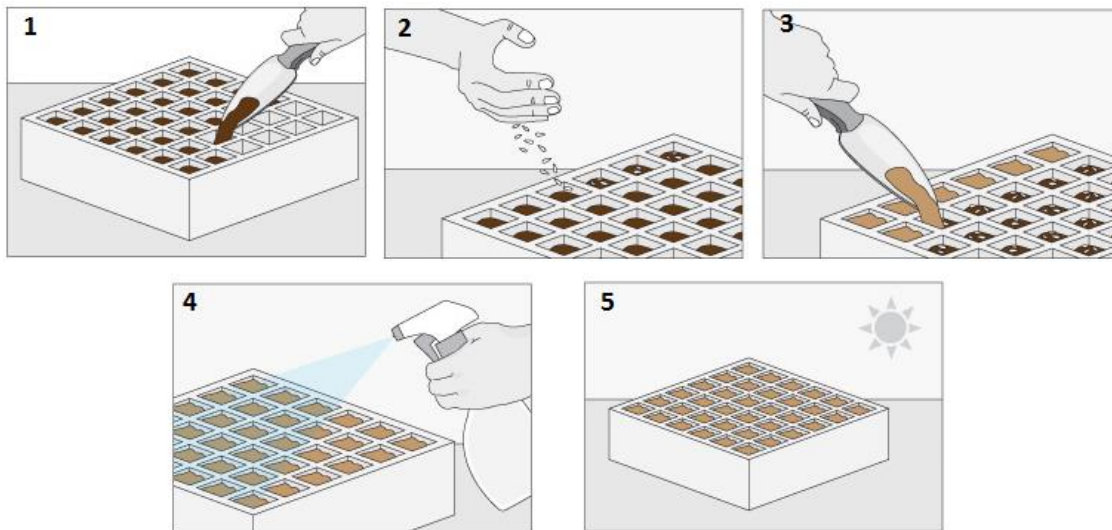


Figura 1. Esquema de la metodología para la siembra de semillas de chile en almácigo.

Se tomó una charola de plástico para sembrar las semillas, se llenó cada pocillo hasta la mitad con una mezcla de suelo estéril constituida por tres partes de mezcla Sunshine 3™ (Sun Gro Horticulture, Canadá) y una parte de perlita (Termolita, México), tal como se muestra en la Figura 1, enseguida se colocaron tres semillas por pocillo y se cubrieron con la misma mezcla de suelo, se regó y se dejó creciendo en el invernadero.

Después de dos semanas, las plantas se trasplantaron a macetas de 1 litro y se fertilizaron cada dos semanas con una solución 30-20-10 (N-P-K).

4.2 Construcción de los vectores de silenciamiento (Lu et al., 2003; Arce-Rodríguez, 2011; Aguilar-Barragán, 2011)

4.2.1 Obtención del ADNc

El ADNc se obtuvo a partir del ARN extraído previamente en el laboratorio a partir de frutos de *Capsicum eximium* accesión 1546 colectados a los 60 días post-antesis (DPA) esto porque gen PSY se expresa mayormente a los 50-60 días de maduración del fruto.

En un microtubo de 200 µl se adicionó 1 µl de mezcla de nucleótidos 10 mM, 1 µl de oligos (dT) 12-18, el volumen necesario equivalente a 1 µg de ARN y se completó con agua inyectable a un volumen de 12 µl. El tubo se dejó en baño maría a 65°C por 5 min, y luego se colocó en hielo por 3 min. Se centrifugó por unos segundos y se le agregaron 4 µl de buffer 5X FS, 2 µl de DTT 0.1 M y 1 µl de RNasa OUT™, se

centrifugó unos segundos y se calentó la mezcla a 42°C por 2 min, luego se agregó 1 µl de enzima SuperScript™ II RT y se incubó en el termociclador inicialmente a 42°C por 1 h y después a 72°C durante 15 min. El ADNc generado se mantuvo a -20°C hasta su uso.

Para verificar la presencia de ADNc, se amplificó un fragmento del gen de la actina. En un microtubo de 200 µl se agregaron 17.6 µl de agua inyectable, 2.5 µl de buffer 10 X, 0.5 µl de mezcla de nucleótidos 10 mM, 1.0 µl de MgCl₂ 50 mM, 1.0 µl de cada oligonucleótido, 0.4 µl de la enzima Taq ADN polimerasa y 1.0 µl del ADNc obtenido.

La condición de la PCR inició con una desnaturalización a 94°C (5 min), 30 ciclos a 94°C (30 s/ciclo), 55°C para el alineamiento (30 s/ciclo), 72°C para la extensión (1 min/ciclo) y una elongación final a 72°C (3 min).

Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1%; el buffer de corrida fue TAE1X. El gel se dejó correr a 100 V por 30 min.

4.2.2 Amplificación de los fragmentos de los genes *GGPS* y *PSY*

Las amplificaciones se realizaron por triplicado para obtener suficiente cantidad de ADN. En un microtubo de 200 µl se mezclaron 16.1 µl de agua inyectable, 2.5 µl de buffer 10X, 0.5 µl de mezcla de nucleótidos 10 mM, 1.0 µl de MgCl₂ 50 mM, 1.0 µl de cada oligonucleótido correspondiente (directo y reverso), 0.4 µl de enzima Taq ADN polimerasa y 2.5 µl del ADNc de Chile.

La PCR inició con una desnaturalización a 94°C (3 min), 30 ciclos a 94°C (30 s/ciclo), 55°C para el alineamiento (30 s/ciclo), 72°C para la extensión (1 min/ciclo) y una elongación final a 72°C (3 min).

Para verificar que la amplificación se hubiera llevado a cabo correctamente, 4 µl del producto de la PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1%; el buffer de corrida fue TAE1X, y el gel se dejó correr a 100 V 30 min.

4.2.3 Purificación del ADNc (Healtcare, 2014)

La purificación del ADNc de una reacción de PCR se realizó con el “Illustra™ GFXTM PCR DNA and gel band purification kit”. Se siguió el protocolo que acompaña al

producto: en un microtubo de 1.5 ml se colocó el producto de las tres amplificaciones, se añadieron 500 µl de buffer de captura tipo 3 y se mezclaron por pipeteo. La mezcla se colocó en una columna microspin, ésta se montó en un tubo colector y se centrifugó a 16,000 g por 30 s. El líquido que fluyó se descartó, se agregaron 500 µl de buffer de lavado tipo 1 y se centrifugó nuevamente a 16,000 g por 30 s. La columna se cambió a un microtubo de 1.5 ml libre de DNasa, se añadieron 25 µl del buffer de elución tipo 4, se dejó 1 min a temperatura ambiente, luego se centrifugó a 16,000 g por 1 min. El líquido que eluyó constituía el ADNc purificado.

4.2.4 Clonación de los fragmentos del gen *GGPS* Y *PSY* en el vector TOPO8^R Se realizó de acuerdo al protocolo del proveedor (Invitrogen, 2014a)

Los fragmentos del gen *GPPS* y *PSY* amplificados y purificados se ligaron en el PCRTM 8/GW/TOPO^R TA cloning kit respectivamente.

En un microtubo para PCR de 200 µl se agregaron 10 µl del gen purificado, 1 µl del vector TOPO8^R y 1 µl de solución salina (lo incluye el “kit”); se dejó incubando en un termociclador a 24°C por 30 minutos.

Posteriormente en un tubo eppendorf de 1.5 ml se agregaron 12 µl del vector de clonación y 100 µl de células quimiocompetentes de *E. coli* cepa TOP10. Se colocó en hielo por 30min, luego a 42°C por 2min. y nuevamente en hielo por 10 minutos. Al tubo eppendorf se le agregaron 900 µl de medio LB y se dejó incubando en agitación a 165 rpm por 1h.

Pasada la incubación, se sembraron 15 µl de las células en medio sólido LB adicionados con 100 µg/ml de espectinomicina y se dejaron creciendo a 37°C de 18-20h.

Nota: Las células se sacaron del ultracongelador REVCO a -80°C y se descongelaron en hielo. Para verificar que las células estaban descongeladas se le dio un pequeño golpe en la parte inferior y se volvieron a regresar al hielo. Todo el proceso de clonación se realizó en la campana de flujo laminar.

4.2.5 PCR de colonia

Para corroborar que el producto de PCR se ligó en el vector de clonación TOPO8, se realizó una PCR por colonia a 20 de las colonias que crecieron en las cajas Petri.

En un microtubo de 200 μ l se mezclaron, 9.3 μ l de agua inyectable, 1.3 μ l de buffer 10X, 0.3 μ l de mezcla de nucleótidos 10 mM, 0.5 μ l de $MgCl_2$ 25 mM, 0.5 μ l de cada oligonucleótido (M13-R y M13-F) para secuenciar ese fragmento del vector TOPO8 y 0.1 μ l de Taq ADN polimerasa.

Las condiciones de la PCR fueron: desnaturalización a 94°C (3 min), 25 ciclos a 94°C (30 s/ciclo), 60°C para el alineamiento (30 s/ciclo), 72°C para la extensión (1 min/ciclo) y una elongación final a 72°C (3 min).

El producto de PCR se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, con el buffer de corrida fue TAE1X, y dejando correr a 100 V por 30 min.

4.2.6 Digestión del plásmido con enzimas de restricción EcoR I

La segunda prueba para comprobar que el inserto deseado se clonó en el vector fue una reacción de digestión con las enzimas de restricción cuyo sitio de reconocimiento se encontraba en el fragmento amplificado del gen correspondiente. (Invitrogen, 2014)

Las colonias que dieron positivo en la PCR de colonia se sembraron en medio líquido LB con 50 μ g/ml de kanamicina y se dejaron crecer en agitación a 37°C por 18-20 h.

Para la extracción del plásmido se usó el “kit” PureLink™ Quick Plasmid Miniprep. Se siguió el protocolo provisto por el proveedor (Invitrogen, 2014b): el cultivo se centrifugó a 12,000 g por 3 min, se eliminó el medio de cultivo y la pastilla sedimentada se resuspendió en 250 μ l del buffer de resuspensión (R3) con RNasa. Después se añadieron 250 μ l de buffer de lisis (L7), se mezcló levemente por inversión 5 veces, y se incubó el tubo por 5 min a temperatura ambiente. Se añadieron 350 μ l de buffer de precipitación (N4), se mezcló por inversión hasta que la solución fue homogénea, y la solución se transfirió a microtubos de 1.5 ml. Se centrifugó la mezcla a 12,000 g por 10 min a temperatura ambiente. Se cargó el sobrenadante en una columna y ésta en un tubo colector, luego se centrifugó a 12,000 g por 1 min. Se descartó el líquido que se filtró por la columna, y a ésta se le agregaron 700 μ l de buffer de lavado (W9), se centrifugó a 12,000 g por 1 min y se volvió a descartar el líquido filtrado por la columna;

nuevamente se centrifugó para remover residuos del buffer de lavado. Se descartó el tubo colector, y la columna se colocó en un nuevo microtubo de 1.5 ml. Se añadieron 75 μ l del buffer TE al centro de la columna, se incubó la columna a temperatura ambiente por 1 min, después se centrifugó a 12,000 *g* por 2 min, se descartó la columna y en el microtubo quedó el plásmido.

En el espectrofotómetro Nanodrop se midió la concentración del ADN plasmídico extraído.

En un microtubo de 200 μ l se mezcló el volumen equivalente a 1 μ g de ADN plasmídico, 2 μ l del buffer correspondiente, agua inyectable hasta completar 19 μ l y 1 μ l de la enzima de restricción EcoR I, se agitó en vortex, se centrifugó y se dejó incubando en baño maría a 37°C por 2 h. Para inactivar a la enzima EcoR I se dejó incubando, también en baño maría, a 65°C por 20 min.

La digestión se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1%; el buffer de corrida fue el TAE1X, y se dejó correr a 100 V durante 30 min.

4.2.7 Obtención y preparación del vector TRV2

El plásmido TRV2-MCS, obtenido del Centro de Recursos Biológicos de Arabidopsis (Ohio, EUA), se encontraba en *E. coli* cepa DH10B. La bacteria se sembró en medio sólido LB agar con 50 μ g/ μ l de kanamicina (resistencia conferida por el plásmido) a 37°C. De aquí se sembró en medio líquido LB con 50 μ g/ μ l de kanamicina a 37°C y se dejó crecer de 18 a 20 h. La extracción del plásmido se hizo mediante el “kit” PureLink™ Quick Plasmid Miniprep. Para corroborar la extracción del plásmido, se analizaron 5 μ l en un gel de agarosa al 1%, utilizando el buffer de corrida TAE1X; el gel se dejó correr a 100 V por 30 min. Se leyó la concentración del plásmido en un espectrofotómetro Nanodrop.

4.2.8 Linearización del vector TOPO8-GEN

En un microtubo de 200 μ l se agregaron 5 μ g de DNA plasmídico, 10 μ L de buffer BSA, 10 μ L de buffer XBa I y se completa con agua inyectable (estéril).

Se agitó en el vortex y se dejó en baño maría a 37°C por 1h. Después, se dejó en baño maría a 65°C por 20min para inactivar a la enzima.

El vector linealizado se purificó con el “Illustra™ GFXTM PCR DNA and gel band purification kit”. Se volvió a leer la concentración del plásmido en un espectrofotómetro Nanodrop.

4.2.9 Reacción de recombinación del vector TOPO8 con el vector TRV2

La reacción de recombinación se realiza en los sitios de recombinación AttI1 y AttI2 de los vectores TOPO8 y TRV2, con la ayuda de la mezcla enzimática GatewayR LR Clonase™ II. Se siguió el protocolo descrito por el proveedor (Invitrogen, 2014a).

A un microtubo de 200 µl se agregaron 4 µl de agua estéril, 300 ng del vector TRV2, 200 ng del vector TOPO8-GEN linealizado y 2 µl de la mezcla enzimática LR Clonase™ II.

Se dejó incubando a 20°C toda la noche, a la mañana siguiente se le agregaron 2 µL de proteinasa K (que viene junto con el kit GatewayR) y se dejó incubando por 10min. a 37°C para detener la reacción.

IMPORTANTE: La mezcla enzimática se encuentra congelada, antes de agregarla al microtubo se deja en hielo por 2 minutos para que se descongele y se le da dos pequeños toques de vortex.

4.2.10 Diálisis del vector TRV2-GEN

En una caja Petri se colocó una gota de agua inyectable, y posteriormente con unas pinzas de punta chata se tomó un filtro Millipore de 0.025 µm VSWP y con cuidado se colocó sobre la gota de agua inyectable y se añadió toda la reacción de recombinación sobre el filtro por 20 min.

4.2.11 Transformación de *E. coli*

Se usaron células electrocompetentes de *E. coli* cepa DH10B que se encontraba guardada en el ultracongelador REVCO a -80°C y se descongeló en hielo por 5min.

En un el tubo donde se encontraban las células (35 μ l de células electrocompetentes) se agregaron 4 μ l de la solución de recombinación dializada. Muy importante es no manipular a las células fuera del hielo por mucho tiempo y después de agregar la solución solamente se mezcla con un pequeño golpe en la parte inferior del tubo.

Enseguida la mezcla de solución-células se transfirió a una cubeta fría (que también se encontraba en el hielo) Gene PulserR y se electroporó a 2.5 kV, 25 μ FD y 200 Ohms.

Hecha la electroporación, en la campana de flujo laminar se le agregaron 450 μ l de medio LB, se mezcló por pipeteo y se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml (nuevo y estéril), y se dejó incubando en agitación a 37°C por una hora.

Después de la incubación, en la campana de flujo laminar se sembraron en cajas Petri con medio LB y 50 μ g/ ml de kanamicina, 15 μ l de la suspensión bacteriana y se dejó creciendo en el cuarto de incubación a 37°C por 20 horas.

4.2.12 Verificación de la construcción del vector TRV2-GEN

Se eligieron 21 colonias a las cuales se les realizó un PCR de colonia, esto para tener una mayor probabilidad de encontrar a colonias positivas.

En un microtubo de 200 μ l se mezclaron, 9.3 μ l de agua inyectable, 1.3 μ l de buffer 10X, 0.3 μ l de mezcla de nucleótidos 10 mM, 0.5 μ l de MgCl₂ 25 mM, 0.5 μ l de cada oligonucleótido R y F para cada gen y 0.1 μ l de Taq ADN polimerasa.

Las condiciones de la PCR fueron: desnaturalización a 94°C (3 min), 25 ciclos a 94°C (30 s/ciclo), 60°C para el alineamiento (30 s/ciclo), 72°C para la extensión (1 min/ciclo) y una elongación final a 72°C (3 min).

El producto de PCR se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, usando el buffer de corrida TAE1X, y dejando correr a 100 V por 30 min.

Las colonias que dieron positivo se sembraron en medio liquido LB con 50 μ g/ ml de kanamicina y se dejó creciendo en agitación a 37°C por 18-20 h. Después se extrajeron los plásmidos con el "kit" PureLink™ Quick Plasmid Miniprep y se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, utilizando el buffer de corrida TAE1X, y corriendo las muestras a 100 V por 30 min.

4.2.13 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* (Liu et al., 2002)

Se tomaron 8 µl del plásmido TRV2-GEN, extraído de *E. Coli* cepa DH10B, se dializó en filtros Millipore 0.025 µm VSWP y se mezclaron 6 µl del plásmido dializado con 35 µl de células de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV2260 electrocompetentes y se electroporaron a 2.5KV, 25 µFD y 200 Ohms. Se les agregaron 450 µl de medio YEB, y la suspensión se agitó durante 1 h a 28°C, Se tomaron 10 µl de las células en suspensión y se resembraron en medio solido YEB con 50 µg/ ml de kanamicina, 50 µg/ ml de rifampicina y 100 µg/ ml de carbenicillina y se dejaron incubando por 2 días a 28°C.

Se eligieron 10 colonias para hacerle una PCR de colonia; para ello, en un microtubo de 200 µl se mezclaron, 9.3 µl de agua inyectable, 1.3 µl de buffer 10X, 0.3 µl de mezcla de nucleótidos 10 mM, 0.5 µl de MgCl₂ 25 mM, 0.5 µl de cada oligonucleótido R y F para cada gen y 0.1 µl de Taq ADN polimerasa.

Las condiciones de la PCR fueron: desnaturalización a 94°C (3 min), 25 ciclos a 94°C (30 s/ciclo), 60°C para el alineamiento (30 s/ciclo), 72°C para la extensión (1 min/ciclo) y una elongación final a 72°C (3 min).

El producto de PCR se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, usando el buffer de corrida TAE1X, y dejando correr a 100 V por 30 min.

La colonias positivas se resembraron en medio líquido YEB con 50 µg/ ml de kanamicina, 50 µg/ ml de rifampicina y 100 µg/ ml de carbenicillina y se dejó incubando por 2 días a 28°C. Se extrajeron los plásmidos con el “kit” PureLink™ Quick Plasmid Miniprep y se mandaron a secuenciar a la Unidad de Genómica Avanzada del Cinvestav-Unidad Irapuato.

4.3 Agroinfección de plántulas de chile con *Agrobacterium tumefaciens* transformado con TRV2-GGPS y TRV2-PSY (Liu et al., 2002)

Las células de *A. tumefaciens* transformadas que dieron positivo a un “blast” en el NCBI (el “blast” se realizó entre la secuencia de bases del origen de los genes con la secuencia de bases de los vectores que se mandaron secuenciar) se cultivaron en 5 ml de medio YEB con 50 µg/ml de kanamicina y 50 µg/ml de rifampicina, y el cultivo se dejó crecer en agitación a 28°C por un día. Luego, el cultivo se transfirió a 30 ml de

medio YEB con 50 µg/ml de kanamicina y 50 µg/ml de rifampicina, y se volvió a dejar un día en agitación a 28°C. El cultivo se centrifugó a 3,000 rpm y temperatura ambiente por 15 min. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 30 ml de MgCl₂ 10 mM frío, se centrifugaron nuevamente a 3,000 rpm y temperatura ambiente por 15 min, y se repitió el lavado de las células. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 700 µl de solución de infiltración (10 mM de MgCl₂, 10 mM de MES y 150 µM de acetosiringona); este volumen se transfirió a un microtubo de 1.5 ml, se dejó incubando a 28°C por 3 horas en agitación. Posteriormente, las suspensiones con cada una de las construcciones de TRV2 se juntaron en el mismo microtubo con las de TRV1 en una proporción 1:1. Se les agregaron 0.5 µl/ml del humectante Silwet L-77.

Con 100 µl de las suspensiones bacterianas preparadas (TRV1 + TRV2) se inocularon por agroinfiltración las plántulas de chile (con 4 semanas de emergencia) en el envés de los cotiledones o en el de las hojas nuevas completamente extendidas, utilizando una jeringa para insulina (1 ml) sin aguja. Después de la inoculación, las plántulas se cubrieron con papel de estraza y se mantuvieron en la oscuridad por 24 h en un cuarto de crecimiento con condiciones controladas.

4.4 Detección del TRV en las plantas de chile agroinfectadas (Yin et al., 2014)

4.4.1 Extracción de ARN total

La extracción de ARN total se hizo a partir de tejidos de tres zonas de la planta (baja, media y alta) y de dos tejidos diferentes (hoja y tallo) utilizando el PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, 2014c). Primero se molieron 300 mg del tejido correspondiente de la planta en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Una vez molida, la muestra se colocó en un microtubo de 1.5 ml al que previamente se le añadió 1 ml de TRIzol[®], se mezcló y se dejó reposar por 5 min. Se agregaron 200 µl de cloroformo, el microtubo se agitó vigorosamente por 15 seg (no vórtex) y se dejó reposar por 3 min. Se centrifugó a 13,200 g durante 15 min a 4°C, el sobrenadante se transfirió a un microtubo nuevo, se añadió un volumen igual de etanol al 70%, y se agitó en el vortex hasta dispersar cualquier sólido. Se transfirieron 700 µl a la columna Spin (con su tubo colector), se centrifugó a 13,200 g por 15 seg a temperatura ambiente, y el líquido que se filtró por la columna se descartó; este último paso se repitió hasta que toda la muestra se filtró por centrifugación. Se añadieron a la columna 700 µl de buffer de lavado tipo I, se

centrifugó a 13,200 xG por 15 seg y se descartó el líquido que atravesó la columna. Se cambió la columna a un tubo colector nuevo, se agregaron 500 µl de buffer de lavado tipo II, se centrifugó a 13,200 g durante 30 seg, y se descartó el líquido filtrado por la columna; el procedimiento se repitió una vez más. Se centrifugó la columna por 1 min para dejar completamente seca la membrana. Se cambió la columna a un microtubo libre de RNasa, se añadieron 35 µl de agua libre de RNasa, se dejó incubando a temperatura ambiente por 1 min y luego se centrifugó a 13,200 g por 2 min; se repitió el paso anterior una vez más. El líquido que eluyó se almacenó a -20°C.

Para verificar la integridad del ARN, se corrió por electroforesis una alícuota de 6 µl con 2 µl de buffer de carga en un gel de agarosa al 0.8%, con buffer de corrida TAE 1X estéril, a 100 V por 30 min. La cuantificación del ARN se llevó a cabo con un Nanodrop.

4.4.2 Obtención del ADNc

En un microtubo de 200 µl se adicionó 1 µl de mezcla de nucleótidos 10 mM, 1 µl de oligos (dT) 12-18, el volumen necesario equivalente a 1 µg de ARN y se completó con agua inyectable a un volumen de 12 µl. El tubo se dejó en baño maría a 65°C por 5 min, y luego se colocó en hielo por 3 min. Se centrifugó por unos segundos y se le agregaron 4 µl de buffer 5X FS, 2 µl de DTT 0.1 M y 1 µl de RNasa OUT™, se centrifugó unos segundos y se calentó la mezcla a 42°C por 2 min, luego se agregó 1 µl de enzima SuperScript™ II RT y se incubó en el termociclador a 42°C por 1 h y finalmente a 72°C durante 15 min. El ADNc generado se mantuvo a -20°C hasta su uso.

Para verificar la presencia de ADNc, se amplificó un fragmento del gen de la actina. En un microtubo de 200 µl se agregaron 17.6 µl de agua inyectable, 2.5 µl de buffer 10 X, 0.5 µl de mezcla de nucleótidos 10 mM, 1.0 µl de MgCl₂ 50 mM, 1.0 µl de cada oligonucleótido, 0.4 µl de la enzima Taq ADN polimerasa y 1.0 µl del ADNc obtenido.

La condición de la PCR inició con una desnaturalización a 94°C (5 min), 30 ciclos a 94°C (30 s/ciclo), 55°C para el alineamiento (30 s/ciclo), 72°C para la extensión (1 min/ciclo) y una elongación final a 72°C (3 min).

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1%; el buffer de corrida fue TAE1X. El gel se dejó correr a 100 V por 30 min.

4.4.3 Amplificación de un fragmento del virus TRV2

Posteriormente se hizo una PCR tradicional con los oligonucleótidos de TRV2, siendo el directo: 5´GGAGAATACGGTAGAACG3´, y el reverso: 5´GGGTTACTAGCGGCACTG3´, para la amplificación de un fragmento del gen de la proteína de la cápside para demostrar la presencia del TRV en las plantas de Chile agroinfectadas. En un microtubo de 200 µl se agregaron 17.6 µl de agua inyectable, 2.5 µl de buffer 10X, 0.5 µl de mezcla de nucleótidos 10 mM, 1.0 µl de MgCl₂ 50 mM, 1.0 µl de cada oligonucleótido (directo y reverso), 0.4 µl de la enzima Taq ADN polimerasa y 1.0 µl del ADNc obtenido.

La condición de la PCR inició con una desnaturalización a 94°C (5 min), 30 ciclos a 94°C (30 s/ciclo), 55°C para el alineamiento (30 s/ciclo), 72°C para la extensión (1 min/ciclo) y una elongación final a 72°C (3 min).

Los productos de amplificación de PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, con buffer TAE1X, y corriendo a 100 V por 30 min.

4.5 Colecta de frutos de Chile (Aguilar-Barragán, 2011)

Al tiempo de la antesis se marcó cada flor con una etiqueta. A los 10, 20, 30, 40, 50 y 60 días post-antesis los frutos de Chile se colectaron, se separó el pericarpio con ayuda de un bisturí, y el tejido se congeló en nitrógeno líquido y se mantuvo a -80°C hasta su uso.

4.6 Análisis de la expresión génica en frutos de Chile (Hruz et al., 2011)

El pericarpio congelado de dos frutos se utilizó como muestra de tejido para obtener el ARN total siguiendo el protocolo descrito previamente.

El ARN se trató con DNasa I. Se siguió el protocolo sugerido en el "kit": en un microtubo se agregó el volumen correspondiente a 2 µg de ARN, 2 µl de buffer, 2 µl de enzima DNasa I y se completó a 10 µl con agua inyectable. Se incubó a temperatura ambiente por 15 min. Para inactivar la DNasa se agregaron 2 µl de EDTA 25 mM y se calentó a 65°C por 10 min. El ARN se leyó nuevamente en el espectrofotómetro Nanodrop para corroborar la cantidad de ARN que se tenía.

4.6.1 Obtención del ADNc

El ADNc se obtuvo al mezclar 1 μ l de oligonucleótidos (dT) 12-18, el volumen correspondiente a 1 μ g de ARN, 1 μ l de mezcla de nucleótidos 10 mM y se completó a 13 μ l con agua estéril. Se calentó a baño maría a 65°C por 5 min, se incubó en hielo por 3 min, se dio un pequeño toque en centrífuga y se agregaron 4 μ l de buffer 5X FS, 1 μ l de DTT 0.1 M, 1 μ l de RNasa OUT y 1 μ l de SuperScript III RT. Se agitó en vortex y se colocó en el termociclador 1 h a 50°C, y a 70°C por 15 min.

La preparación de ADNc se leyó en el Nanodrop, y se hicieron diluciones para tenerlo a una concentración de 50 ng/ μ l. Se guardó a -20°C hasta su utilización.

4.6.2 qPCR

Para la curva de expresión se analizó la expresión de los genes *GGPS* y *PSY* con ADNc de frutos de 10, 20, 30, 40, 50, y 60 DPA y como gen endógeno el factor de elongación *1 α* (*ef1 α*) (Liu et al., 2002; Lilly et al., 2011).

En un microtubo se agregaron 10 μ l de SYBR® Green PCR Master Mix, 2 μ l de la mezcla de los nucleótidos (directo y reverso) 10 μ M (ver Tabla 4), 8 μ l de agua inyectable y 1 μ l del ADNc correspondiente. La amplificación se hizo por triplicado, cada repetición con ADNc de pericarpio de frutos de diferente planta del mismo tratamiento.

La qPCR se llevó a cabo en un termociclador Applied Biosystems StepOne™ Real Time PCR Systems. El programa constó de 94°C/10 min para la desnaturalización inicial, 30 ciclos de 94°C 15 s/ciclo y 59°C 1 min/ciclo.

La abundancia relativa de los transcritos fue calculada y normalizada con respecto a *ef1 α* (gen endógeno), para minimizar la variación en los niveles de templado de ADNc, con las muestras “control” actuando como calibrador/referencia con un valor nominal de 1.

Del software Step One V 2.1, incluido en el termociclador de tiempo real, se obtuvieron los datos de Ct para la cuantificación relativa por el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4.7 Extracción y cuantificación de fitoeno en frutos de chile por HPLC

Se colectaron frutos de chile de 40 DPA de todos los tratamientos, para evaluar la producción de fitoeno a esa edad. Se eligieron los 40 DPA porque es un punto crítico e importante en la formación de los carotenoides y depende de las primeras moléculas formadas para poder seguir con las cascadas de reacciones que llevan a los carotenos capsantina y capsorrubina (Ochoa-Alejo & Gómez-García, 2013).

Se les eliminó el tejido placentario y las semillas dejando solamente el pericarpio, el cual se trituró para llevar a cabo la extracción del fitoeno con disolventes (véase Anexo 2).

Las muestras fueron analizadas en el HPLC Agilent Technologies, usando una columna NucleosilR C-18 AB (250x4.6mm; 5 µm) con un flujo de 1 ml/min. La detección del fitoeno se llevó a cabo a una longitud de onda de 288nm. El volumen de la muestra inyectada en la columna fue de 20 µl. El tiempo de retención fue de aproximadamente 20 minutos

Para la lectura de las muestras primero se realizó una curva patrón, usando fitoeno estándar de la marca Sigma (Véase Anexo 1).

5. Resultados y discusiones

5.1 Construcción de los vectores de silenciamiento

Para ejemplificar la construcción del vector con inserto, se presentan los resultados de la construcción del vector de silenciamiento TRV2-*PSY*.

Del ADNc se amplificó el fragmento del gen *PSY*, que teóricamente genera una banda de 364pb; observando la Figura 2, es posible ver que, efectivamente, la banda del producto de la amplificación fue de aproximadamente 400 pb, por lo cual se tomó como un resultado positivo de la amplificación, confirmando el trabajo de Arce-Rodríguez, (2011) donde los oligos diseñados teóricamente amplificaban un fragmento de 375 pb y al realizar la electroforesis de la PCR con dichos oligos, la banda mostrada en el gel fue por encima de la banda de 300 pb del marcador de peso molecular 1Kb plus, tomando como un resultado positivo la amplificación del fragmento del gen.

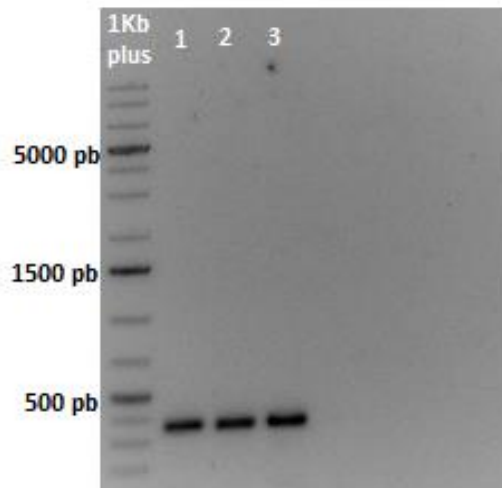


Figura 2. Gel de la electroforesis del producto de la amplificación del gen *PSY*. En los carriles marcados del 1 al 3 se encuentra el producto del gen *PSY* de 364 pb. En la primer columna se encuentra el marcador de peso molecular 1Kb plus.

El fragmento amplificado del gen *PSY* se inserta entre los sitios attL1 y attL2 (Figura 3), el tamaño de la sección que corta y amplifica el “primer” M13 es de 315 pb sin el inserto (Invitrogen, 2014), por lo que en el PCR de colonia, se amplifica toda la sección (en este caso con el gen insertado). Para comprobar que el fragmento del gen se ligó de manera correcta al vector TOPO8-GGPS o TOPO8-*PSY* respectivamente, se realizó una electroforesis, esperando ver una banda de (315 + gen) pb. Para *PSY* sería de 679pb y para *GGPS* sería de 667pb.

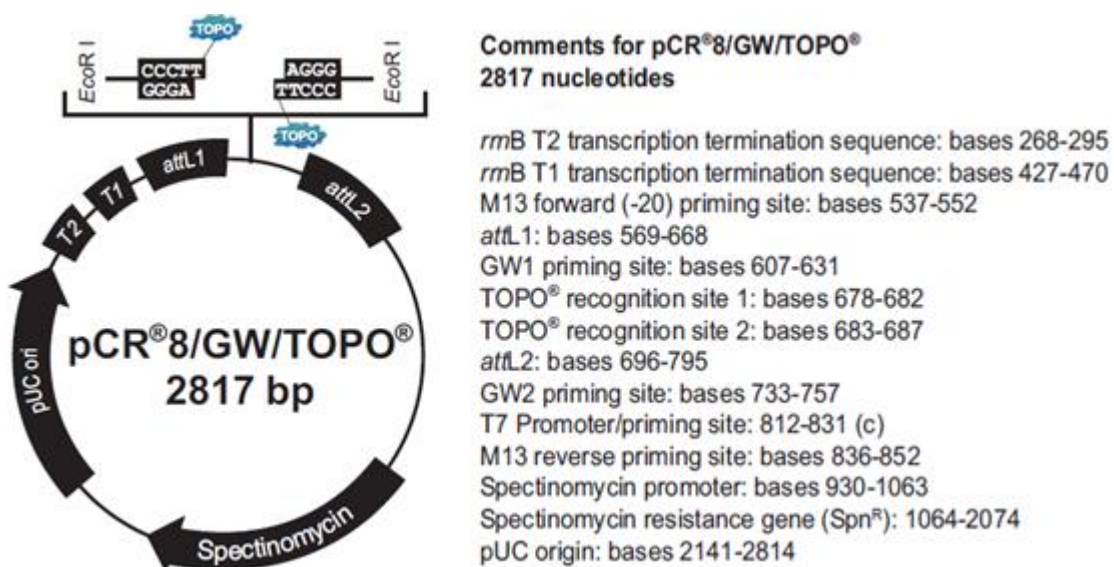


Figura 3. Esquema del vector comercial TOPO8

En la electroforesis que se realizó con el producto de la PCR de colonia (Figura 4), se observaron las bandas definidas por encima de la banda de 500 pb del marcador de peso molecular de 1 kb plus, siendo las colonias 12, 13, 14, 15, 16 y 18 positivas.

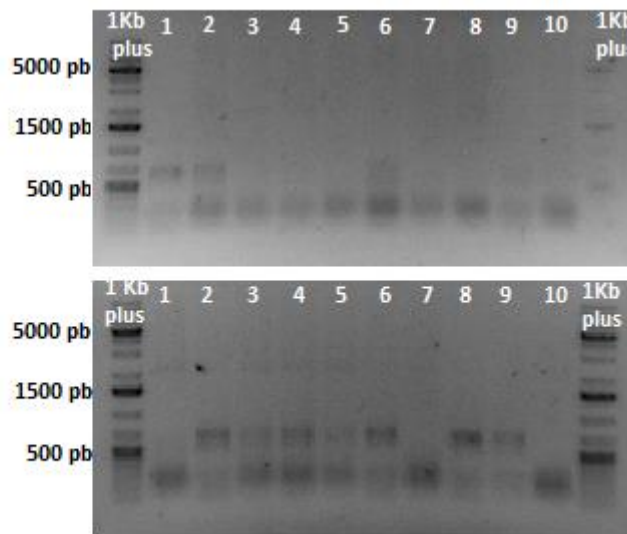


Figura 4. Gel de electroforesis de la PCR de colonias de *E. coli* cepa TOP10 quimiocompetentes transformadas con el vector TOPO8-PSY. En la imagen superior se muestra el producto de la PCR de las colonias del 1 al 10 en los carriles marcados con los mismo números, y en la imagen inferior se muestran las colonias 11 a la 20 siendo el carril marcado con el numero 1 la colonia 11 y así sucesivamente; en ambas imágenes en el carril marcado con 1 kb plus es el marcador de peso molecular.

Para corroborar que efectivamente la ligación se efectuó correctamente, a las colonias positivas se les extrajeron los plásmidos. Todas las colonias elegidas positivas en el PCR de colonia en la prueba con la enzima de restricción EcoR I, volvieron a dar positivo mostrando dos bandas definidas la banda de aproximadamente 3,000 pb indica la presencia del vector TOPO8 (2,817 pb) y la banda de aproximadamente 400 pb indica la presencia del fragmento del gen PSY (364 pb), tal como muestra la Figura 5.

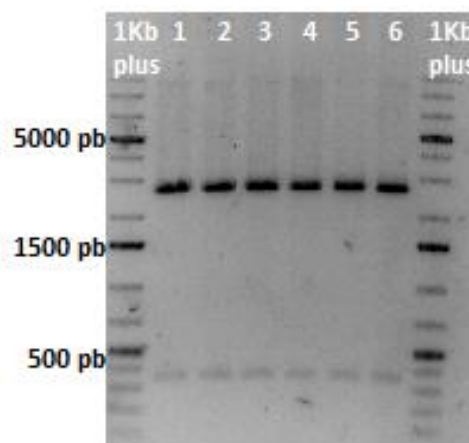


Figura 5. Gel de electroforesis de los productos del tratamiento con enzima de restricción EcoR I de las colonias 12, 13, 14, 15, 16 y 18. El orden es el anterior empezando en el carril marcado con el número 1; en el carril marcado con 1 kb plus se muestra el marcador de peso molecular.

Para insertar el fragmento del gen *PSY* en el vector TRV2 era necesario linearizar el vector TOPO8-*PSY* y para esto se tomó el vector TOPO8-*PSY* de la colonia 16, dado a que ésta presentó una mayor concentración de ADNc al leerlo en el Nanodrop. La concentración lineal fue de 65.9 ng/μl, la concentración del vector TRV2-gatewayB extraído de *E. Coli* cepa DH10B fue de 155 ng/μl, una vez hecha la linearización, se dializó para transformar bacterias de *E. coli* cepa DH10B electrocompetentes. Para verificar la construcción del vector TRV2-*PSY* se realizó una PCR a 20 colonias con oligonucleótidos para la amplificación del gen *PSY* (figura 6), en el cual todas las colonias dieron positivo mostrando una banda de aproximadamente 364pb.

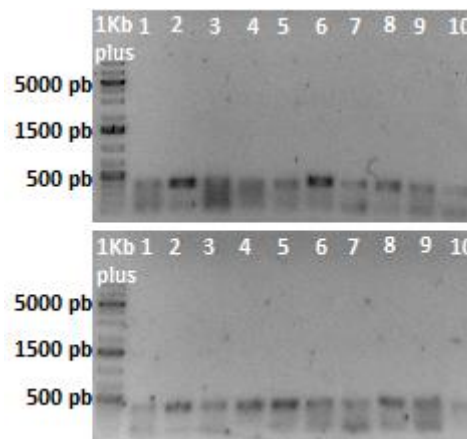


Figura 6. Resultado del gel de electroferesis de la PCR de colonia de *E. coli* cepa DH10B electrocompetentes con el vector TRV2-*PSY*. En la imagen superior, los carriles marcados con los números del 1 al 10 corresponden a las colonias del 1 al 10, mientras que en la imagen inferior en los carriles marcados del 1 al 10 pertenecen a las colonias del 11 al 20.

Para verificar que el fragmento del gen procedía del vector TRV2. Se realizó una electroforesis de los plásmidos que se extrajeron de las colonias positivas (Figura 7), las bacterias *E. coli* cepa DH10B se transformaron con la mezcla del vector TOPO8 linearizado y el TRV2 recombinado por lo que, la probabilidad de que las bacterias se transformaran con el vector lineal TOPO8 también era alta, para esto se realizó la electroforesis del plásmido, si la banda mostrada fuese de aproximadamente 3,000 el fragmento amplificado de las colonias positivas vendrían de la transformación con dicho vector y no de la transformación con el vector TRV2, dado a que el vector TRV2 tiene un peso molecular de 12,000 pb aproximadamente, se esperaba una banda definida por arriba de la banda de 10,000 pb del marcador de peso molecular, sin embargo, las

bandas de los vectores se observaron por debajo de la banda de los 10000 pb, lo cual puede ser debido a la forma que el vector circular tome al migrar entre el agar. Aun estando por debajo de los 10,000 pb se tomaron como positivas, sabiendo que el peso está por encima de los 3,000 pb del peso aproximado del vector TOPO8, verificando así que la amplificación del gen *PSY* en la PCR de colonia procedía de los vectores TRV2.

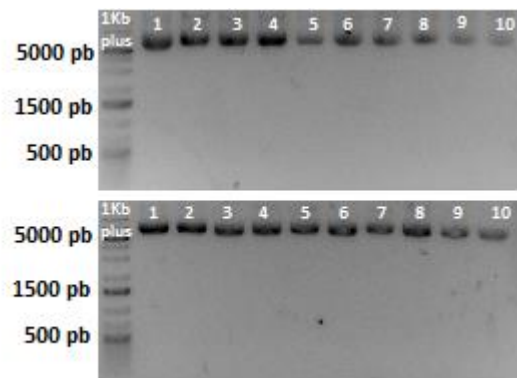


Figura 7. Electroforesis de plásmidos de las colonias positivas para el fragmento del gen *PSY*.

Con los plásmidos anteriores se transformaron bacterias de *Agrobacterium tumefaciens* a las cuales se les realizó una PCR de colonia considerando a la colonia 1 como positiva (Figura 8), la cual se mandó a secuenciar y se le realizó un “blast” en el NCBI para comprobar que alineaban con las secuencias del gen *PSY*, dando una identidad del 96%.

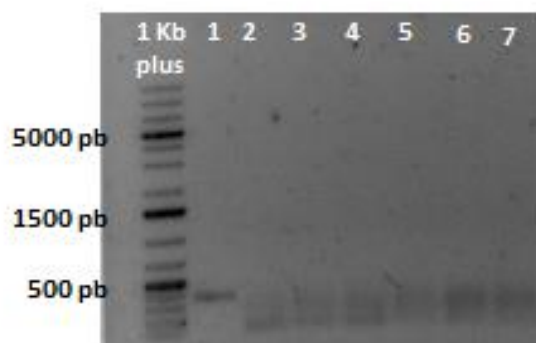


Figura 8. PCR de colonias de *A. tumefaciens* transformadas con TRV-*PSY*. En el carril marcado con 1 kb plus se muestra el marcador molecular, mientras que en el carril marcado con el número uno se encuentra la colonia 1 y así sucesivamente hasta la colonia 7.

De esta manera se obtuvieron exitosamente las dos construcciones de vectores, TRV2-*PSY* y TRV2-*GGPS* que no se muestra, porque el proceso fue exactamente el mismo.

5.2 Detección del TRV en las plantas de Chile agroinfectadas

5.2.1 Detección genotípica del TRV en las plantas de Chile agroinfectadas

A los 2 meses de realizada la agroinfección, se realizó el análisis para detectar la presencia y distribución del TRV en las plantas de Chile. La infección se realizó en los cotiledones de las plántulas de Chile, y el análisis se llevó a cabo en hojas de la parte superior de la planta cerca del ápice. La agroinfección se llevó a cabo con sepas de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas unas con TRV1 y otras con TRV2. TRV1 contiene el gen de la proteína de movimiento de célula-a-célula y TRV2 sintetiza la proteína de la cápside y además contenía cada construcción de los genes de interés; es por ello que se realizó la detección de la proteína de la cápside como prueba positiva a la infección. Con esto se confirmó que con ayuda del TRV1, TRV2 se está replicando y distribuyendo en toda la planta de Chile agroinfectada.

Para el análisis se realizó una PCR con oligonucleótidos para la amplificación del gen de la proteína de la cápside de TRV2. Como material vegetal se utilizaron hojas de plantas control (no agroinfectadas), plantas del tratamiento con las construcciones de *PSY* o *GGPS*, plantas infectadas con el TRV2 vacío y un control negativo en el cual se sustituyó el ADNc por agua inyectable. Si el virus se encontraba presente en las hojas, el fragmento amplificado al momento de analizar el producto de la PCR debería ser de 654 pb.

En la Figura 9 se puede observar que todas las plantas del tratamiento con *PSY* que sobrevivieron a la agroinfección, se encontraban infectadas con el virus, esto debido a que se observó la amplificación de una banda a 654 pb proveniente de la PCR. De igual manera sucedió con plantas tratadas con la construcción *GGPS* y TRV vacío (Figura 10), mientras que para los controles no se amplificó el fragmento, indicando que efectivamente esas plantas no se estaban infectadas con el virus.

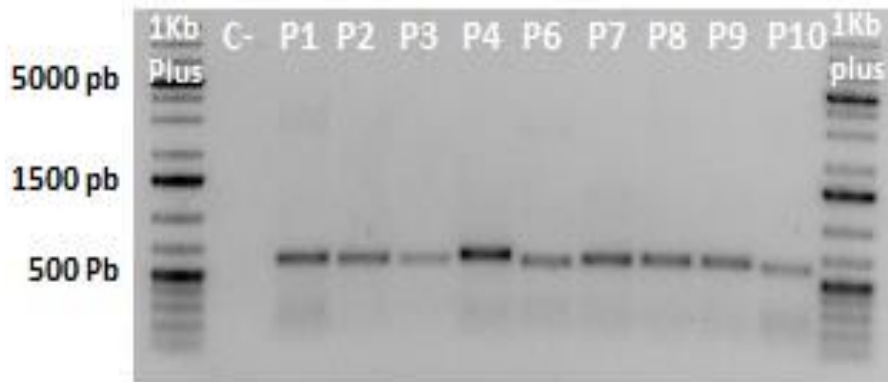


Figura 9. Detección de la presencia del virus TRV por PCR de la proteína de la cápside en las plantas del Chile agroinfectadas con TRV-PSY. En los carriles marcados como 1 kb plus se muestra el marcador de peso molecular, mientras que en el carril marcado como C- se presenta el control negativo, en los carriles marcados con la letra P seguido de un número se muestran las plantas analizadas, donde: "P" significa que es del tratamiento TRV-PSY y los números son las repeticiones.



Figura 10. Detección de la presencia del virus TRV por PCR del gen de la proteína de la cápside en plantas infectadas con el TRV2-vacío. En el carril marcado como 1 kb plus se encuentra el marcador de peso molecular, mientras que en los carriles T seguido de un número se encuentran los tratamientos TRV-Vacío.

5.2.2 Detección fenotípica del TRV en las plantas de Chile agroinfectadas

Otra manera para identificar la presencia del virus en plantas agroinfectadas, es por caracterización fenotípica. Según Yin et al., (2014), la enfermedad de este virus causa anillos necróticos también conocidos como síntomas de mosaico. En la Figura 11 se observa que las plantas infectadas con el vector TRV-PSY (Figura 11b) mostraron los síntomas de la infección viral que reporta Yin et al., (2014).

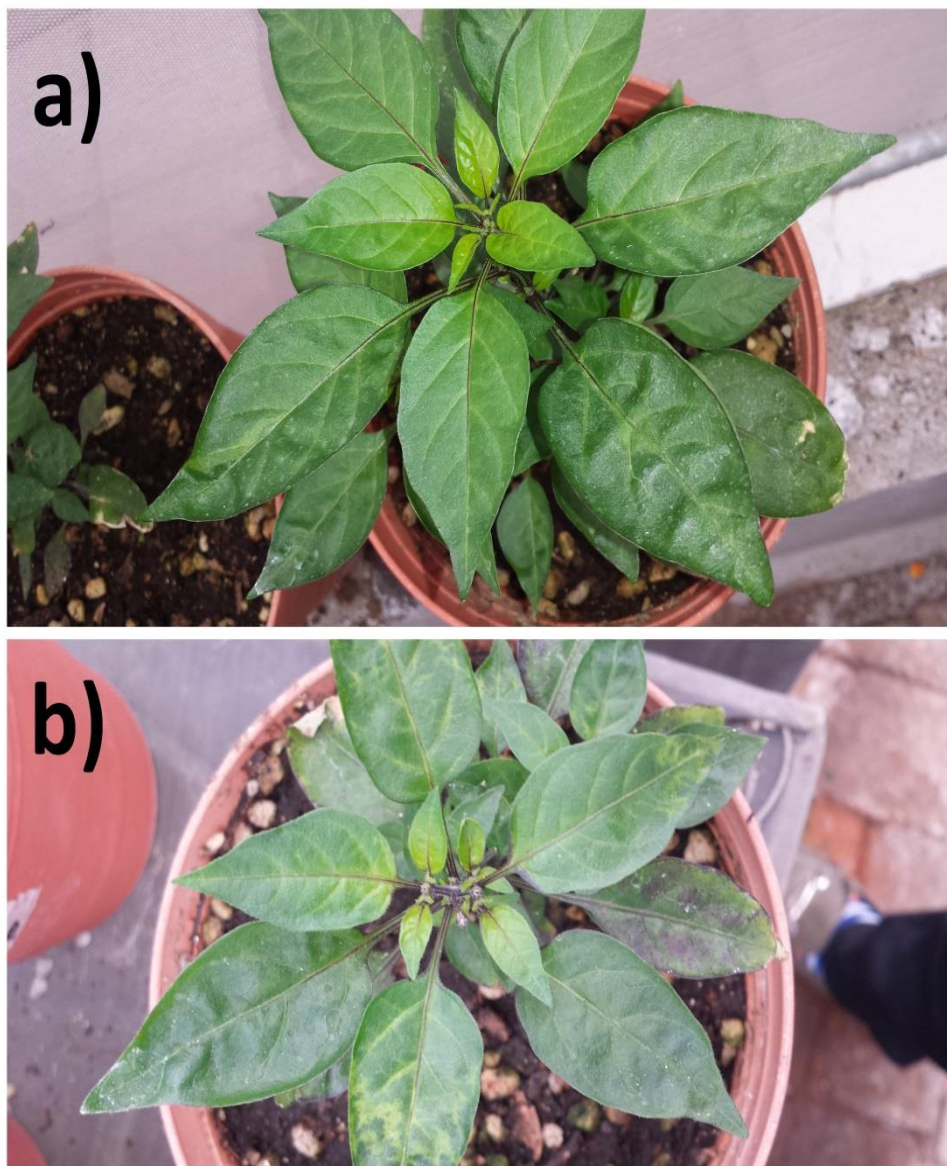


Figura 11. Fotografía de la caracterización fenotípica de plantas de *Capsicum eximium* accesión 1546 infectadas con el virus TRV. a) planta control no infectada; b) planta infectada con el TRV.

Las hojas de las plantas control (no agroinfectadas) mostraron un color verde uniforme (Figura 12a), mientras que las hojas de plantas infectadas se observaron varios síntomas, en la Figura 12b se observa el típico síntoma manchas de un color blancuzco, mientras que en otras hojas los síntomas fueron más graves, el virus provoca marchitamiento de algunas hojas con síntomas, siendo este marchitamiento parcial o total (Figura 12).

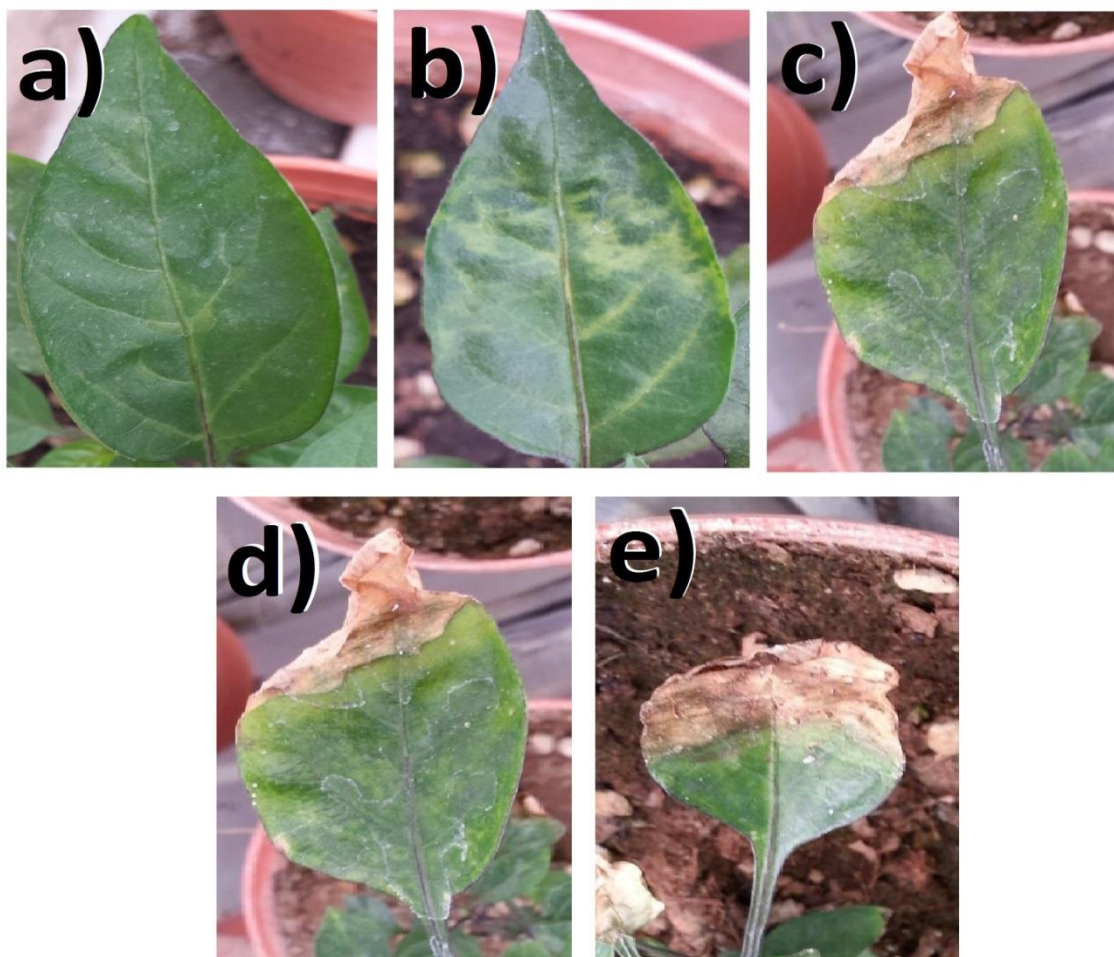


Figura 12. Fotografía de las hojas y los efectos del virus TRV en hojas de plantas de *Capsicum eximium* accesión 1546. a) hoja de planta control; b) hoja de planta agroinfectada con TRV con síntomas sin marchitamiento; c) y d) Hoja de planta agroinfectada con TRV presentando anillos necróticos y poco marchitamiento; e) Hoja de planta agroinfectada con TRV presentando un marchitamiento mayor al 70%.

Chung et al. (2004) agroinfiltraron plantas de Chile (*C. annuum*) con vectores basados en el TRV, buscando silenciar el gen PDS, mencionan que tuvieron una alta tasa de presencia de los síntomas y una persistencia a lo largo de la vida de la planta. Sin embargo, en nuestra investigación, el silenciamiento no fue en su totalidad, habiendo plantas que solamente presentaban síntomas en un 40% de sus hojas, Aguilar-Barragán (2011) y Arce-Rodríguez (2011) para elevar la presencia de los síntomas agroinfiltraron a las plantas en tres ocasiones elevando así la presencia de los síntomas, mientras que Ryu et al. (2004) compararon la eficiencia de la infiltración en hoja con el método de empapado (“drench”) de la rizósfera en *N. benthamiana* al silenciar la PDS, demostrando que el agroempapado era ligeramente más efectivo que la agroinfiltración, aunque el fenotipo tardaba de 3-4 días más en aparecer; concluyendo que el empapado de la rizósfera es una mejor opción de infección cuando se realiza en muchas plantas, cuando éstas son difíciles de infiltrar o cuando se debe realizar en plántulas que aún no presentan hojas verdaderas.

5.3 Análisis de la expresión de los genes *GGPS* y *PSY* a distintos días de maduración en frutos de *Capsicum eximium* accesión 1546

Se realizó un experimento en el cual se evaluó la expresión relativa de un gen a distintos días de post-antesis (DPA); esto para conocer en qué etapa de maduración del fruto se expresaban más los genes de interés (*GGPS* y *PSY*). Para esos análisis, se tomaron frutos en distintas etapas de desarrollo y maduración (10, 20, 30, 40, 50 y 60 DPA) de plantas control, a los cuales se les realizó el qPCR con los oligos respectivos de cada gen, para *GGPS* (directo 5'-GTTCGAGGTGGAGAAGCTACG-3' y reverso 5'-TTTTCCGAGCTCCTCTGACG-3') mientras que para *PSY* fueron el directo 5'-TCTCAAACGGGACAGGATTC-3' y reverso 5'-CCACCTTTGTTTTCCACCTC-3'. Los experimentos se realizaron por triplicado.

En la Figura 13 se observan los niveles de expresión relativa para el gen *GGPS* en frutos de chile en distintas etapas de desarrollo y maduración, dando como resultado que el gen *GGPS* se expresó en mayor nivel a los 50 DPA. De igual manera, en la Figura 14 se observan los niveles de expresión relativa para el gen *PSY* a distintos días de maduración del fruto, teniendo este gen una mayor expresión a los 50 días. Según lo reportado por Martínez-López (2013) el gen *GGPS* en frutos de chile mostró una mayor expresión a los 60 DPA, sin embargo, la expresión de dicho gen fue mayor a los 10 DPA en comparación con los de 20 y 30, empezando a subir los niveles de expresión a los 40 DPA. Algo muy similar se observa en los frutos de *Capsicum eximium*, pues a los 10 DPA fue mayor la expresión que a los 20 DPA, subiendo un poco los niveles en 30 DPA pero a los 40 DPA se observó un incremento en los niveles de expresión; esto se puede deber a que según Aguilar-Barragán (2011) en frutos de *Capsicum eximium*, la síntesis de carotenoides empieza a los 40 DPA y *GGPS* es necesario para formar a la enzima geranylgeranyl difosfato sintasa para formar geranylgeranyl difosfato (GGPP) que es un precursor para generar el fitoeno primer caroteno de 40 carbonos, que sirve para generar los carotenos del chile. La expresión del *GGPS* a los 10 DPA puede ser que se deba a que la molécula geranylgeranyl difosfato también es precursor para la síntesis de giberelinas.

Tanto para *GGPS* como para *PSY*, los niveles de expresión fueron mayores en la etapa de 50 DPA, teniendo una disminución drástica a los 60 DPA; esto se puede deber a que a los 60 DPA, los frutos están dando prioridad a la síntesis de otras proteínas encargadas de la biosíntesis de los carotenoides finales del fruto del chile: la capsantina y la capsorrubina. De la misma forma, se sugiere que posiblemente se esté

dando una regulación de los genes *GGPS* y *PSY* por la acumulación de los carotenoides finales.

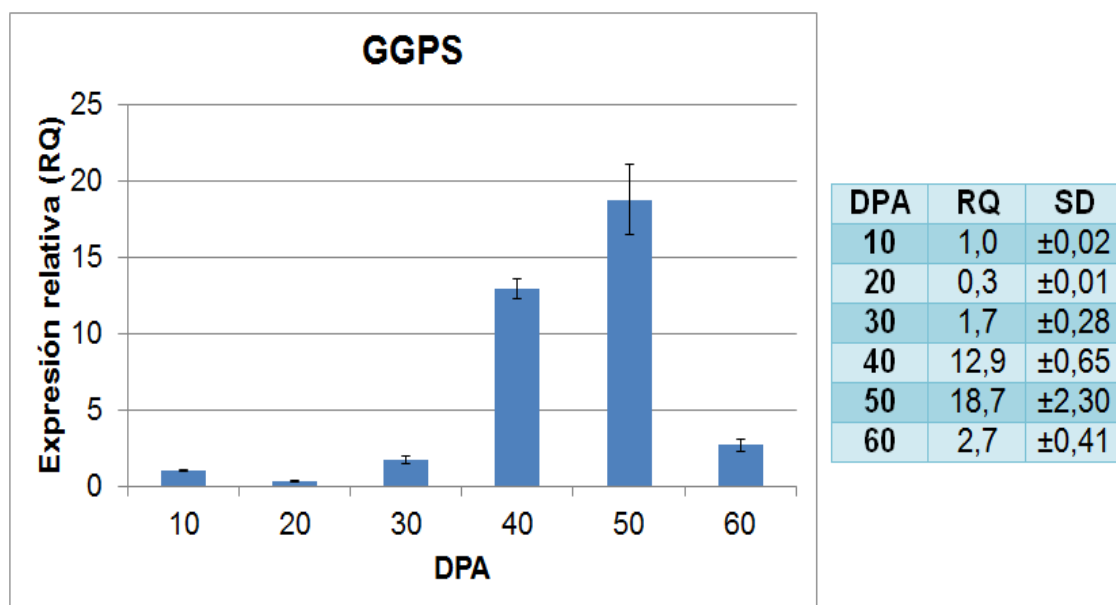


Figura 13. Análisis por qPCR de la expresión génica de *GGPS* en frutos de chile en diferentes estados de desarrollo y maduración.

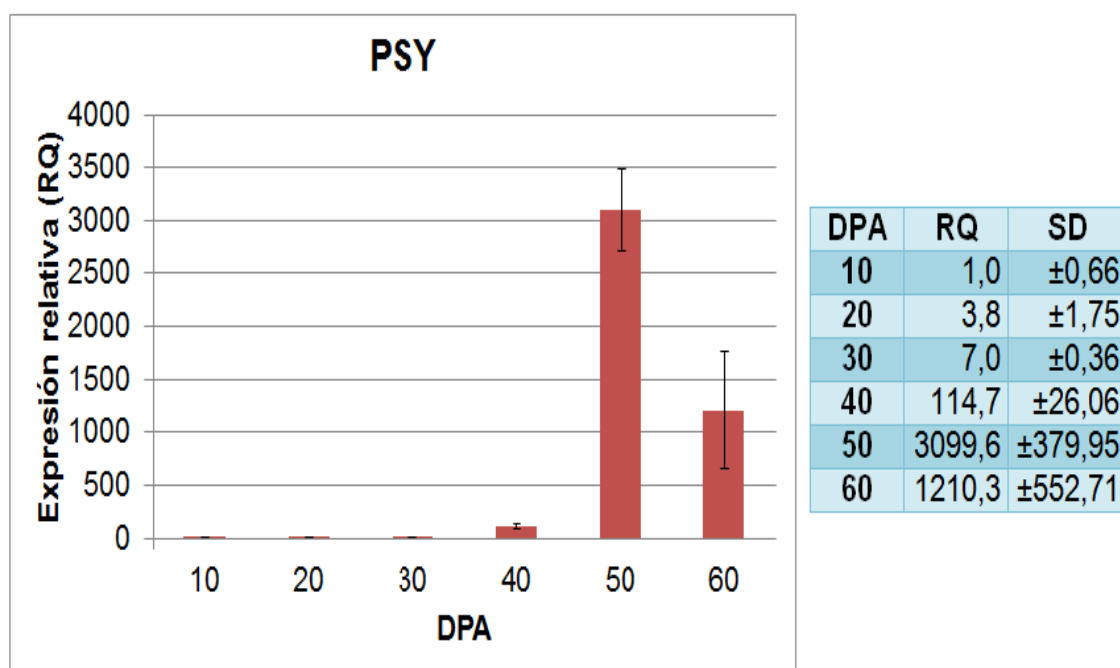


Figura 14. Análisis por qPCR de la expresión génica de *PSY* en frutos de chile en diferentes estados de desarrollo y maduración.

5.4 Cuantificación de fitoeno en frutos de 40 DPA en plantas control

Se analizó la producción de fitoeno en frutos de chile a los 40 DPA, dando como resultado que a esta etapa de maduración los frutos de *Capsicum eximium* accesión 1546, tuvieron una acumulación de 4.403 μg fitoeno por gramo de tejido fresco. Los experimentos se hicieron por triplicado de distintas plantas control, arrojando una desviación estándar de ± 0.339 .

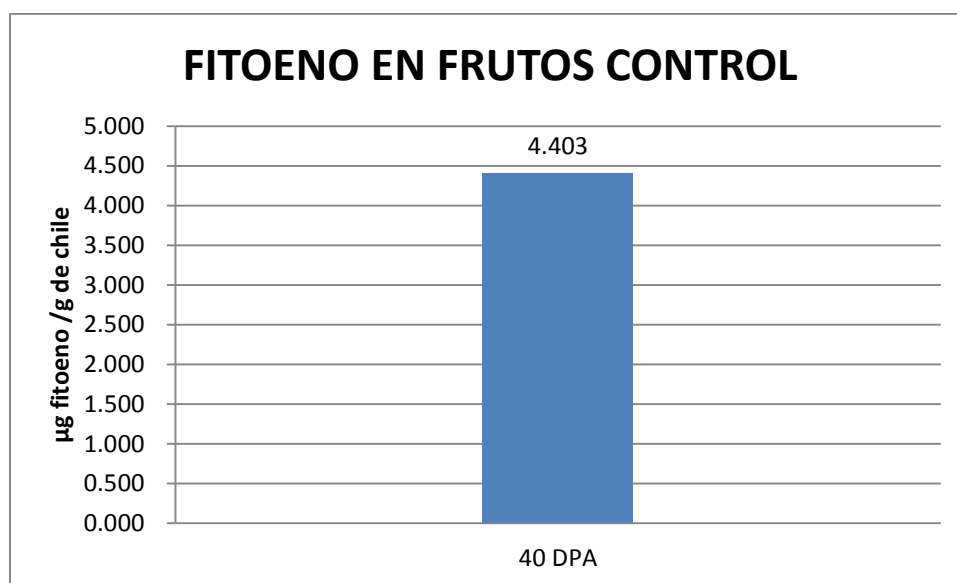


Figura 15. Producción de fitoeno en frutos de chile de 40 DPA.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

Se elaboraron las construcciones del TRV2 con fragmentos de los genes *GGPS* y *PSY* para el silenciamiento de ellos como estrategia para probar su función en la ruta de biosíntesis de los carotenoides en frutos de chile.

Se logró la infección de plantas de chile *C. eximium*; algunas de ellas no sobrevivieron pero de las que sí sobrevivieron a la agroinfección, todas dieron positivo en los análisis de detección del TRV, logrando así que todas las repeticiones en los tratamientos fueran infectadas.

Se logró la detección de los niveles de expresión de los genes *GGPS* y *PSY* en los frutos de *Capsicum eximium* accesión 1546, tanto para *GGPS* como *PSY* la mayor expresión de esos genes ocurrió a los 50 DPA.

Habría que esperar los frutos de las plantas silenciadas y de los demás tratamientos, para así evaluar el efecto del silenciamiento génico inducido por TRV. Se espera que los frutos de las plantas silenciadas (TRV-GGPS y TRV-PSY) presenten una disminución tanto en la expresión de los genes *GGPS* y *PSY* como en la producción de fitoeno, en comparación con las plantas control, por el contrario, las plantas del tratamiento TRV-vacío, se espera que no tenga efecto alguno sobre la formación de fitoeno y la expresión de los genes, esto porque el vector no contiene ningún fragmento de genes de la ruta de biosíntesis de carotenoides y no habría razón por la cual ésta se vea afectada.

Se espera también realizar la determinación de la acumulación de fitoeno con respecto a los días de maduración; esto para evaluar los niveles de dicho metabolito en distintas etapas de desarrollo de los frutos de Chile.

6.2 Recomendaciones

Con el fin de ahorrar reactivos y material de trabajo, algunos métodos fueron modificados; los resultados fueron los esperados, no obstante es necesario utilizar los “kits” según lo marca el proveedor.

Con el fin de evitar la contaminación de los oligonucleótidos o cualquier solución a preparar, es recomendable preparar las soluciones se utilizan en la biología molecular en una campana de flujo laminar; esto debido a que algunas soluciones de trabajo se contaminaron durante el desarrollo del presente trabajo.

Se tuvieron algunos problemas para la obtención del ARN de buena calidad de las hojas de las plantas, pues el ARN se degradaba muy fácilmente, por lo que se modificó el protocolo establecido para el uso del “kit”, por ejemplo. En el “kit” se decía que se podían realizar la extracción a temperatura ambiente, pero siguiendo esa instrucción el ARN se degradaba, entonces se modificó la metodología, colocando todas las muestras en hielo y se trabajó siempre sobre el hielo.

Al momento de realizar la curva estándar, el disolvente se evaporaba rápidamente, así que, los viales a usar deben estar previamente fríos y ser nuevos, dado a que al reutilizar algunos viales, las tapas de éstos ya estaban perforadas y por ello que se evaporaba el disolvente.

Las plantas de Chile deben ser regadas cada tercer día y fertilizadas cada dos semanas.

7. Competencias desarrolladas

Durante el desarrollo de la residencia profesional se lograron alcanzar las siguientes competencias específicas del perfil de egreso de la licenciatura de Ingeniería Bioquímica:

1. Trabajar en equipos multidisciplinarios y multiculturales con liderazgo, sentido crítico, disposición al cambio y comprometido con la calidad.
2. Realizar investigación científica y tecnológica en el campo de la Ingeniería Bioquímica y difundir sus resultados.
3. Identificar y aplicar tecnologías emergentes relacionadas con el campo de acción del Ingeniero Bioquímico.

De los cuales me permitió alcanzar las siguientes competencias genéricas como:

1. Capacidad de análisis y síntesis
2. Capacidad de organizar y planificar
3. Comunicación oral y escrita
4. Habilidades básicas de manejo de la computadora
5. Habilidad para buscar y analizar información proveniente de fuentes diversas
6. Capacidad crítica y autocrítica
7. Trabajo en equipo
8. Habilidades de investigación
9. Capacidad de aprender

10. Habilidad para trabajar en forma autónoma

11. Capacidad de generar nuevas ideas

8. Bibliografía

- Aguilar Barragán, B. A. (2011). *Estudio del papel regulatorio de los factores de transcripción tipo myb, myc y wd40 en la ruta de biosíntesis de antocianinas en frutos de chile (Capsicum spp.) por medio de su silenciamiento génico inducido por virus*. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Biotecnología de Plantas: CINVESTAV- Unidad irapuato.
- Arango, J. (2006). *Análisis de expresión de los genes de la ruta biosintética de carotenos, y cuantificación de carotenos en hojas y raíces de plantas de yuca a diferentes edades*. Tesis de licenciatura para obtener el grado de biólogo: Pontifica Universidad Javeriana.
- Arce-Rodriguez, L. (2011). *Identificación de factores de transcripción MYB involucrados en la regulación de genes de la ruta de biosíntesis de capsicinoides en frutos de chile (Capsicum spp.)*. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Biotecnología de Plantas: CINVESTAV- Unidad irapuato.
- Beltrán, B., Estévez, R., Cuadrado, C., Jiménez, S., y Olmedilla Alonso, B. (2012). Base de datos de carotenoides para valoración de la ingesta dietética de carotenos, xantofilas y de vitamina A; utilización en un estudio comparativo del estado nutricional en vitamina A de adultos jóvenes. *Nutrición Hospitalaria* 27, 1334-1343.
- Chung, E., Seong, E., Kim, Y., Chung, E., Oh, S., Lee, S., y Choi, D. (2004). *A method of high frequency virus-induced gene silencing in chili pepper (Capsicum annum L.)*. *Molecules and Cells*, 17:377-380.
- GE Healthcare. (2014). Illustra™ GFX™ PCr DNA and gel band purification kit. Reino Unido.
- Guzman, I., Hamby, S., Romero, J., Bosland, P. W., y O'Connell, M. A. (2010). Variability of carotenoid biosynthesis in orange colored *Capsicum* spp. *Plant Science* 179, 49-59.
- Hruz, T., Wyss, M., Docquier, M., Pfaffl, M., Masanetz, S., Borghi, L., y Zimmermann, P. (2011). identification of reliable and condition specific reference genes for RT-qPCR data normalization. *BioMed Central Journals*, 12: 156.
- Invitrogen. (2014a). PCRTM 8/GW/TOPOR TA cloning kit. Alemania.
- Invitrogen. (2014b). PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit. Alemania.
- Invitrogen. (2014c). PureLink™ RNA Mini kit. EUA.
- Lilly, S., Drummond, R., y Pearson, M. (2011). Identification and validation of reference genes for normalization of transcripts from virus-infected *Arabidopsis thaliana*. *The American Phytopathological Society* , 24: 294-304.

- Liu, Y., Schiff, M., Marathe, R., y Dinesh-Kumar, S. P. (2002). Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *The Plant Journal*, 415-429.
- Martínez-López, A. (2013). *Análisis del transcriptoma de frutos de chile serrano Tampiqueño 74 (Capsicum annuum L.) durante diferentes estadios de desarrollo*. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Biotecnología de Plantas: CINVESTAV- Unidad irapuato.
- Ochoa-Alejo, N., y Aguilar-Barragán, A. (2014). Virus-induced silencing of MYB and WD40 transcription factor genes affects the accumulation of anthocyanins in chilli pepper fruit. *Biología Plantarum* 58, 567-574.
- Ochoa-Alejo, N., y Gómez-García, M. d. (2013). *Biochemistry and molecular biology of carotenoid biosynthesis in chili peppers (Capsicum spp.)* International Journal of Molecular Sciences 14, 19025-19053.
- Ryu, C., Anand, A., Kang, L. y Mysore, K. (2004). *Agrodrench: a novel and effective agroinoculation method for virus-induced gene silencing in roots and diverse solanaceous species*. *The Plant Journal*, 40:322-331.
- SAGARPA. (2012). *Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación*. Recuperado el 22 de Octubre de 2014, de <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/yucatan/boletines/Paginas/201208B058.aspx>
- Wahyuni, Y., Ballester, A. R., Sudarmonowati, E., Bino, R. J., y Bovy, A. G. (2011). Metabolite biodiversity in pepper (*Capsicum*) fruits of thirty-two diverse accessions: Variation in health-related compounds and implications for breeding. *Phytochemistry* 1358-1370.
- Yin, Z., Pawełkiewicz, M., Michalak, K., Chrzanowska, M., y Zimnoch-Guzowska, E. (2014). The genomic RNA1 and RNA2 sequences of the tobacco rattle virus. *Virus Research*, 110-113.
- Zegbe, J. A., y Valdez, R. (2012). *Cultivo del chile en México. Vol.35*. Mexico: Universidad Autónoma de Zacatecas.

9. Anexos

Anexo 1. Protocolo para cuantificación de fitoeno por HPLC

Laboratorio de cromatografía, edificio E-3, Cinvestav-Unidad Irapuato

Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y Manipulación Genética de plantas L-8, edificio E-2, Cinvestav-Unidad Irapuato.

❖ Equipo / Materiales

- HPLC Agilent Technologies
- Columna Nucleosil[®] C-18 AB (250x4.6mm; 5µm)
- Viales para HPLC Agilent Technologies (2ml)
- Insertos para vial
- Micro pipetas (2-20 µl y 20-200 µl)
- Puntas para pipeta de 200 µl
- Frascos de vidrio
- Probetas
- Cubo de unicel
- Vortex
- Centrifuga

❖ Reactivos

- Acetonitrilo grado HPLC (J.T. Baker)
- Acetato de etilo ACS (KEM) (debería ser grado HPLC)
- Fitoeno estándar (Sigma 78903-1mg)
- Éter de petróleo 35 – 60 °C ACS (Fermont-06321)
- Agua grado HPLC
- Hielo

Procedimiento:

- Preparación de la solución madre.

Se diluyó el fitoeno (1mg) en 1ml de éter de petróleo para obtener una concentración de 1mg/ml (1000ppm). El mililitro se transfirió a un vial color ámbar y se guardó al REVCO a -80°C.

NOTA: El éter de petróleo es muy volátil por lo que, se trabajó en un cuarto frío y oscuro dado que el fitoeno es sensible a la luz. El fitoeno se centrifugó antes de diluir para asegurar que se encontraba en el fondo de la ampolleta.

➤ Preparación de la curva estándar.

Se preparó una solución de trabajo la cual sirvió para la calibración del equipo (se probaron varias columnas y varios solventes) y la preparación de la curva estándar, en un vial se transfirieron 0.6 ml de la solución madre (1000ppm) y se guardó a -20°C para su uso.

Diluciones para la curva estándar (Solución madre 1000ppm)

Concentración final del fitoeno estándar (ppm)	Volumen de la solución madre del fitoeno (μl)	Volumen del éter de petróleo (μl)
0	0	200
10	2	198
20	4	196
30	6	194
40	8	192
50	10	190
60	12	188
70	14	186
80	16	184
90	18	182
100	20	180

Las preparaciones se hicieron sobre insertos para viales que se encontraban dentro del vial.

NOTA: Todo se trabajó con puntas, viales e insertos estériles bajo las condiciones de obscuridad y frío. Las muestras se guardaron a -20°C hasta su análisis en el HPLC.

➤ Análisis de las muestras

Las muestras fueron analizadas en el HPLC Agilent Technologies, usando una columna Nucleosil[®] C-18 AB (250x4.6mm; 5μm) con un flujo de 1ml/min. La detección del fitoeno se llevó a cabo a una longitud de onda de 288 nm. El volumen de la muestra inyectada en la columna fue de 20μl. El tiempo de retención fue de aproximadamente 20 minutos.

Las fases móviles usadas fueron:

A: Acetato de etilo (100%)

B: Acetonitrilo: Agua (9:1 v/v)

Y fue aplicado con un gradiente:

Tiempo (min)	Porcentaje de la fase A (%)
0-16	0-60
16-30	60
30-35	100

NOTA: Siempre conservar frías las muestras, antes del análisis por HPLC se le dio un toque de vortex. Las fases móviles fueron preparadas en campana de extracción, el frasco con la fase A fue colocada en un cubo de unicel con hielo.

La fórmula de la curva patrón fue la siguiente:

$$A = 78,05307(ppm) - 152,63588$$

Dónde:

A= Área bajo la curva (dato obtenido en el equipo HPLC)

ppm= partes por millón

Anexo 2. Protocolo para extracción y cuantificación de fitoeno por HPLC

Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y Manipulación Genética de plantas L-8, edificio E-2, Cinvestav-Unidad Irapuato.

❖ Equipo / Materiales

- Micro pipeta (1000 µl)
- Puntas para pipeta de 1000 µl
- Cubo de unicel
- Vortex
- Centrifuga (refrigerada)
- Mortero
- Pistilo
- Espátula de plástico
- Tubos falcon de 15 ml
- Vials para HPLC Agilent Technologies (2ml)

❖ Reactivos

- Agua destilada estéril
- Acetona
- Éter de petróleo
- Nitrógeno líquido
- Hielo

Procedimiento:

1. Se colectaron frutos de chile (*Capsicum eximium* accesión 1546) de 40 DPA.
2. Se le quitó el tejido placentario y las semillas, dejando solamente el pericarpio.
3. Se pesó 1g del tejido de pericarpio y se colocó sobre el mortero (que previamente se dejó enfriar agregando un poco de nitrógeno líquido), se le agregó nitrógeno líquido al mortero y colocaron los chiles, éstos fueron triturados hasta obtener un polvo fino. Posteriormente con ayuda de la espátula se transfirió a un tubo Falcon de 15ml.
4. Se le agregó 1 ml de acetona y 1 ml de éter de petróleo (Agitar con Vortex por 20 segundos).
5. Se centrifugó a 3000rpm a 10 °C, por 10 min.

6. Se separó la fase orgánica y se transfirió a un tubo Falcon de 15ml nuevo y estéril (el tubo se dejó en un cubo de unicel con hielo en lo que se seguía el protocolo).
7. El pellet del primer tubo se resuspendió con 1ml de acetona y 1ml de éter de petróleo.
8. Se agitó en el Vortex por 20 segundos y se centrifugó a 3000rpm a 10 °C, por 10 min.
9. Se separó la fase acuosa y se mezcló con el tubo del paso 6.
10. Al tubo del paso 6 se le adicionaron 2ml de agua destilada estéril y se agitó brevemente en el Vortex.
11. Se centrifugó a 3000rpm a 10 °C, por 1 min.
12. La fase éter se transfirió a un vial agilent color ámbar.
13. Se analizó en el HPLC según el protocolo anteriormente descrito (en caso de no analizarse en seguida de la extracción se guardaba a -80 °C en los refrigeradores REVCO).

NOTA: El fitoeno es sensible a la luz, el aire y la temperatura, por lo anterior mencionado, se trabajó en un cuarto frío y oscuro.