



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC

**EFFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN EN *Arabidopsis thaliana* DE LOS
GENES HOMÓLOGOS A LOS INVOLUCRADOS EN LA BIOSÍNTESIS DEL
COMPUESTO ANTIFÚNGICO PERSINA EN AGUACATE HASS
(*Persea americana*)**

Presenta:

IBQ. GLORIA ARLETTE RODRÍGUEZ AGUIRRE

TESIS PROPUESTA A LA DIVISIÓN DE ESTUDIO DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIA EN ALIMENTOS

Director: Dra. Martina Alejandra Chacón López

Co-Director: Dra. Selene Aguilera Aguirre

Tepic, Nayarit, a 4 Abril de 2019

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios y a mi familia por darme la oportunidad de llegar y cumplir con esta etapa de mi vida como profesional. A mis padres por su cariño, además de su apoyo incondicional en todo momento de mi vida. A mi hermano por su apoyo y siempre estar ahí para escucharme en momentos buenos y difíciles durante mi formación.

Gloria Arlette Rodríguez Aguirre

AGRADECIMIENTOS

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado durante la realización de mis estudios de Maestría mediante la beca otorgada durante los dos años de mi formación académica (No. CVU 823417).

A la Dra. Alejandra Chacón López, director de tesis, por permitirme participar en la realización en este proyecto de investigación, en especial participar en el área de biología molecular ya fue un nuevo aprendizaje dentro de mi formación, por compartir su conocimiento, por su asesoría, disponibilidad, además de fomentar la investigación en mí.

Al Dr. Fulgencio Alatorre Cobos por su recibimiento en su grupo de trabajo durante mi estancia de investigación en el COLPOS-Campeche, por la aportación para la realización de este proyecto de investigación. Gracias por su asesoría, enseñanza, y sobre todo su tiempo dedicado hacia mí para lograr el desarrollo de este proyecto, por la confianza de poder resolver alguna duda, sus consejos, además por su motivación por aprender cosas nuevas.

A la Dra. Selene Aguilera Aguirre, co-director de tesis, por su participación en el proyecto, su aportación de propuestas, por compartir su conocimiento, por la confianza y disponibilidad para atender y revisar avances referentes al proyecto.

Al Dr. Ulises Miguel López García por sus aportaciones realizadas y compartir su conocimiento durante la revisión de los avances del proyecto además sus consejos brindados sobre mi etapa profesional.

A mis amigas Lilia, Miriam y Tania gracias por su amistad, sobre todo por el apoyo que me brindaron durante este tiempo que trabajamos juntas, por su ayuda, sus consejos, su motivación, por estar en los momentos buenos y difíciles durante esta etapa de mi vida.

A todos mis compañeros de Laboratorio Liz, Laura, Edwin, Mónica, Lupita, Sarahy, por todo este tiempo de convivencia, amistad, pero sobre todo por el apoyo brindado.

RESUMEN

El aguacate es de los cultivos importantes en México; sin embargo, la comercialización de este fruto es reducida debido a pérdidas generadas por el desarrollo de enfermedades causadas por fitopatógenos como *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal de la antracnosis. Se ha reportado que el fruto de aguacate en madurez fisiológica, contiene compuestos con actividad antifúngica, entre los cuales se encuentra (12z, 5z)-1-acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-12,15-diene (persina) que inhibe el desarrollo de este fitopatógeno. Los genes *Avfae 1*, y *Avfad 12-3*, están involucrados en la biosíntesis de persina, y aumentan su expresión al inducir el sistema de defensa del fruto, aún cuando éste ha alcanzado su madurez de consumo, proporcionándole mayor resistencia al ataque del hongo. Este trabajo presenta una propuesta para evaluar el efecto de la sobreexpresión en *Arabidopsis thaliana* de los genes homólogos a los involucrados en la biosíntesis del compuesto antifúngico persina. Para realizar esta sobreexpresión primeramente se realizó un análisis bioinformático donde se determinó el gen con mayor homología a *Avfae 1* en *A. thaliana* que fue *At5g43760* y para el gen *Avfad 12-3* su homólogo fue *At3g12120*. Posteriormente se realizó la extracción de RNA total de *A. thaliana* cuya concentración fue de 423 ng/ μ L, para posteriormente obtener cDNA. A partir del cDNA se lograron obtener los amplicones de ambos genes. Después se obtuvo una clonación de cada gen para su posterior introducción en *Agrobacterium tumefaciens* y realizar la transformación de *A. thaliana*. Las líneas transformadas obtenidas, mostraron algunas diferencias en su fenotipo, la sobreexpresante del gen *At3g12120* mostró color de las hojas más intenso, cambio en la estructura de la raíz y las inflorescencias se presentaron más temprano en el desarrollo de la planta con respecto al testigo. En el caso de la sobreexpresión del gen *At5g43760* se presentó en su fenotipo un cambio en la estructura del tallo (etiolación). Finalmente, con respecto a la evaluación de la actividad antifúngica de los extractos obtenidos a partir de las líneas sobreexpresantes, mostraron un porcentaje de inhibición sobre el hongo *C. gloeosporioides* del 45% (*At3g12120*) y 20% (*At5g43760*), lo cual podría ser una estrategia de control al ataque de este hongo.

ABSTRACT

The avocado is an important crop in Mexico. However, the commercialization of this fruit is reduced due to losses generated by the development of diseases caused by phytopathogens such as *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of anthracnose. It has been reported that avocado fruit in physiological maturity, contains antifungal compounds, among which is (12z, 5z) -1-acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-12,15-diene (persin) that inhibits the development of this phytopathogen. The genes *Avfad 1*, and *Avfae 12-3*, are involved in persin biosynthesis, and increase its expression by inducing the fruit defense system, even when it has reached its ripeness of consumption, providing greater resistance to fungus attack. This work presents a proposal to evaluate the effect of overexpression in *A. thaliana* of genes homologous to those involved in the biosynthesis of antifungal compound persin. To perform this overexpression, a bioinformatic analysis was carried out, the gene with more homology to *Avfae 1* was determined in *A. thaliana* it was *At5g43760*, for the *Avfad gene 12-3* its homologue was *At3g12120*. Afterwards the extraction of total RNA of *A. thaliana* was carried out, its concentration was 423 ng/ μ L, to subsequently obtain cDNA. From the cDNA, the amplicons of both genes were obtained. Then, a cloning of each gene was obtained for its later introduction in *Agrobacterium tumefaciens* in order to carry out the transformation of *A. thaliana*. The transformed lines showed some differences in their phenotype, the over-expression of *At3g12120* gene showed more intense color in leaves, changes in the root structure and earlier inflorescences in the development plant in comparison with a control. The over-expression of *At5g43760* gene showed a change in the structure of the stem (etiolation). Finally, the antifungal activity evaluation of the obtained extracts from the overexpressant lines, showed a percentage of inhibition on *C. gloeosporioides* of 45% (*At3g12120*) and 20% (*At5g43760*), which could be a control strategy to attack of this fungus.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Generalidades del fruto de Aguacate	4
2.2 Importancia del fruto de Aguacate.....	5
2.3 Problemas fitosanitarios del fruto de aguacate.....	5
2.4 Compuestos antifúngicos en el fruto de aguacate.....	6
2.5 Características de la persina	7
2.5.1 Biosíntesis de la persina	8
2.5.2 Actividad antifúngica de la persina en frutos de aguacate.....	8
2.6 <i>Arabidopsis thaliana</i>	10
2.6.1 Ventajas del uso <i>A. thaliana</i> en Ingeniería genética.....	12
2.7 Herramientas moleculares de DNA recombinante. El sistema Gateway....	12
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVOS	22
Objetivo General	22
Objetivos Específicos.....	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS	24
6.1 Diagrama General	24
6.2 Análisis Bioinformático.....	25
6.3 Diseño de oligonucleótidos.....	25

6.4	Obtención de plantas de <i>A. thaliana</i>	25
6.5	Extracción RNA de <i>A. thaliana</i>	26
6.6	Cuantificación e Integridad del RNA de <i>A. thaliana</i>	27
6.7	Amplificación de los genes de interés a partir de cDNAs	27
6.8	Análisis de restricción de los fragmentos amplificados	30
6.9	Preparación células electrocompetentes de <i>E. coli DH5α</i>	30
6.10	Reacción de recombinación BP de clonación sistema Gateway	31
6.10.1	Transformación de <i>E. coli</i> con el plásmido <i>pDONR 221</i>	32
6.10.2	Selección de colonias transformadas	33
6.10.3	Extracción de DNA plasmídico	34
6.11	Reacción recombinación LR de clonación sistema Gateway	34
6.11.1	Transformación de <i>E. coli</i> con el plásmido <i>pB7WG2</i>	35
6.11.2	Transformación de <i>A. tumefaciens</i> con el plásmido <i>pB7WG2</i>	36
6.11.3	Transformación de <i>A. thaliana</i> mediante <i>A. tumefaciens</i>	36
6.12	Selección de líneas de <i>A. thaliana</i> transformadas	37
6.13	Obtención de extractos de plantas de <i>A. thaliana</i> transformadas	37
6.14	Evaluación de la actividad antifúngica <i>in vitro</i> de los extractos	38
6.14.1	Determinación de la inhibición del crecimiento micelial de <i>C. gloeosporioides</i>	38
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
7.1	Análisis Bioinformático	40
7.2	Extracción de RNA de plantas de <i>A. thaliana</i>	43

7.3 Síntesis de cDNA a partir de RNA de <i>A. thaliana</i>	46
7.4. Amplificación de los genes <i>At5g43760</i> y <i>At3g12120</i> de <i>A. thaliana</i>	46
7.5 Clonación Sistema Tecnología Gateway	49
7.6 Transformación de <i>A. tumefaciens</i>	52
7.7 Obtención de plantas <i>A. thaliana</i> de transformadas	53
7.8 Fenotipo de las plantas sobreexpresates.	54
7.9 Actividad antifúngica <i>in vitro</i> de los extractos de la plantas de <i>A. thaliana</i> sobreexpresantes.	59
8. CONCLUSIONES.....	64
9. BIBLIOGRAFÍA	66
10. ANEXOS	76

Índice de Figuras

Figura 2.1. Características físicas del fruto de aguacate.....	4
Figura 2.2. Relación estructural entre persina y ácido linoleico.....	7
Figura 2.3. Aspecto morfológico de <i>Arabidopsis thaliana</i>	11
Figura 2.4. La reacción de excisión de sitios Gateway.	14
Figura 2.5. El Sistema Gateway de clonación	15
Figura 6. 1. Diagrama general de metodología empleada.....	24
Figura 6. 2 Condiciones de amplificación de los genes específicos.	29
Figura 6. 3. Representación esquemática del vector de entrada pDONR 221™. 32	
Figura 6.4. Representación esquemática del vector de salida pB7WG2.....	35
Figura 7. 1. Nivel de expresión de genes en planta de <i>A. thaliana</i>	43
Figura 7. 2. Cultivo de <i>A. thaliana</i>	44
Figura 7. 3. RNA extraído de <i>A. thaliana</i>	45
Figura 7. 4. RT-PCR del gen de actina2..	46
Figura 7. 5. Amplificación de los genes <i>At5g43760</i> y <i>At3g12120</i>	47
Figura 7. 6. Análisis de restricción de los genes <i>At3g12120</i> y <i>At5g43760</i>	48
Figura 7. 7. Análisis de restricción para los genes <i>Atg3g12120</i> y <i>At5g43760</i>	49

Figura 7. 8. PCR en colonia para comprobar la reacción de recombinación BP.	50
Figura 7. 9. PCR en colonia para comprobar la reacción de recombinación LR.	51
Figura 7. 10. PCR en colonia genes <i>At3g12120</i> y <i>At5g43760</i>	52
Figura 7. 11 Transformación de plantas de <i>A. thaliana</i>	53
Figura 7. 12. Selección de la semilla transformada de <i>A.thaliana</i>	54
Figura 7. 13. Fenotipos de Plantas sobreexpresantes <i>A. thaliana</i>	55
Figura 7. 14. Análisis histológico de plantas sobreexpresantes.....	57
Figura 7. 15. Comparación de evaluación antifúngica de los extractos.....	60
Figura 7. 16. Comparación de evaluación antifúngica de los extractos.....	61

Índice de tablas

Tabla 1.Oligonucleótidos utilizados para las amplificaciones.	29
Tabla 2.Genes homólogos de <i>A. thaliana</i> al gen <i>At3g43760</i>	41
Tabla 3. Gen homólogo de <i>A. thaliana</i> al gen <i>At3g12120</i>	41

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El aguacate es uno de los cultivos más importantes en México, por lo que ocupa el tercer lugar en productos agroalimentarios de exportación (SAGARPA, 2017). Sin embargo, la comercialización exitosa del aguacate, a menudo es reducida por diversos factores como son las condiciones ambientales adversas, el ataque de plagas y el desarrollo de enfermedades causadas por fitopatógenos (Gutiérrez *et al.*, 2010).

Una de las principales enfermedades que se presentan en el fruto de aguacate es la antracnosis, cuyo agente causal es el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* el cual, ocasiona pérdidas cercanas al 20% del total de la producción (Djami, Allie, & Straker, 2013). Se ha reportado que cuando el fruto de aguacate está en etapa de madurez fisiológica, se inhibe el desarrollo de este fitopatógeno, lo cual se ha relacionado con la presencia de compuestos antifúngicos preformados que se encuentran principalmente en el exocarpo del fruto. Entre los principales compuestos antifúngicos se ha identificado el (12z, 5z)-1-acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicososa-12,15-diene (persina) (López, 2010). Por otro lado, se ha reportado que a medida que avanza la maduración del fruto durante la poscosecha, las concentraciones de los compuestos antifúngicos van disminuyendo, haciendo al fruto susceptible a desarrollar enfermedades de origen fúngico. Se ha reportado que los genes *Avfae1*, *Avfad12-3* están involucrados en la biosíntesis del compuesto persina (Wang *et al.*, 2006).

En estudios previos se observó que estos genes se sobreexpresan al inducir el sistema de defensa del aguacate, aún cuando éste alcanza la madurez de consumo, lo que proporciona al fruto resistencia frente al ataque de *C. gloeosporioides* (Xoca *et al.*, 2019). En este sentido, se puede inferir que si estos genes se encuentran sobreexpresados a lo largo de la vida poscosecha del fruto

de aguacate, éste puede ser menos vulnerable al ataque de los hongos, preservando así su vida de anaquel.

La manipulación para sobreexpresar genes dentro del sistema biológico de origen, en este caso el aguacate, se torna complicado dado que no se cuenta con los protocolos de transformación estandarizados para llevarlo a cabo. De acuerdo con esto, es conveniente recurrir a sistemas vegetales previamente caracterizados, como *Arabidopsis thaliana*. Esta planta se ha empleado como modelo vegetal ya que además de tener el genoma completamente secuenciado, se cuenta con herramientas genéticas y protocolos de transformación estandarizados, con lo que se facilita el estudio de genes específicos.

Por consiguiente, dada la importancia del estudio de los genes descritos anteriormente, en el presente trabajo se propuso analizar el efecto de la sobreexpresión de los genes homólogos a los involucrados en la biosíntesis del compuesto antifúngico persina en aguacate, en *Arabidopsis thaliana*, para dilucidar su participación en la defensa de frutos de aguacate contra *C. gloeosporioides*. Los resultados obtenidos sustentarán alternativas basadas en genética funcional para inhibir el desarrollo de enfermedades causadas por hongos que provocan una disminución en la producción agrícola de aguacate.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades del fruto de Aguacate

El árbol de aguacate (*Persea americana*) pertenece a la familia de las Laureáceas dicotiledóneas y es originario de las regiones de Centroamérica. Los frutos son bayas piriformes de aproximadamente 12 x 9 a 15 x 10 cm, con exocarpio verde oscuro y numerosas escamas morenas. Su mesocarpio es carnoso de color amarillo claro al interior y verde hacia el exterior, conteniendo una semilla ovoide de 5 a 6 cm (Figura 2.1). La porción amarilla del mesocarpio debe su color a los pigmentos β -caroteno, criptoxantina, luteína, crisantemaxantina e isoluteína (Mendoza, 2010).



Figura 2.1. Características físicas del fruto de aguacate. Fuente: Mendoza, 2010.

El fruto de aguacate posee un papel importante en la nutrición humana, debido a sus propiedades nutricionales como son su contenido de ácidos oleico, palmítico, linoleico, palmitoleico y ácido esteárico; además de vitaminas A, B, C, E, K y fibra (Bill *et al.*, 2014).

2.2 Importancia del fruto de Aguacate

El aguacate es uno de los cultivos más importantes de México, ocupando el tercer lugar en productos agroalimentarios de exportación (SAGARPA, 2017). A nivel mundial, México es el principal productor de aguacate donde la producción de este fruto ha crecido de manera constante, lo que se debe en gran medida, a la aceptación y popularidad del producto mexicano en el mercado nacional e internacional (FAOSTAT, 2017).

En el 2016, se obtuvo una producción de un 1, 664,000 toneladas. Cabe señalar que las ventas de aguacate fueron de 2,227 millones de dólares, siendo así un producto de gran importancia para el desarrollo económico de México (FAOSTAT, 2016; SIAP, 2016). Sin embargo, la comercialización exitosa del aguacate es a menudo, reducida por factores ambientales adversos que impactan negativamente la producción del fruto, además de las enfermedades que presenta, las cuales son ocasionadas por fitopatógenos que afectan el desarrollo de los frutos. Esto se traduce en un menor aporte económico que se obtiene de la comercialización del producto.

2.3 Problemas fitosanitarios del fruto de aguacate

El buen funcionamiento de los procesos fisiológicos del aguacate están determinados como en cualquier planta, por su código genético (potencial hereditario) y el ambiente (suelo-atmósfera) en el que se desarrollan. Existen diversos factores responsables de que este fruto no alcance su máximo potencial productivo, entre ellos se encuentran los factores ambientales. De esta manera, la temperatura, la humedad, lluvia y el frío influyen en todos los aspectos del crecimiento del aguacate y determinan la magnitud con la que se expresa su potencial genotípico (Gutiérrez *et al.*, 2010).

Además de los factores limitantes de origen abiótico, se suman los factores bióticos como son el ataque de plagas y microorganismos que causan enfermedades. Las enfermedades del aguacate afectan la producción y son consideradas de gran importancia por el número, distribución e intensidad con la que se presentan, además son un factor de incremento en los costos de producción. En zonas cálidas y lluviosas una de las principales enfermedades que se presenta en los frutos tropicales es la antracnosis, causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Gutiérrez *et al.*, 2010). La antracnosis, es una de las enfermedades más importantes del fruto de aguacate desde el punto de vista económico, ya que se puede presentar durante el almacenamiento y la comercialización de éste, con pérdidas de al menos 20% del total de la producción (Djami, Allie, & Straker, 2013; Xoca *et al.*, 2017).

En la actualidad, se busca disminuir las pérdidas ocasionadas por antracnosis a través de alternativas biológicas para combatir el desarrollo de esta enfermedad provocada por *C. gloeosporioides* (Gutiérrez *et al.*, 2010).

2.4 Compuestos antifúngicos en el fruto de aguacate

Se ha reportado que cuando los frutos se encuentran en madurez fisiológica, en general son menos vulnerables al ataque de patógenos. Para el caso del aguacate, En el fruto de aguacate, cuando el fruto está en madurez fisiológica, un obstáculo para el desarrollo de los fitopatógenos está relacionado con la presencia de compuestos antifúngicos preformados, entre ellos la persina (12z, 5z)-1-acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-12,15-diene. La concentración más alta de persina se ha detectado en el exocarpio de frutos en estado de madurez fisiológica, y va disminuyendo a medida que el fruto alcanza la madurez de consumo (Xoca *et al.*, 2017).

De esta manera, se ha relacionado la concentración de persina con la resistencia de frutos de aguacate contra el ataque de *C. gloeosporioides*, y por ende, la disminución en la concentración de persina durante el proceso de maduración, aumenta la susceptibilidad al ataque de *C. gloeosporioides* (López, 2010).

2.5 Características de la persina

La persina es un compuesto antifúngico preformado, detectado en la epidermis de aguacate (López, 2010). Es un derivado de desoxi-glicérido y estructuralmente está estrechamente relacionado con el monoglicérido de linoleico incluso con la posición (z, z)-estereoquímica de los dobles enlaces como se muestra en la Figura 2.2 (Rodríguez & Trumble, 2000).

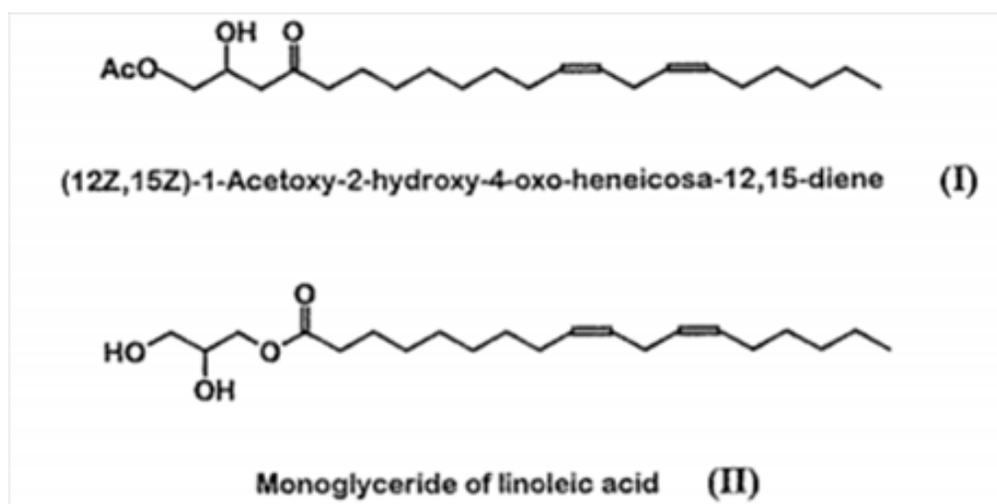


Figura 2.2. Relación estructural entre el compuesto biológicamente activo (I) (12z, 5z)-1-acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-12,15-diene (persina), (II) el monoglicérido del ácido linoleico. Fuente: Rodríguez, 2000.

2.5.1 Biosíntesis de la persina

Los ácidos grasos C-18 saturados e insaturados, como son los ácidos esteárico, oleico y linoleico, se sugirieron como posibles precursores de la persina. Estos ácidos, especialmente el ácido oleico y linoleico, son abundantes en los tejidos de aguacate donde se especula que algunos precursores se almacenan en el aceite. El primer compuesto antifúngico identificado a partir de aguacate fue la persina. En 1994, Bull y Carman reportaron que la reacción de persina a ácidos grasos, con la inserción de un átomo de oxígeno, podría llevarse a cabo mediante una oxidación Baeyer-Villager (Bull & Carman, 1994). Sin embargo, hasta el momento no se han identificado las enzimas o los procedimientos químicos para llevar a cabo el proceso de formación de persina a través de la extrusión de un átomo de oxígeno de los ácidos grasos, por lo que el proceso de biosíntesis de persina en aguacate es aún desconocido (Rodríguez & Trumble, 2000).

Posteriormente se reportó que al aplicar etileno (40 μ L/mL) a frutos de aguacate recién cosechados, se logró afectar la quiescencia de *C. gloeosporioides* en frutos inmaduros y se presentó una activación transcripcional de los genes *Avfae 1* (elongasa de ácido graso), *Avfad 12-3* (delta 12 ácido graso desaturasa). Estos hallazgos revelaron un posible vínculo en la inducción de los genes *Avfae 1* y *Avfad 12-3* y la acumulación de persina, infiriendo que las enzimas 12 desaturasa y elongasa de ácido graso estarían involucradas en la biosíntesis de persina (Madi *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006).

2.5.2 Actividad antifúngica de la persina en frutos de aguacate

La concentración de persina en los tejidos de aguacate está regulada por la lipoxigenasa, quien a su vez es regulada negativamente por la presencia de fenilpropanoides como la epicatequina, presentes en el pericarpio del fruto (Prusky

& Lichter 2007; Yakoby *et al.* 2002; Beno & Prusky 2000; Ardi *et al.* 1998). La lipoxigenasa es responsable de la oxidación de la persina. Se ha reportado que un aumento en la actividad de la lipoxigenasa causa disminución en los niveles de persina durante la maduración de los frutos (Prusky *et al.*, 1985). Los niveles de epicatequina disminuyen durante la maduración y coinciden con el aumento de las lipoxigenasas y la disminución de persina. Por lo tanto, los niveles más altos de epicatequina inhiben las lipoxigenasas, previniendo la disminución de los niveles de persina y proporcionando una mayor resistencia al ataque de fitopatógenos (Rodríguez & Trumble, 2000).

Las concentraciones de epicatequina en un cultivar de aguacate susceptible a patógenos se reporta de 60 a 130 $\mu\text{g/g}$ de peso cuando el fruto se ablanda, mientras que en cultivares resistentes las concentraciones de epicatequina oscilan entre 636 y 1740 $\mu\text{g/g}$ en la etapa de ablandamiento del fruto (Rodríguez & Trumble, 2000). De esta manera, los niveles más altos de epicatequina inhiben las lipoxigenasas previniendo la disminución de los niveles del compuesto antifúngico, proporcionando una mayor resistencia al ataque de fitopatógenos. De acuerdo con estos resultados, se sugirió que los niveles de persina dependen paralelamente de la síntesis y el metabolismo de varios compuestos como la epicatequina (Wang *et al.*, 2006; Bowen *et al.*, 2018).

La mayor parte de la persina presente en el mesocarpio de aguacate, es secuestrada en el aceite del fruto; sin embargo, no se ha detectado actividad significativa de lipoxigenasa en el aceite. Así, la falta de actividad enzimática indicó que el nivel de persina se mantiene alto en el aceite, tanto de mesocarpio inmaduro como maduro, mientras que las concentraciones en otros sitios del fruto fueron variables (Wang *et al.*, 2006; Bowen *et al.*, 2018). Adicionalmente, en frutos inmaduros, la resistencia mejorada al patógeno se caracteriza por la activación de

la síntesis de persina en paralelo a la expresión mejorada de genes clave de su vía biosintética *Avfae 1* y *Avfad 12-3* (Wang *et al.*, 2004).

Recientemente a través de un análisis transcriptómico, se determinó que los genes *Avfae1* y *Avfad12-3* se sobreexpresan al inducir el sistema de defensa del fruto de aguacate durante la postcosecha, sugiriendo que se llevó a cabo inducción de la biosíntesis de persina, lo que proporcionó al fruto mayor resistencia al ataque del hongo *C. gloeosporioides*, aún en estado de madurez de consumo (Xoca *et al.*, 2017). La identificación de genes de aguacate implicados en la respuesta de defensa contra *C. gloeosporioides* es un paso crucial hacia la comprensión de las bases moleculares de los mecanismos de la resistencia en el fruto de aguacate (Djami *et al.*, 2013). *Avfae1* y *Avfad12-3* son dos genes candidatos para modular su expresión y con ello evaluar la resistencia en los frutos al sobreexpresarlos. Sin embargo, es complicado llevar a cabo este tipo de estudios genéticos en el propio fruto de aguacate, ya que hasta el momento no se cuenta con las técnicas moleculares y de transformación estandarizadas para este fruto. Es por esto que resulta conveniente estudiar la función de los genes *Avfae1* y *Avfad12-3* en un sistema modelo previamente caracterizado como lo es *Arabidopsis thaliana*, el cual es el modelo vegetal por excelencia.

2.6 *Arabidopsis thaliana*

A. thaliana se ha empleado por varias décadas como modelo vegetal, ya que presenta diversas ventajas. Este modelo posee un ciclo de vida corto (2 meses) por lo que se pueden estudiar fenotipos al silenciar o sobreexpresar genes específicos, su genoma está secuenciado y además se cuenta con protocolos establecidos para la aplicación de herramientas moleculares (Leonelli, 2007; Yesilirmark & Sayers, 2009; Clough & Bent, 1998).

Arabidopsis thaliana es un miembro de la familia Brassicaceae, tiene una amplia distribución natural en Europa, Asia y América del Norte. Todo su ciclo de vida, incluyendo la germinación de las semillas, la formación de la roseta, el perno del tallo principal, la floración y la maduración de su fruto, se completa en 6 semanas, lo que es muy conveniente en investigación vegetal. *A. thaliana* es una planta pequeña de aproximadamente 30 cm de altura, las flores tienen 2 mm de largo, se autopolinizan a medida que la flor se abre (Figura 2.3a). Las semillas tienen 0.5 mm de longitud en la madurez (Meinke *et al.*, 1998).

Las flores se componen de un espiral exterior de cuatro sépalos verdes y espirales interiores que contienen cuatro pétalos blancos, seis estambres con polen y un gineceo central que forma la silicua (Figura 2.3b). Las plantas maduras alcanzan de 15 a 20 cm de altura y a menudo, producen varios cientos de silicuas con más de 5000 semillas por planta.

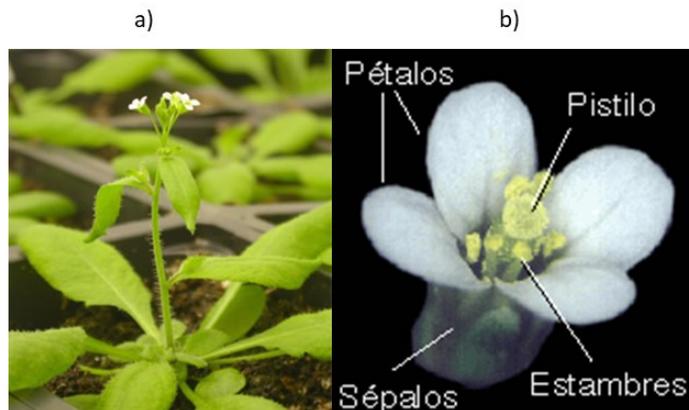


Figura 2.3. Aspecto morfológico de *Arabidopsis thaliana*. a) Planta pequeña con flores 2mm de largo, semillas de 0.5mm longitud. b) Las flores se componen por cuatro sépalos verdes, estambres y un gineceo o pistilo central que forma la silicua. Fuente: Meinke *et al.*, 1998.

2.6.1 Ventajas del uso *A. thaliana* en Ingeniería genética

A. thaliana se ha convertido en el sistema modelo de elección para la investigación en biología vegetal. Se han hecho avances significativos en la comprensión del crecimiento y desarrollo de las plantas, centrándose en la genética molecular de este organismo modelo (Meinke *et al.*, 1998). A partir de mediados de los años ochenta, *A. thaliana* se convirtió en una planta modelo para diversos estudios científicos debido a la disponibilidad de información y diversas herramientas genéticas con lo que se facilita el estudio de genes específicos, además de la facilidad de generación de plantas transgénicas (Hayashi & Nishimura, 2006).

Por lo anterior resulta muy conveniente el uso de *A. thaliana* como un modelo para estudiar genes de interés de plantas más complejas como el aguacate y analizar su expresión en este modelo vegetal, ya sea introduciendo construcciones con genes específicos de aguacate o identificando los genes de *A. thaliana* homólogos a los de interés para manipular su expresión y observar los fenotipos resultantes.

2.7 Herramientas moleculares de DNA recombinante. El sistema Gateway.

La aplicación de herramientas moleculares como la clonación de genes para ser estudiados en un contexto biológico más amplio, es de gran utilidad ya que se logra información sobre su función (Bolívar, 2004). Por lo cual, el análisis de expresión de determinados genes bajo condiciones específicas, aporta información de la función de éstos, lo cual ha demostrado ser una poderosa herramienta para predecir la función de genes (Proost & Mutwil, 2016).

Para llevar a cabo la sobreexpresión de los genes, existen diversas herramientas moleculares entre las cuales destaca el sistema Gateway.

La tecnología Gateway es un método de clonación universal basado en propiedades en el sitio específico de recombinación del bacteriófago λ (Landy, 1989). La tecnología Gateway proporciona una manera rápida y altamente eficiente de mover secuencias de DNA en sistemas que pueden emplear de múltiples vectores para el análisis funcional y expresión de proteínas (Hartley *et al.*, 2000).

Las reacciones de recombinación de la tecnología de clonación Gateway se basan en la recombinación de sitio específico del bacteriófago λ en *E. coli*. El bacteriófago λ puede crecer como un fago lítico, en cuyo caso la célula huésped se lisa, con la liberación del virus de la progenie. Alternativamente, puede integrarse específicamente en el genoma de *E.coli* mediante el proceso llamado lisogenización. En este estado lisogénico, el genoma del bacteriófago puede transmitir a las células hijas durante varias generaciones hasta que surgen condiciones que desencadenan su escisión del genoma (Weisberg & Landy, 1983).

Las reacciones de recombinación integradora y excesiva del bacteriófago λ están mediadas por proteínas codificadas por bacteriófago y *E. coli*. Estas reacciones de recombinación, realizadas de manera *in vitro*, son la base de la tecnología Gateway de clonación. Se pueden representar de la siguiente manera: $\text{attB} \times \text{attP} \Leftrightarrow \text{attL} \times \text{attR}$ (donde "x" significa recombinación). Los cuatro sitios att contienen sitios de unión para las proteínas que median las reacciones. Los sitios attP, attB, attL y attR contienen 243, 25, 100 y 168 pares de bases respectivamente. La reacción de integración attB x attP es mediada por las proteínas Int e IHF (factor de integración). La reacción de escisión de sitios attL x attR es mediada por las proteínas Int, IHF y Xis (Figura 2.4). Int (integrasa) y Xis (escisionasa) están codificadas en el genoma del bacteriófago λ , mientras que IHF es una proteína de *E. coli* (Landy, 1989).

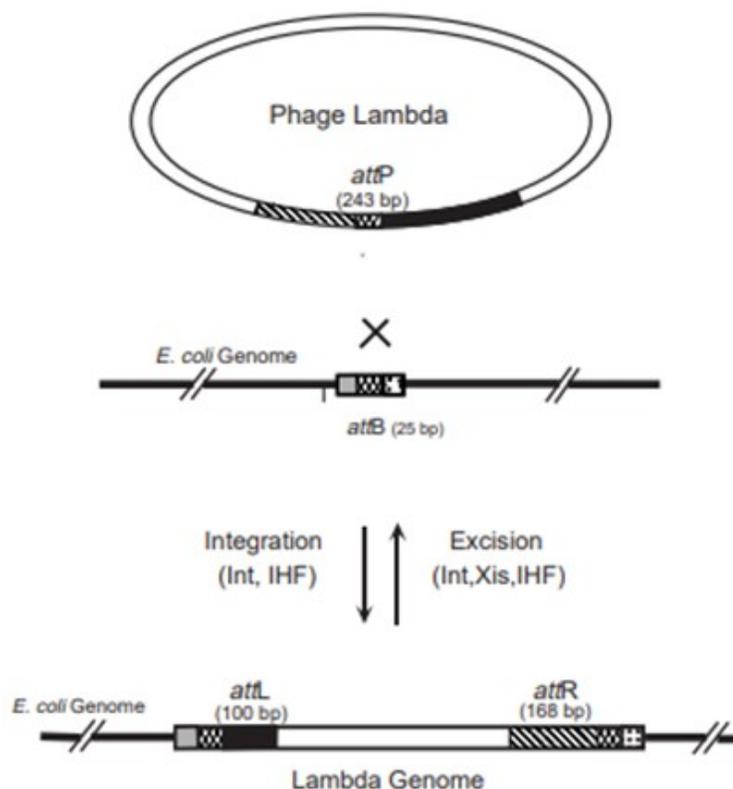


Figura 2.4. La reacción de excisión de sitios attL x attR es mediada por las proteínas Int, IHF y Xis.

La tecnología Gateway consta de dos reacciones de recombinación. La reacción BP facilita la recombinación de un producto attB-PCR o un clon de expresión attB con un vector donante para crear un clon de entrada que contiene attL (Figura 2.5a). Esta reacción es catalizada por la mezcla de enzimas BP clonasa II. La reacción LR facilita la recombinación de un sustrato attL (clon de entrada) con un sustrato attR (vector de destino) para crear un clon de expresión que contiene attB (Figura 2.5b). Esta reacción es catalizada por la mezcla de enzimas LR clonasa II.

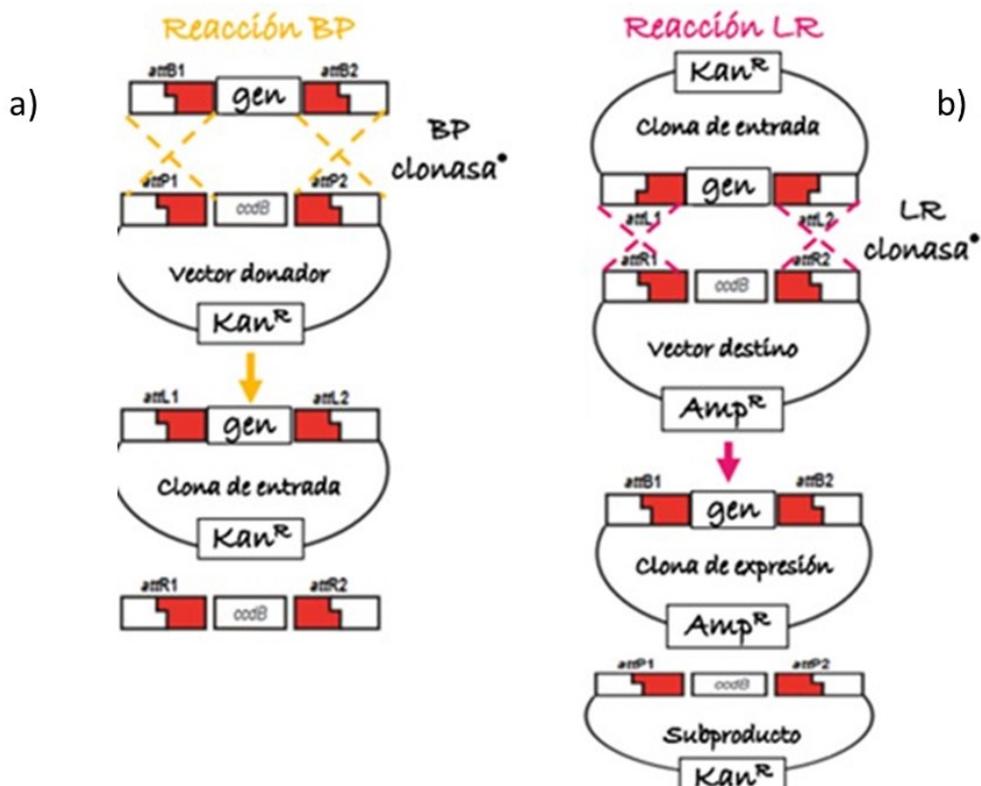


Figura 2.5. El Sistema Gateway consta de dos reacciones reacción BP a): Clonación del gen de interés en un vector de entrada y reacción LR b): Subclonar el gen de interés del clon de entrada en un vector destino el cual forma el clon de expresión.

La clonación por recombinación de a través del sistema Gateway presenta varias ventajas, ya que se lleva a cabo en tiempos cortos y una reacción de recombinación se completa en una hora, no es necesario usar enzimas de restricción ni ligasas como en los protocolos de clonamiento tradicional y tiene una eficiencia de clonación muy alta, de alrededor del 95% (tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/gatewayman.pdf)

De acuerdo a lo anterior, el sistema Gateway representa una herramienta muy útil para el proceso de clonación, permite el uso y expresión de múltiples tipos de secuencias.

En muchas ocasiones, es complicado estudiar la función de genes específicos en los sistemas biológicos a los que pertenecen, por lo que esto se lleva a cabo en un sistema heterólogo que represente ventajas de manipulación y donde se cuente con los protocolos de transformación para la introducción de los genes por técnicas de biología molecular. Después de la clonación de los genes de interés en el vector específico, el siguiente paso es llevar a cabo la transformación de la planta, que es un proceso de manipulación genética mediante el cual el gen de interés clonado se introduce en las células vegetales que se integran al genoma. (Ueki *et al.*, 2008).

El sistema de clonación Gateway, se ha realizado con éxito en diversas investigaciones. En un estudio se demostró la construcción y validación de este sistema, donde la finalidad fue clonar dos genes simultáneamente por reacciones LR con clones de entrada, para ser utilizado para la transformación de plantas, con el objetivo de investigar las interacciones y la localización subcelular de dos proteínas en células vegetales vivas. El sistema Gateway se considera una excelente herramienta multipropósito aplicada en la investigación genética de plantas, ya que permite la expresión simple o simultánea de genes, además del análisis de proteínas, entre otras aplicaciones. (Aboulela *et al.*, 2017).

En este trabajo, aplicando la tecnología Gateway de clonamiento se analizaron los genes homólogos de *A. thaliana* a los genes *Avfae1* y *Avfad12-3* de aguacate y se evaluó la capacidad antifúngica de los extractos obtenidos a partir las plantas sobreexpresantes.

CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN

3. JUSTIFICACIÓN

El aguacate es uno de los principales cultivos que es afectado por el hongo *C. gloeosporioides*. Este hongo es el agente causal de la antracnosis, la cual es una de las enfermedades más importantes desde el punto de vista económico, dado que genera pérdidas de alrededor del 20% del total de la producción de aguacate. Esta enfermedad puede presentarse durante el almacenamiento y comercialización del fruto (Xoca *et al.*, 2017).

Se ha observado que cuando el fruto está en madurez fisiológica no se desarrolla el hongo causante de la antracnosis, debido al contenido de metabolitos secundarios presentes en el epicarpio. Entre estos metabolitos se encuentra la persina. De acuerdo a estudios realizados, se ha reportado que los genes *Avfae 1* y *Avfad 12-3*, involucrados en la biosíntesis de persina, se sobreexpresan al inducir el sistema de defensa del fruto de aguacate, lo que sugiere que está presente una mayor concentración de persina que podría dar resistencia al fruto contra el ataque del hongo *C. gloeosporioides*.

Por lo anterior, resulta interesante evaluar la sobreexpresión los genes *Avfae 1* y *Avfad 12-3*. Sin embargo, es complicado estudiarlos en el sistema vegetal de origen por lo que se planteó utilizar *A. thaliana* como modelo vegetal para sobreexpresar los genes homólogos a los involucrados en la síntesis de persina de aguacate Hass, además de evaluar la capacidad antifúngica *in vitro* de extractos vegetales obtenidos a partir de las plantas sobreexpresantes, como una potencial estrategia basada en genética funcional para inhibir el desarrollo de enfermedades causadas por el hongo *C. gloeosporioides*.

CAPÍTULO 4. HIPOTÉISIS

4. HIPÓTESIS

El efecto de la sobreexpresión de los genes homólogos en *A. thaliana* a los genes involucrados en la biosíntesis del compuesto antifúngico persina de aguacate Hass, incrementará la capacidad antifúngica *in vitro* de los extractos de las plantas sobreexpresantes contra el hongo de *C. gloeosporioides*.

CAPÍTULO 5. OBJETIVOS

5. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de la sobreexpresión en *A. thaliana* de los genes homólogos a los involucrados en la biosíntesis del compuesto antifúngico persina en aguacate Hass (*Persea americana*).

Objetivos Específicos

- Realizar un análisis bioinformático para identificar los genes homólogos de *A. thaliana* a los genes *Avfae 1* y *Avfad 12-3* de aguacate.
- Realizar construcciones de expresión constitutiva con los genes homólogos de *A. thaliana* a los genes *Avfae 1* y *Avfad 12-3* de aguacate utilizando el sistema Gateway de clonamiento.
- Transformar las plantas de *A. thaliana* con las construcciones elaboradas y evaluar fenotipos en plantas sobreexpresantes para cada uno de los genes seleccionados.
- Analizar la actividad antifúngica de extractos vegetales provenientes de cada una de las plantas sobreexpresantes.

CAPÍTULO 6. METODOLOGÍA

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Diagrama General

En la Figura 6.1 se muestra un diagrama general con la metodología empleada para la realización del proyecto de investigación.

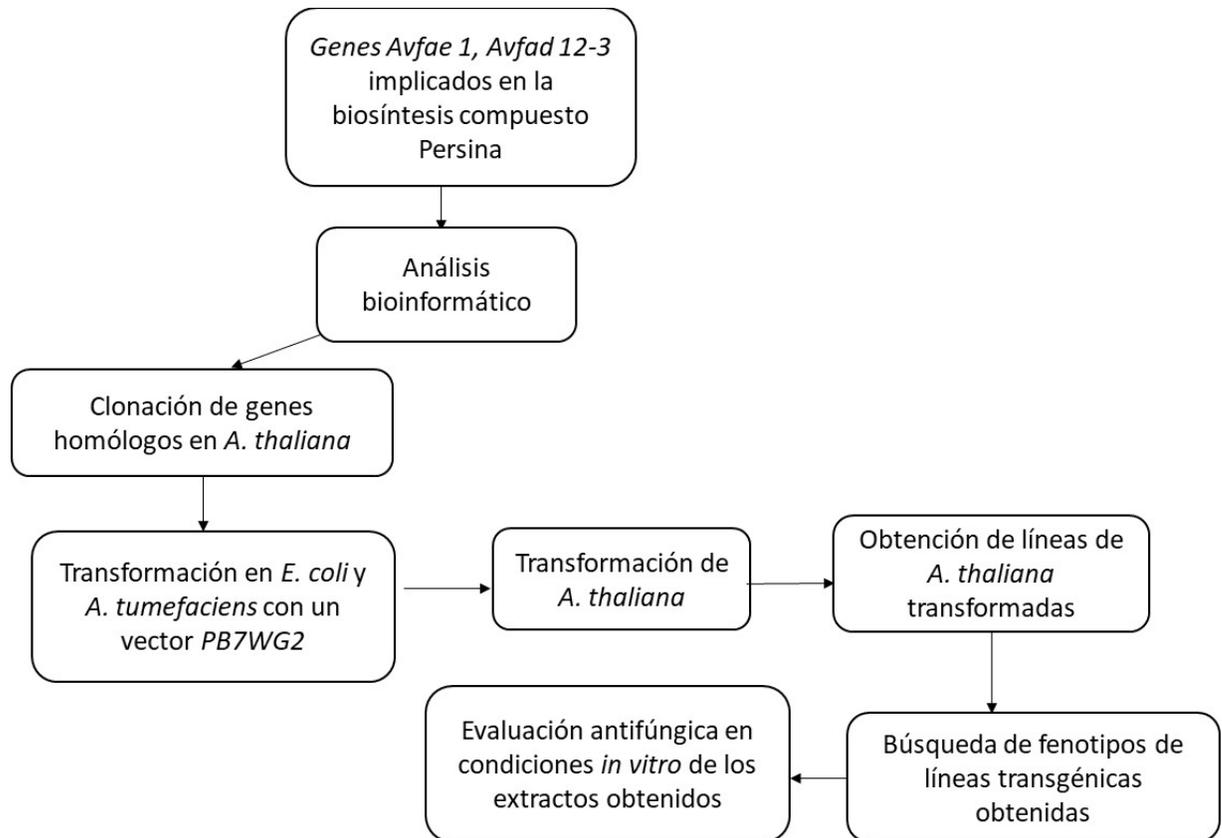


Figura 6. 1.Diagrama general de metodología empleada para el trabajo de investigación.

6.2 Análisis Bioinformático

Las secuencias de los genes *Avfad 1* y *Avfae 12-3*, involucrados en la biosíntesis del compuesto persina en aguacate, se obtuvieron de las bases de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Se realizó una comparación de secuencias mediante el programa run Blast 2.2.3. Para el análisis *in silico* se consultó la base de datos de TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*). El resultado de la comparación de secuencias determinó los genes homólogos en *A. thaliana* a *Avfad 1* y *Avfae 12-3* de aguacate. Se seleccionó el gen homólogo con mayor porcentaje de identidad para cada uno de los genes de estudio.

6.3 Diseño de oligonucleótidos

Se seleccionaron los genes de *A. thaliana* con mayor porcentaje de homología con los genes de aguacate *Avfae 1* y *Avfad 12-3*. Se obtuvieron las secuencias de ambos genes y en base a ellas se diseñaron los oligonucleótidos. Para esto se utilizó el Software Vector NTI (Invitrogen®). Los oligonucleótidos sintetizados a través de un servicio especializado. Para evaluar la funcionalidad de los oligonucleótidos se llevaron a cabo reacciones de PCR y se estandarizaron las condiciones para la amplificación.

6.4 Obtención de plantas de *A. thaliana*

Las plantas de *A. thaliana* utilizadas en este estudio corresponden al ecotipo Columbia-0 (Col 0). Las semillas Col 0 se desinfectaron mediante un tratamiento con EtOH 70% durante 5 min seguido por un tratamiento con una solución de hipoclorito de sodio al 20% durante 5 min. Finalmente se realizaron 3 lavados con

agua destilada estéril (1mL por 5 min para cada uno de los lavados). Las semillas fueron almacenadas en agua destilada a 4°C por 48 h. Para la germinación de las semillas, éstas se sembraron en cajas de Petri conteniendo medio Murashige-Skoog (MS) y se incubaron a 22°C con un fotoperiodo de día largo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. De manera simultánea, se realizó la siembra de semillas de *A. thaliana* en sustrato de peat moss con perlita para obtener plantas para su posterior transformación.

6.5 Extracción RNA de *A. thaliana*

A partir de las plantas crecidas *in vitro* por 7 días, se llevó a cabo la extracción de RNA para obtener por amplificación el fragmento de los genes de interés. Para la extracción de RNA se empleó el reactivo QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN®), de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Para esto, las muestras de *A. thaliana* fueron recolectadas y maceradas en nitrógeno líquido. En tubos eppendorf se colocaron alícuotas de 100 mg de tejido vegetal y se agregaron 1000 µL del reactivo Lysis QIAzol. Se mezcló en vortex y se dejó reposar por 5 min. Se agregaron 200 µL de cloroformo mezclando vigorosamente durante 15 s y se dejó en reposo durante 2-3 min. La mezcla se centrifugó a 12,000 x g por 15 min a 4°C. Se transfirió la fase acuosa superior en tubos nuevos. Para precipitar el RNA se agregaron 450 µL de isopropanol y se mezcló agitando en vortex. Se dejó reposar durante 10 min y se centrifugó a 12,000 x g por 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla obtenida se lavó con 1000 µL de etanol al 75%. Se centrifugó a 7500 x g durante 5 min a 4°C. Se eliminó completamente el sobrenadante y las muestras se secaron al aire. Se agregaron 30 µL de agua libre de RNasas para resuspenderlas.

6.6 Cuantificación e Integridad del RNA de *A.thaliana*

Las muestra de RNA se cuantificaron en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo scientific®) a una longitud de onda de 260 nm, utilizando el software ND-100 V3 5.2. Se determinó la pureza del RNA de cada muestra por medio de las relaciones de absorbancia $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$.

Para la determinación de la integridad del RNA, éste se sometió a electroforesis mediante la aplicación de un campo eléctrico generado por una fuente de poder marca Bio-Rad. Se empleó como soporte de las muestras un gel de agarosa al 1.5%. Para la inyección de muestras en los carriles del gel se tomaron 5 μ L de mezcla que contenían RNA, buffer de carga naranja 1X y H₂O libre de RNAsas. La electroforesis se llevó a cabo en buffer TAE 1X a 90 Volts durante 45 min. Las muestras fueron visualizadas utilizando un Fotodocumentador ChemicDoc™ MP BIO RAD adaptado a un equipo software Imagen Lab™.

6.7 Amplificación de los genes de interés a partir de cDNAs

La síntesis de cDNA se llevó a cabo mediante el proceso de transcripción reversa. Esta se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ L de reacción que contenía 8 μ L agua libre de RNAsas, 1 μ L de cada oligonucleótido, 2 μ L de dNTPs (10mM) y 3 μ L de RNA. La mezcla se colocó en un termociclador Real-time PCR para la desnaturalización a 65°C durante 10 min y después fueron colocadas 5 min a 4°C. Posteriormente, se adicionaron 6 μ L de la mezcla que contenía 1 μ L DTT, 4 μ L buffer 5x, 1 μ L enzima invitrogene SSIII. Se incubó durante 1 hora a 52°C, 15 min 72°C y 4°C por 5 min. Finalmente las muestras de cDNA fueron almacenadas a -20°C. Posteriormente se realizó la técnica de PCR. Como control positivo de amplificación, se amplificó el gen constitutivo de *Actina 2*.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μL . Para cada una de las muestras se adicionó a la reacción 1 μL de cDNA, 11.96 μL H_2O libre de RNAsas, 2 μL dNTPs (2 mM), 0.8 μL MgCl_2 (50 mM), 2 μL de cada oligonucleótido (directo FW-ACT2 5'GAA TTG TCT CGT TGT CCT CCT CAC 3'; reverso 5' TGC AAA TCC AGC CTT CAC CAT AC 3') y 0.24 μL de enzima Taq polimerasa. El programa de amplificación se realizó en un C1000 Thermal cycler Biorad que consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 3 min, desnaturalización a 95°C durante 30 s, alineamiento a 60°C durante 30 s y extensión a 72°C durante 20 s durante 35 ciclos de reacción. Finalmente una extensión a 72°C por 5 min. Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis.

Una vez comprobado que el cDNA se sintetizó correctamente, se llevó a cabo la amplificación por PCR para cada uno de los genes bajo estudio. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 μL . Para cada una de las muestras se adicionó en la reacción 1 μL de cDNA, 8.55 μL H_2O libre de RNAsas, 5 μL buffer 5x, 2.5 μL dNTPs (2mM), 2.5 μL mix oligos (directo y reverso, 10mM), 5 μL Enhancer, 0.25 μL enzima platinum (Invitrogen®). La secuencia de los oligonucleótidos para cada gen se muestra en la Tabla 1. El programa de amplificación se realizó en un C1000 thermal cycler Biorad que consistió en una desnaturalización inicial a 98°C durante 30 s, desnaturalización a 98°C durante 10

s, alineamiento a 60°C, 62°C y 64°C durante 10 s realizando 35 ciclos de reacción. Finalmente una extensión a 72°C por 5 min (Figura 6.2).

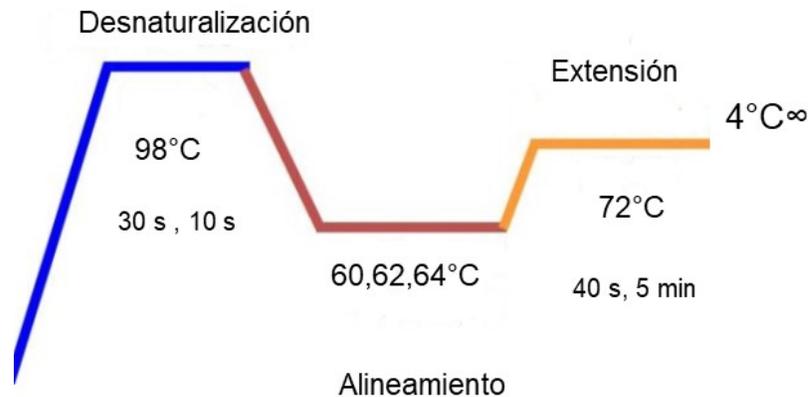


Figura 6. 2 Condiciones de amplificación de los genes específicos.

Cabe señalar que las diferentes temperaturas de alineamiento, corresponden a un gradiente de temperatura que se llevó a cabo con la finalidad de estandarizar las condiciones de amplificación. Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para las amplificaciones.

Gen control		Secuencia
Actina2	Directo	5'GAA TTG TCT CGT TGT CCT CCT CAC 3'
	Reverso	5' TGC AAA TCC AGC CTT CAC CAT AC 3'
Genes A. thaliana		
At5g43760	Directo	5'GGGG-ACA-AGT-TTG-TAC-AAA-AAA-GCA-GGC-T- ATGAGCCATAACCAAAACCAACC 3'
	Reverso	5'GGGG-AC-CAC-TTT-GTA-CAA-GAA-AGC-TGG-GT- CTACGACGATGTAATGGGAGTGA 3'

<i>At3g12120</i>	Directo	5'GGGG-ACA-AGT-TTG-TAC-AAA-AAA-GCA-GGC-T- ATGGGTGCAGGTGGAAGAAT 3'
	Reverso	5'GGGG-AC-CAC-TTT-GTA-CAA-GAA-AGC-TGG-GT- TCATAACTTATTGTTGTACCAGT 3'

6.8 Análisis de restricción de los fragmentos amplificados

Con el fin de confirmar que los amplicones obtenidos correspondían a los cada uno de los genes de interés, se realizó un análisis de restricción. Para ello, se realizó la búsqueda en bases de datos del Gen Script, Promega y Restrictionmapper, para detectar sitios de restricción en las secuencias de los genes y determinar el patrón de restricción. Para el gen *At5g43760* se empleó la enzima *BamHI* y para *At3g12120* la enzima *BglII*, *BamHI* y *PstI*.

Las reacciones de digestión se realizaron en un volumen final de 10 µL. Para cada amplicón la reacción estuvo compuesta por 5.5 µL de agua libre de RNasas, 1 µL de la amplificación por PCR y 0.5 µL de la enzima de restricción. Las muestras se incubaron a 37°C durante 10 min. Se llevó a cabo la inactivación térmica de las enzimas y las muestras se conservaron a 4°C. La restricción del DNA de los genes fueron sometidos a electroforesis para su visualización.

6.9 Preparación células electrocompetentes de *E. coli DH5α*

Una célula competente de *E. coli* es aquella que tiene la capacidad de integrar moléculas de DNA externo no propio de la bacteria, por lo que era necesario preparar células competentes para introducir los plásmidos que contenían clonados los genes de interés.

Para la obtención de las células competentes, se preparó un preinóculo de *E. coli DH5α* crecido 37°C por 24 h. El preinóculo bacteriano se transfirió a un matraz conteniendo 250ml de LB líquido. Se incubó a 37°C con agitación constante. El crecimiento bacteriano se monitoreó hasta que alcanzó un valor D.O.₆₀₀ de 0.6-0.8. El cultivo se mantuvo en baño de hielo por 15 min y se centrifugó a 5000 rpm a 4°C durante 10 min. Se desechó el sobrenadante y las células se lavaron con 40 mL de agua desionizada estéril y fría. Se resuspendió la pastilla celular y se centrifugó a 5000 rpm a 4°C durante 10 min. Los lavados de las células bacterianas se repitieron (3 veces) desechando cada vez el sobrenadante. El paquete bacteriano se resuspendió en 20 mL de una solución estéril y fría de glicerol al 10%. Las células obtenidas se distribuyeron en alícuotas y se almacenaron a -80°C hasta su uso (Sambrook *et al.*, 2001).

6.10 Reacción de recombinación BP de clonación sistema Gateway.

Los fragmentos de PCR para los genes *At5g43760* y *At3g12120* se clonaron utilizando el vector de entrada *pDONR*TM 221. Este vector contiene un sitio de secuenciación M13 universal, un gen de resistencia a kanamicina y un gen de selección negativa *ccdB*. El vector *pDONR*TM 221 (Figura 6.3) se utilizó con la finalidad de integrar en él (en los sitios attP1, attP2) los fragmentos de los genes específicos de interés para posteriormente, por recombinación sitio específica, integrarlo a un vector destino para su sobreexpresión. La clonación mediante el sistema Gateway se llevó a cabo en dos partes, primeramente se clonó en el vector de entrada (reacción BP) y después el fragmento de interés se pasó al vector destino (reacción LR), en ambos casos la clonación ocurrió mediante recombinación sitio específica.

La reacción BP se llevó a cabo en un volumen final de 10 μL , el procedimiento se realizó de acuerdo a la metodología descrita en el manual Gateway Technology®. Para esto, se agregó 1 μL (180 ng/ μL) del vector de entrada pDONR™ 2.21, 4 μL H₂O libre de RNasas, 3 μL del producto PCR (gen de interés), 2 μL (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de enzima BP clonasa II. Las muestras se incubaron a 25°C durante 12 h. Posterior a la incubación, se añadió 1 μL de proteinasa K (para detener la actividad enzimática de BP). Las muestras se incubaron a 37°C por 10 min y después fueron almacenadas a 4°C hasta su uso. La construcción obtenida fue utilizada para transformar *E. coli*.

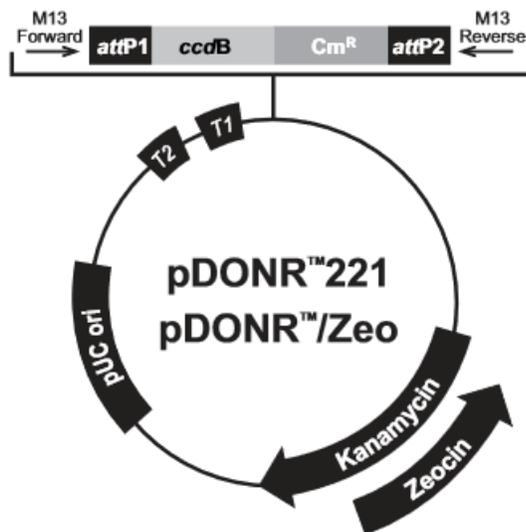


Figura 6.3. Representación esquemática del Vector de entrada pDONR 221™.

6.10.1 Transformación de *E. coli* con el plásmido pDONR 221

Con la finalidad de eliminar las sales presentes en la mezcla de reacción BP, se llevó a cabo la diálisis por microgota de la mezcla previamente obtenida como se describió en el apartado 6.10. Se colocaron 11 μL de la mezcla sobre una

membrana con un tamaño de poro de 0.025 μm , soportada en una gota de agua milli-Q. Posteriormente las muestras dializadas se incorporaron en 50 μL de células competentes previamente preparadas, mezclándolas suavemente para después colocarlas en celdas de electroporación donde se aplicó un choque eléctrico de 2000 volts utilizando un electroporador. Inmediatamente después de la electroporación se agregó medio LB líquido a la mezcla de transformación y se incubó a 37°C durante 90 min manteniéndola en agitación constante. Finalmente, las bacterias fueron sembradas en cajas de Petri con medio Luria Broth (LB) suplementadas con el antibiótico de selección kanamicina. Las cajas fueron incubadas a 37°C. El crecimiento de colonias indicó que las células bacterianas incorporaron el vector.

6.10.2 Selección de colonias transformadas

A partir de las colonias de *E. coli* DH5 α transformadas, se seleccionaron colonias al azar para llevar a cabo una reacción de PCR en colonia, lo cual permitió confirmar que el plásmido con el gen de interés había sido integrado. Para llevar a cabo el PCR, cada una de las colonias seleccionadas se suspendieron en 15 μL agua destilada estéril, esta suspensión se usó como templado.

Las reacciones de amplificación por PCR en colonia se llevaron a cabo en un volumen final de reacción de 20 μL mezclando 11.96 μL de agua, 2 μL de buffer 10X, 2 μL de dNTPs (2mM), 0.8 μL de MgCl_2 (50mM), 2 μL del mix de oligos (directo y reverso del gen específico), 0.24 μL enzima DNA Taq polimerasa, 1 μL de la suspensión bacteriana. El programa de amplificación se realizó en un C1000 thermal cycler Bio rad que consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 3 min, desnaturalización a 95°C durante 30 s, alineamiento a 60°C durante 30 s y

extensión a 72°C durante 1 min 30 s, y una extensión final a 72°C por 5 min durante 35 ciclos de reacción. Los productos de PCR fueron visualizados mediante técnica de electroforesis. Una vez que se corroboraron las colonias que contenían el plásmido *pDONR™ 221* con el gen de interés, se procedió a la purificación de este plásmido para usarlo en la reacción LR.

6.10.3 Extracción de DNA plasmídico

Las bacterias fueron crecidas en 2.5 mL de medio LB suplementado con el antibiótico kanamicina (50mg/mL). El cultivo se incubó a 37°C por 12 h con agitación constante. Mediante centrifugación se obtuvo la pastilla bacteriana. Se realizó la extracción de DNA plasmídico utilizando el kit QIA prep spin Miniprep de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se realizó una electroforesis para comprobar que el DNA se había extraído correctamente además se elaboró una cuantificación para conocer la concentración obtenida.

6.11 Reacción recombinación LR de clonación sistema Gateway

Utilizando el DNA plasmídico obtenido a través de la reacción BP, se realizó la reacción LR utilizando el vector de salida *pB7WG2* (Figura 6.4) el cual es empleado para la sobreexpresión de genes. Este vector contiene el promotor constitutivo 35S, el gen de resistencia al antibiótico espectinomina, el gen de resistencia al herbicida fosfinotricina, el gen suicida *ccdB* y el gen que codifica para la proteína verde fluorescente GFP. En esta reacción, el gen de interés se integró por recombinación sitio específica en lugar del *ccdB*. La reacción LR se llevó a cabo en un volumen final de 10µL y el procedimiento se realizó de acuerdo a la

metodología descrita en el manual Gateway Technology®. Brevemente, a reacción se integró por 1 μL (180ng/ μL) del vector de salida *pB7WG2*, 6 μL de agua, 1 μL del DNA plasmídico obtenido en la primera reacción BP con el vector *pDONR™* 221 y 2 μL (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de la enzima LR clonasa II (Invitrogen®). La reacción se incubó a 25°C durante 12 h. Posteriormente se añadió 1 μL de proteinasa K y se incubó a 37°C por 10 min. Las muestras fueron almacenadas a 4°C hasta su uso.



Figura 6.4. Representación esquemática del Vector de salida *pB7WG2*.

6.11.1 Transformación de *E. coli* con el plásmido *pB7WG2*

Se transformó la cepa de *E. coli* con el plásmido *pB7WG2* mediante electroporación. La metodología se describe en la sección 6.10.1. Las bacterias transformadas se seleccionaron mediante el antibiótico espectinomomicina (100 mg/mL). También se realizó un PCR en colonia siguiendo la metodología descrita

en la sección 6.10.2 y la extracción del DNA plasmídico a partir de colonias de *E. coli* correctamente transformadas se realizó según lo descrito en la sección 6.10.3. Con esta construcción (*pB7WG2* más el gen de interés) se transformaron células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* que es la bacteria que naturalmente lleva a cabo la transformación de la planta *Arabidopsis thaliana*.

6.11.2 Transformación de *A. tumefaciens* con el plásmido *pB7WG2*

A partir del el DNA plasmídico obtenido de la reacción LR, se transformó la cepa de *A. tumefaciens* GV2260 mediante por electroporación. Las células de *A. tumefaciens* transformadas fueron sembradas en placas con medio LB más los antibióticos espectinomicina (100mg/mL), rifampicina (50mg/mL) y carbenicilina (100 mg/mL). Los cultivos fueron incubados a 28°C durante 48 h. De las colonias que crecieron se seleccionaron cuatro, a las cuales se realizó PCR en colonia de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 6.10.2.

6.11.3 Transformación de *A. thaliana* mediante *A. tumefaciens*

Con la bacteria de *A. tumefaciens* transformada, se preparó un preinóculo en 50 mL de medio LB líquido suplementado con espectinomicina (100 mg/mL), rifampicina (50mg/mL) y carbenicilina (100 mg/mL). Este cultivo se incubó a 28°C durante 24 h. Una vez obtenido el preinóculo, se incorporó en 200 mL de medio líquido LB con los antibióticos correspondientes y se incubó a 28°C hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0.8. Con este cultivo se llevó a cabo la transformación de *A. thaliana* por el método floral dip reportado por Martínez *et al.*, 2004. Para esto, las células del cultivo fueron recolectadas mediante centrifugación a 5500 rpm durante 20 min y fueron resuspendidas en 10 mL de una solución compuesta por 0.5X MS, 5%

sacarosa, 100 mM acetosiringona, 0.05% Silwet-L77 y pH ajustado a 5.7. Posteriormente, con esta suspensión bacteriana se inocularon las inflorescencias de plantas de *A. thaliana* en etapa de brote durante 3 s. Ya inoculadas se dejaron bajo condiciones de crecimiento de 12 a 24 h en oscuridad cubiertas con bolsas de color negro para evitar el contacto con la luz, además para mantener un alto porcentaje de humedad. Esto permitió que *A. tumefaciens* se integrara de manera efectiva a *A. thaliana*. Una vez que las plantas generaron semillas, éstas se colectaron para llevar a cabo la selección de las líneas transformadas.

6.12 Selección de líneas de *A. thaliana* transformadas

Las semillas se desinfectaron con una solución de etanol al 70% por 5 min, seguido por un tratamiento con hipoclorito de sodio al 10% por 5 min. Como acto seguido se lavaron tres veces con H₂O destilada estéril. Las semillas se sembraron en cajas de Petri conteniendo medio MS suplementado con fosfotricina (10mg/L). Se incubaron con un periodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, durante 10-14 días aproximadamente después de la germinación, hasta que el desarrollo de la planta permitió observar fenotipos en las transformantes. Estos fueron comparados con plantas testigo sin transformar.

6.13 Obtención de extractos de plantas de *A thaliana* transformadas

Para comprobar si se indujo la presencia de compuestos antifúngicos en la planta, se obtuvieron extractos crudos de las líneas transformadas para evaluar su efecto antifúngico. Los extractos de las plantas de *A. thaliana* transformadas se obtuvieron mediante la metodología propuesta por Saura-Calixto, 2007. Este procedimiento consistió en someter las muestras de tejido a una solución de

metanol acidificado (8 mL*L⁻¹ HCL) - agua (50-50 v/v) (50 mL *g⁻¹ de muestra) durante 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la suspensión se centrifugó a 3000 rpm por 15 min a 25°C. Se recuperó el sobrenadante. Al precipitado se adicionó una solución de acetona-agua (70:30 v/v) (50 mL *g⁻¹ de muestra) durante 60 min. Se centrifugó bajo las condiciones descritas anteriormente y el sobrenadante se mezcló con el sobrenadante del primer lavado. Los solventes se eliminaron en un rotavapor Yamato BM500, con atmósfera reducida, durante 60 min a 45°C. Una vez retirados los solventes los extractos se almacenaron a 4°C en oscuridad.

6.14 Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos

Para evaluar la actividad antifúngica se consideraron todos los extractos. En las evaluaciones se utilizó como control una solución de metanol-agua sin muestra de tejido. Para la aplicación de los extractos, se utilizaron 3 concentraciones de 4, 8 y 16 mg/mL. Los extractos fueron mezclados con PDA (papa dextrosa agar) y una vez que el agar solidificó, con ayuda de un sacabocado se retiró un disco de 8mm de diámetro de PDA de la parte central de la caja Petri. En ese espacio se colocó un disco de 8 mm PDA conteniendo un cultivo de *C. gloeosporioides*. Las cajas se incubaron a 26°C, hasta que el hongo ocupó la totalidad del área de la caja. Cada tratamiento se realizó por duplicado.

6.14.1 Determinación de la inhibición del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*

Para determinar el efecto antifúngico de los extractos vegetales, se consideró la inhibición del crecimiento micelial en las diferentes concentraciones. Para calcular

el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial en cada uno de los tratamientos (%ICM) se utilizó la siguiente ecuación:

$$ICM = \frac{\text{Diámetro colonia control} - \text{Diámetro colonia de tratamiento}}{\text{Diámetro colonia control} - \text{Diámetro del sacabocados}} \times 100 \quad (1)$$

CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Análisis Bioinformático

Con las secuencias de genes de aguacate *Avfae 1* y *Avfad 12-3* obtenidas en la base de datos GenBank, se realizó un análisis de comparación de secuencias con la base de datos de *Arabidopsis* TAIR. El programa bioinformático para la comparación de secuencias fue run blast 2.2.3, el cual arrojó como resultado la secuencia de los genes homólogos en *Arabidopsis thaliana* a los genes *Avfae 1* y *Avfad 12-3* de aguacate. Los resultados se muestran en las Tablas 2 y 3.

De acuerdo a los resultados obtenidos, para el caso de *Avfae 1* se seleccionó el gen con mayor porcentaje de identidad que correspondió a *At5g43760* con un 72.53 % de homología. Se ha reportado que este gen participa en el proceso biosintético de los ácidos grasos, además se induce en respuesta al frío así como por estímulo de luz (*The Arabidopsis Information Resource*). En lo que respecta a *Avfad 12-3*, se obtuvo solamente el homólogo *At3g12120*, el cual se ha reportado que codifica para una enzima involucrada en la síntesis de ácidos grasos (*The Arabidopsis Information Resource*) y su porcentaje de homología fue 71.72%

Tabla 2. Genes homólogos de *A. thaliana* al gen *At3g43760*

GEN	HOMOLOGÍA (GENES)	% IDENTIDAD	FUNCIÓN
Avfael	AT5G43760.1	72.53	Respuesta al frío , estímulo de luz
Avfael	AT1G04220.1	72.45	Respuesta estrés osmótico, heridas, proceso biosintético suberina
Avfael	AT2G26640.1	69.79	Respuesta al frío, estímulo de luz
Avfael	AT1G01120.1	70.27	Desarrollo de cutícula, respuesta al frío , estímulo de luz
Avfael	AT1G25450.1	69.58	Desarrollo de cutícula, desarrollo tubo polínico, respuesta frío, estímulo de luz
Avfael	AT1G68530.1	69.21	Desarrollo de cutícula, respuesta al frío, estímulo luz, crecimiento celular, proceso biosintético de la cera.
Avfael	AT4G34510.1	68.41	Elongación de ácidos grasos, proceso metabólico de ácidos grasos cadena larga
Avfael	AT2G16280.1	67.66	Desarrollo de cutícula, respuesta frío, estímulo luz, proceso metabólico de ácidos grasos cadena larga
Avfael	AT4G34250.1	67.64	Elongación ácidos grasos, respuesta al estímulo luz, proceso metabólico de ácidos grasos cadena larga
Avfael	AT2G15090.1	67.41	Elongación ácidos grasos, proceso metabólico de ácidos grasos cadena larga
Avfael	AT1G19440.1	67.79	Desarrollo de cutícula, , proceso metabólico de ácidos grasos cadena larga
Avfael	AT2G26250.1	73.7	Desarrollo de cutícula, diferenciación de células epidérmicas, respuesta al frío, estímulo luz, karrikin, proceso metabólico de ácidos grasos cadena larga.
Avfael	AT4G34520.1	64.43	Elongación de ácidos grasos, proceso metabólico de ácidos grasos cadena larga.
Avfael	AT5G49070.1	67.44	Desarrollo de cutícula, proceso metabólico de ácidos grasos cadena larga.
Avfael	AT3G10280.1	62.77	Desarrollo de cutícula, elongación de ácidos grasos, proceso metabólico de ácidos grasos cadena larga.

Tabla 3. Gen homólogo de *A. thaliana* al gen *At3g12120*

GEN	HOMOLOGÍA (GENES)	% IDENTIDAD	FUNCIÓN
Avfad 12	AT3G12120.1	71.72	Proceso de óxido-reducción Enzima principal responsable de síntesis de ácidos grasos 18:2 en retículo endoplasmático

Además de considerar el porcentaje de homología, se consideraron las funciones semejantes en sus contextos biológicos. De acuerdo a lo reportado en la base de datos TAIR, el gen *At3g12120* codifica para una desaturasa que participa en el proceso biosintético de ácidos grasos, misma función que se atribuye al gen *Avfad 12-3* de aguacate. En lo que respecta al gen *At5g43760*, éste codifica para una

elongasa de ácidos grasos, similar a la función del gen *Avfae 1*. De esta manera, se sugiere que los genes de *A. thaliana* seleccionados podrían tener funciones similares a los genes de aguacate, implicados en la biosíntesis del compuesto persina. Estos resultados sustentaron la propuesta de que al inducir la sobreexpresión de *At3g12120* o *At5g43760* se podría biosintetizar en la planta algún compuesto biofungicida.

A partir de los resultados del análisis bioinformático se contó con la secuencia completa y de cDNA de los genes *At3g12120* y *At5g43760*.

Como los genes serían amplificados a partir de cDNA, primeramente se realizó un análisis en la base de datos eFP, la cual es una herramienta que cuenta *Arabidopsis* para visualizar los niveles de expresión de cada gen específico en las diferentes estructuras de la planta (*Arabidopsis* eFP Browser). Lo anterior con la finalidad de determinar el tejido más adecuado para la extracción de RNA total de *A. thaliana*, el cual fue utilizado para realizar la síntesis de cDNA. Los resultados se muestran en la Figura 7.1.

En la Figura se observa una escala de color que va de amarillo a rojo, donde la intensidad del color indica el nivel de expresión. Al observar las diferentes estructuras de la planta, es posible determinar qué parte es la que presenta mayor nivel de expresión.

De acuerdo con esto, para ambos genes se determinó que la parte aérea de la planta (hojas y estructuras florales) era la porción más adecuada para llevar a cabo la extracción de RNA total de *A. thaliana*, con lo cual podríamos asegurar la amplificación del fragmento esperado.

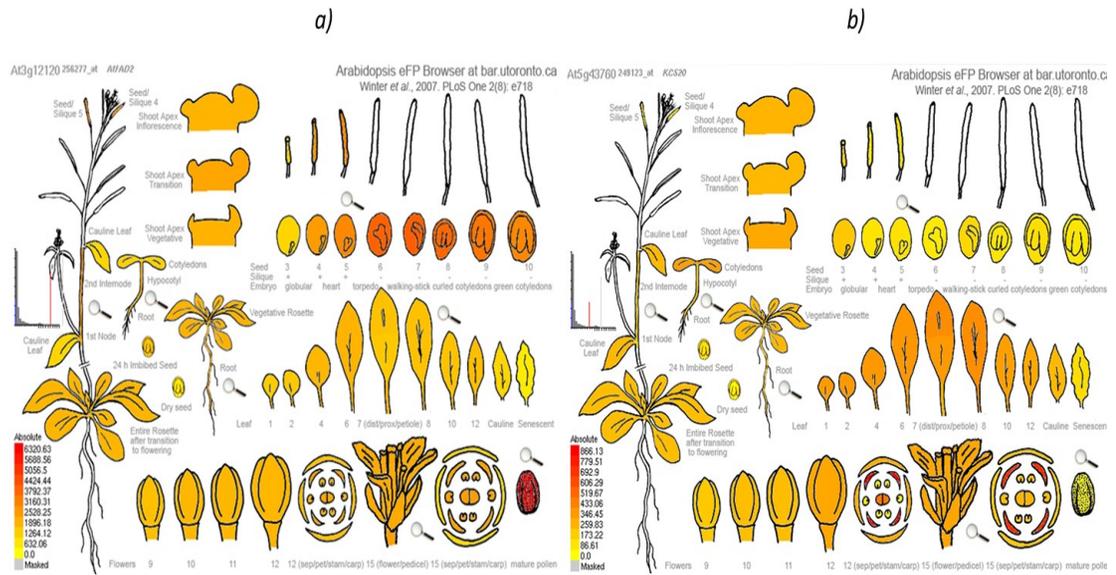


Figura 7. 1. Nivel de expresión de genes en planta de *A. thaliana*: a) gen *At3g12120*, b) gen *AT5g43760*.

7.2 Extracción de RNA de plantas de *A. thaliana*.

Las plantas de *A. thaliana* crecidas *in vitro* durante una semana, se emplearon para la extracción de RNA (Figura 7.2a). Una vez extraído el RNA, se procedió a la cuantificación. A la par, se colocaron semillas en una mezcla de sustrato de peat moss y perlita (Figura 7.2b) las cuales se dejaron crecer para tenerlas listas para la transformación de *A. thaliana* mediante la técnica de floral dip reportada por Martínez *et al.*, 2004.



Figura 7. 2. a) Cultivo in vitro de *A. thaliana* de 1 semana de edad b) Cultivo de *A. thaliana* en sustrato.

La extracción se llevó a cabo por triplicado. Para conocer la pureza del RNA extraído se obtuvieron las relaciones de absorbancia $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$ que indican la pureza del RNA y se acepta puro cuando se obtienen valores entre 1.8 a 2 para la relación $260/280_{nm}$ y de 1.8 a 2.2 para la relación $260/230_{nm}$ (Sambrook *et al.*, 1989; Manchester, 1996, Djami *et al.*, 2012). Las muestras de RNA obtenidas tuvieron una concentración de 423, 488.4, 866.43 ng/ μ L; de estas muestras, solamente una de ellas tuvo una relación $A_{260/280}$ de 2.03 y una relación $A_{260/230}$ de 1.82. Esto indicó que esta muestra se encontraba libre de impurezas, ya que las dos relaciones de absorbancias ($A_{260/280}$ y $A_{260/230}$) se encuentran en el valor de referencia (Vicent & Delseny, 1999), por lo cual fue seleccionada y utilizada para la realización de síntesis de cDNA de *A.thaliana*. Cuando las relaciones de absorbancia no concuerdan con lo que indica la teoría, indica que el RNA obtenido presenta contenido de impurezas, es decir se encuentra contaminado por ejemplo algunas proteínas, carbohidratos o fenol que pudieron quedar presentes durante el proceso de extracción y no fueron eliminadas completamente, cuando este es el

caso, es necesario realizar un proceso de purificación para lograr la finalidad de eliminar cualquier contaminante presente, que afecte al RNA extraído y al análisis molecular posterior.

Para conocer la integridad de cada una de las muestras de RNA total extraído, éstas se sometieron a electroforesis en gel de agarosa. En la Figura 7.3 se muestran los resultados.

En cada muestra se visualizaron dos fragmentos que representan las subunidades de los RNAs ribosomales 18S y 28S de eucariontes (Hamby & Zimmer, 1998; Ananiev & Chernichet, 1989). Es característico que se observe en los geles el RNA ribosomal, ya que éste se encuentra en mayor proporción con respecto al RNA mensajero y de transferencia (Roger & Bendich, 1998). Al observar bandas definidas, se considera que el RNA está íntegro.

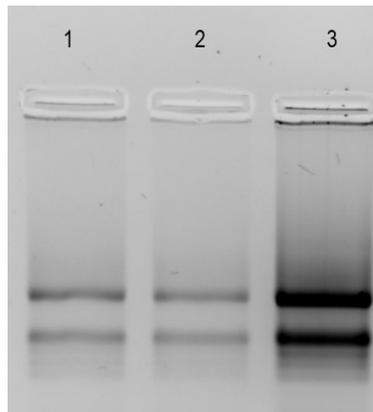


Figura 7. 3. RNA extraído de *A. thaliana*. Cada carril corresponde a una muestra de extracción independiente.

7.3 Síntesis de cDNA a partir de RNA de *A. thaliana*

Se llevó a cabo la síntesis del cDNA y posteriormente se llevaron a cabo reacciones de amplificación por PCR. Como control se amplificó el gen *Actina2*, el cual es un gen constitutivo o también llamado de “*housekeeping*”.

En la Figura 7.4 se muestra el producto de la amplificación del gen de *Actina2*. Se observó una banda de 252 pb de acuerdo al tamaño esperado. Con este resultado se verificó que la síntesis de cDNA se llevó a cabo correctamente y que podría ser utilizado para amplificar los genes *At3g12120* y *At5g43760* de *A. thaliana* para su posterior clonación utilizando el sistema Gateway.

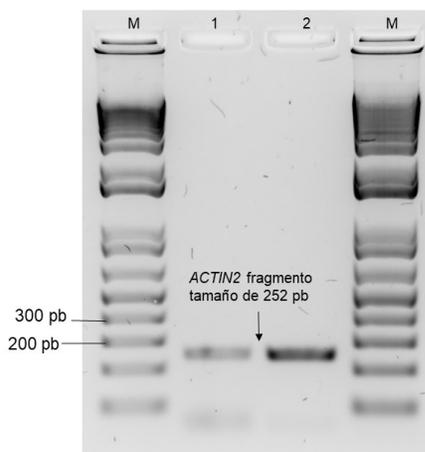


Figura 7. 4. RT-PCR del gen de *actina2*. M: Marcador peso molecular; carriles 1 y 2 producto de PCR.

7.4. Amplificación de los genes *At5g43760* y *At3g12120* de *A. thaliana*

Se realizó la amplificación de los genes *At5g43760* y *At3g12120* a partir del cDNA. Se estandarizaron las condiciones de amplificación para cada gen. Las temperaturas de alineamiento evaluadas fueron 60°C, 62°C y 64°C. Los resultados se muestran en la Figura 7.5.

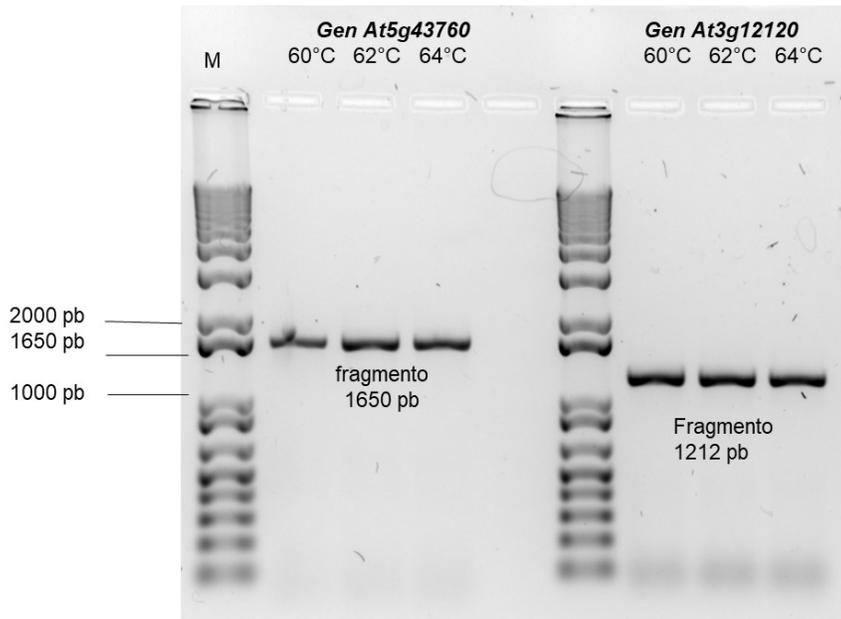


Figura 7. 5. Amplificación de los genes *At5g43760* y *At3g12120* con gradiente de 60, 62 y 64 °C, M: marcador peso molecular.

Se observó la amplificación de un fragmento de 1650 pb y otro de 1212 pb, correspondientes a los genes *At5g43760* y *At3g12120*, respectivamente. En todas las temperaturas de alineamiento no hubo amplificaciones inespecíficas, por lo que cualquiera de estas temperaturas es conveniente para amplificar estos genes. El tamaño de los fragmentos amplificados corresponde a los genes sin intrones, de acuerdo a lo reportado en la base de datos TAIR.

Para comprobar que efectivamente las amplificaciones de cada gen correspondían a las secuencias correctas, se realizó un análisis de restricción *in silico*, empleando los programas del gen script, Promega y restriction Mapper. De esta manera se seleccionaron las enzimas de corte adecuadas (Figura 7.6).

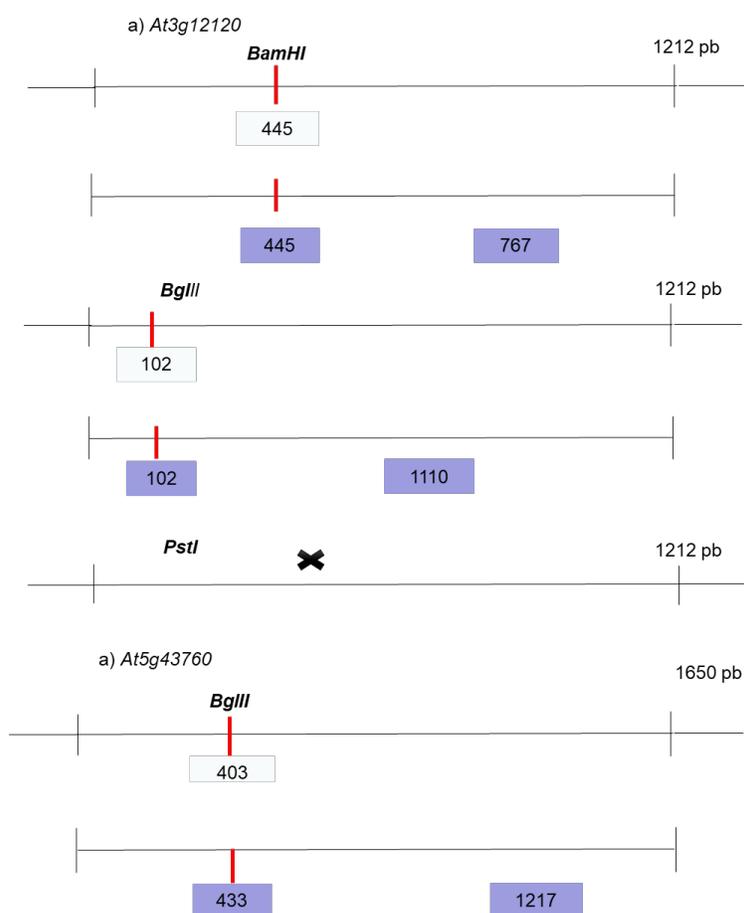


Figura 7. 6. Análisis de restricción de los genes. *At3g12120* y *At5g43760*. Las líneas rojas señalan los sitios de restricción para cada una de las enzimas.

Posteriormente, se procedió a hacer la restricción *in vitro*. El gen *At3g12120* se digirió con las enzimas *BamHI* y *Bgl II*. La restricción con *BamHI* generó dos fragmentos de 445 pb y 767 pb (Figura 7.7a). La enzima *Bgl II* generó dos fragmentos de 102 pb y 1110 pb. Adicionalmente se utilizó la enzima *PstI*, la cual no tiene sitio de corte en esta secuencia. En lo que respecta al gen *At5g43760*, se utilizó la enzima *BglIII*, la cual generó un fragmento dos fragmentos de 433 y 1217 pb (Figura 7.7b).

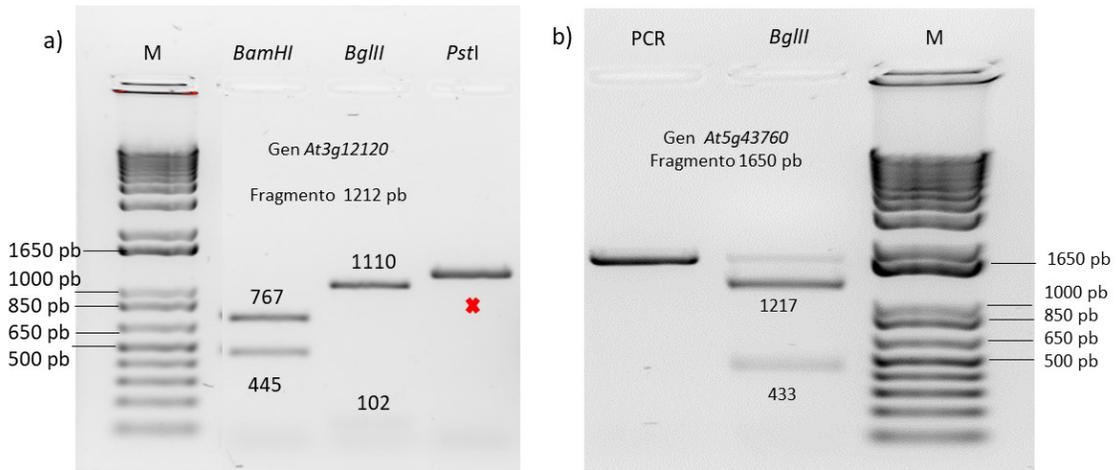


Figura 7. 7. Análisis de restricción para los genes *At3g12120* (a) y *At5g43760* (b), M: marcador de peso molecular

Con este análisis de restricción se corroboró que los productos amplificados corresponden a los genes bajo estudio.

7.5 Clonación Sistema Tecnología Gateway

Se obtuvieron los genes *At3g12120* y *At5g4360* clonados en el vector de entrada pDONR™ 221. Para confirmar la clonación se realizó un PCR en colonia usando los oligos específicos de cada gen, tomando como molde para la amplificación el DNA plasmídico contenido en las bacterias que crecieron en el antibiótico de selección. En la Figura 7.8 se muestra la electroforesis del producto de PCR.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

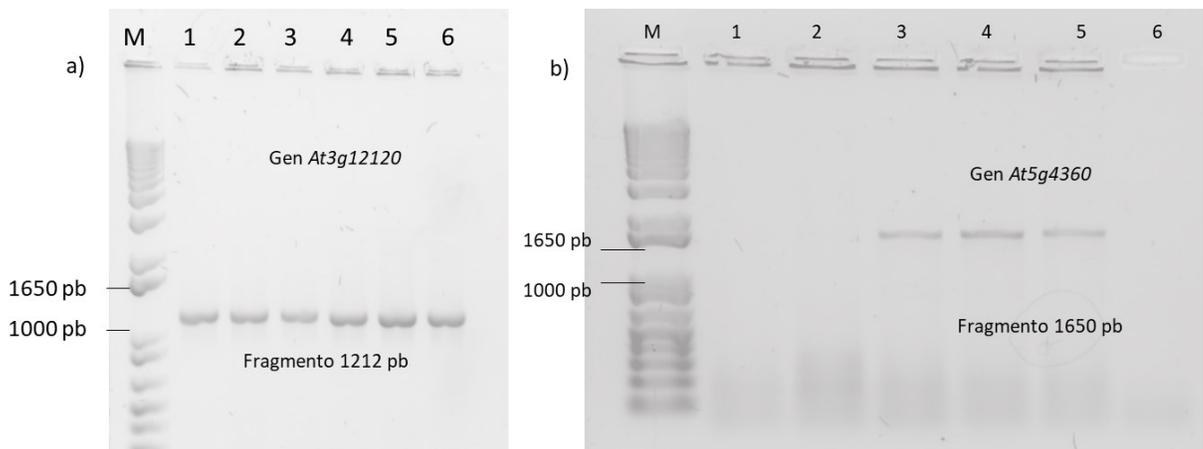


Figura 7. 8. PCR en colonia para comprobar la reacción de recombinación BP.

Para el gen *At3g12120* (Figura 7.8 a), las 6 colonias seleccionadas tuvieron el templado para llevar a cabo la amplificación, lo que indicó que todas ellas contenían al plásmido. Para el gen *At5g43760* (Figura 7.8 b) las colonias 3, 4 y 5 resultaron tuvieron el plásmido con el inserto, y por lo tanto se observó la emplificación del gen. De acuerdo con esto, se seleccionaron la colonia número 3 para *At3g12120* y la colonia número 4 para *At5g43760*.

Con estas cepas transformadas se procedió se procedió a la extracción de DNA plasmídico y se realizó la reacción LR utilizando el vector *pB7WG2*. El vector *pB7WG2* es empleado en el sistema Gateway para llevar a cabo la sobreexpresión de genes, ya que éstos quedan bajo la coordinación del promotor 35S, el cual es constitutivo (Invitrogen ®).

Una vez que se obtuvieron las construcciones LR se realizó la transformación de *E. coli DH5 α* y la selección se llevó a cabo utilizando espectinomomicina.

De la misma manera que las clonaciones antes mencionadas, para confirmar la clonación se realizó una PCR en colonia. En la Figura 7.9 se muestra la electroforesis del producto de PCR.

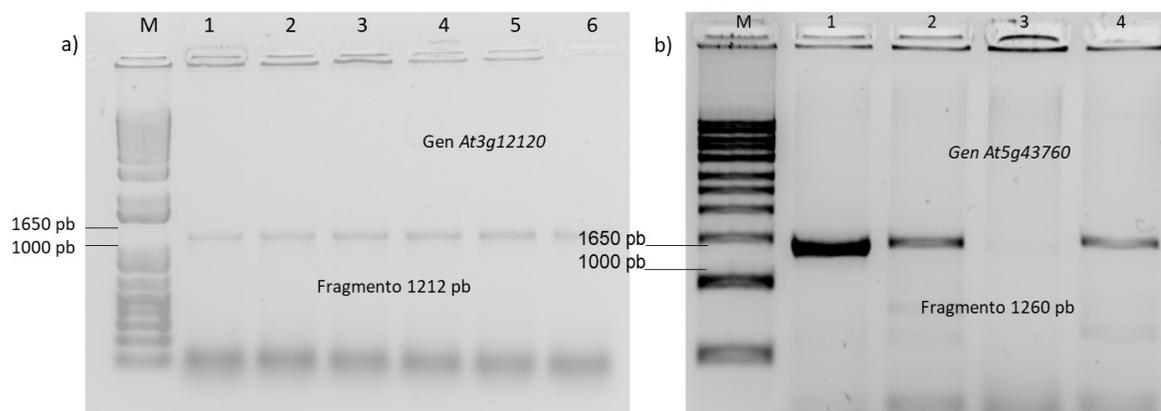


Figura 7. 9. PCR en colonia para comprobar la reacción de recombinación LR.

Para el gen *At3g12120* (Figura 7.9a) 6 colonias seleccionadas tuvieron el templado para llevar a cabo la amplificación, lo que indicó que todas ellas contenían al plásmido. Para el gen *At5g43760* (Figura 7.9b), las colonias 1, 2 y 4 contenían el plásmido con el inserto. Así, se seleccionaron la colonia 2 para *At3g12120* y la 4 para *At5g43760*.

La aplicación de la metodología del sistema Gateway ha sido ampliamente utilizada ya que es una técnica eficiente y facilita la transferencia de DNA entre vectores de expresión; además, se mantiene la orientación correcta del segmento de DNA bajo estudio, produciendo así una alta eficiencia de clonación (Tanaka *et al.*, 2017).

Además en un estudio realizado anteriormente se demostró la construcción y validación de este sistema, donde la finalidad fue clonar dos genes simultáneamente por reacciones LR con clones de entrada, para ser utilizado para

la transformación de plantas, con el objetivo de investigar las interacciones y la localización subcelular de dos proteínas en células vegetales vivas (Aboulela *et al.*, 2017).

7.6 Transformación de *A. tumefaciens*

Se llevó a cabo la transformación de *A. tumefaciens* con la finalidad que la bacteria pueda integrar los genes *At3g12120* y *At5g43760* en *A. thaliana*.

Se verificó la transformación mediante PCR en colonia. Los resultados se muestran en la Figura 7.10. Para el gen *At3g12120*, las 4 colonias seleccionadas contenían el gen de interés (Figura 7.10a). Para el gen *At5g43760*, las colonias 1 y 3 lo contenían (Figura 7.10b). En ambos casos se seleccionó la colonia 1 para llevar a cabo la transformación de *A. thaliana*.

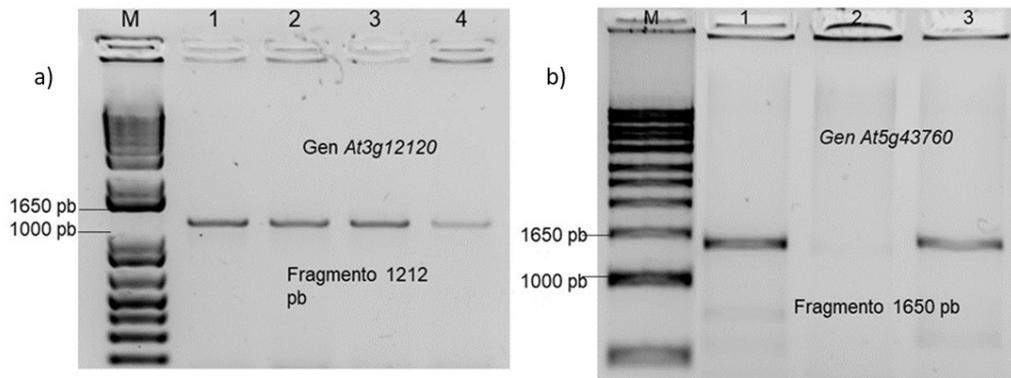


Figura 7. 10. PCR en colonia para corroborar la integración del vector de expresión con los genes *At3g12120* (a) y *At5g43760* (b) en *A. tumefaciens*. M. Marcador de peso molecular.

7.7 Obtención de plantas *A. thaliana* de transformadas.

Para la transformación, *A. tumefaciens* con los plásmidos correspondientes, se colocó sobre las estructuras florales como se muestra la Figura 7.11.



Figura 7. 11. Transformación de plantas de *A. thaliana* con los genes *At3g12120* y *At5g43760* mediada por *A. tumefaciens*.

Las plantas se cubrieron con bolsas de plástico para mantener un alto porcentaje de humedad y facilitar la integración de *A. tumefaciens* a la planta, se dejaron 12 h bajo la oscuridad. Las plantas se mantuvieron hasta su completo desarrollo y la obtención de nueva semilla. La semilla que fue sembrada en medio MS suplementado con el herbicida fosfinotricina. Este herbicida fue aplicado debido a que el vector *pB7WG2* utilizado para la sobreexpresión de los genes, aporta resistencia a este marcador de selección (Harrison *et al.*, 2006). La fosfinotricina (PPT) es el ingrediente activo presente en diversos herbicidas, se comporta como un inhibidor competitivo de la enzima glutamina sintetasa. La obtención de plantas transgénicas tolerantes a PTT, se ha logrado mediante la introducción de uno de dos genes: el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson *et al.*, 1987) o el gen *pat* de *S viridochromogenes* (Wohlleben *et al.*, 1988). Estos genes codifican

para la proteína fosfinotricina n-acetil transferasa (PAT); esta proteína acetila el grupo NH₂ de la PPT dando lugar a la formación de N-acetil fosfinotricina, que no tiene actividad (Dröge *et al.*, 1992). Por lo tanto solamente las plantas transformadas sobrevivieron en fosfinotricina (Figura 7.12).

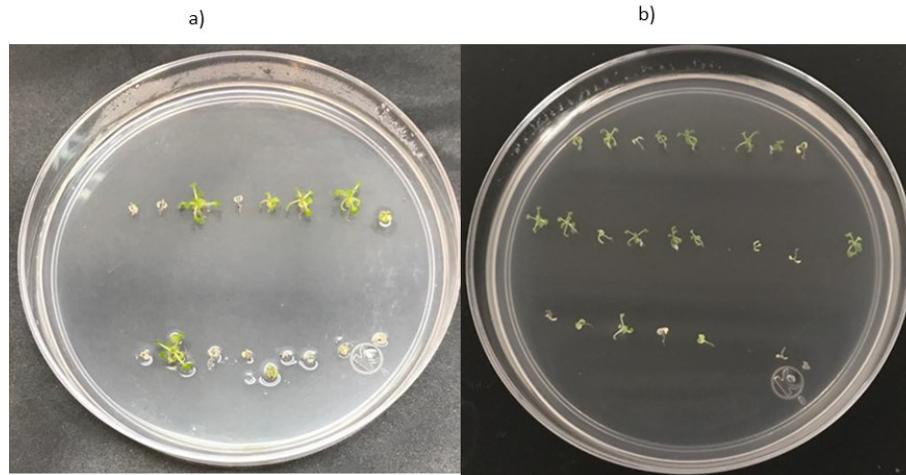


Figura 7. 12. Selección de la semilla transformada de *A.thaliana*. a) Plantas transformadas con la construcción del gen *At3g12120*. b) Plantas transformadas con la construcción del gen *At5g43760*.

7.8 Fenotipo de las plantas sobreexpresadas.

En las líneas transformadas de las plantas de *A. thaliana* sobreexpresantes de los genes *At3g12120* ó *At5g43760*, se realizó la evaluación de los fenotipos. En la Figura 7.13 se muestran los resultados. Se observó que las plantas sobreexpresantes del gen *At3g12120*, presentaron cambios en sus características físicas como el color de las hojas, mostrando con un color verde aparentemente más intenso, comparado con las hojas de plantas sin transformar. Además se observaron cambios en la estructura de raíz, ya que presentaron una raíz agravitropica, la cual se enrolló en la parte superior de la roseta de la planta (Figura 7.13 b). Se ha reportado que la expresión del gen *At3g12120* se lleva a cabo en

en diferentes tejidos de la planta y que su sobreexpresión modifica características físicas de las hojas, tallo y raíz (Dar AA *et al.*, 2017). En otros estudios independientes, se evaluaron los patrones de expresión de *At3g12120* en *A. thaliana* y se observó que el ARNm que codifica para este gen, se detectó en diferentes estructuras de la plántula, sugiriendo que al sobreexpresarlo es posible esperar cambios en los fenotipos de algunas estructuras de la planta (Zhang *et al.*, 2012).

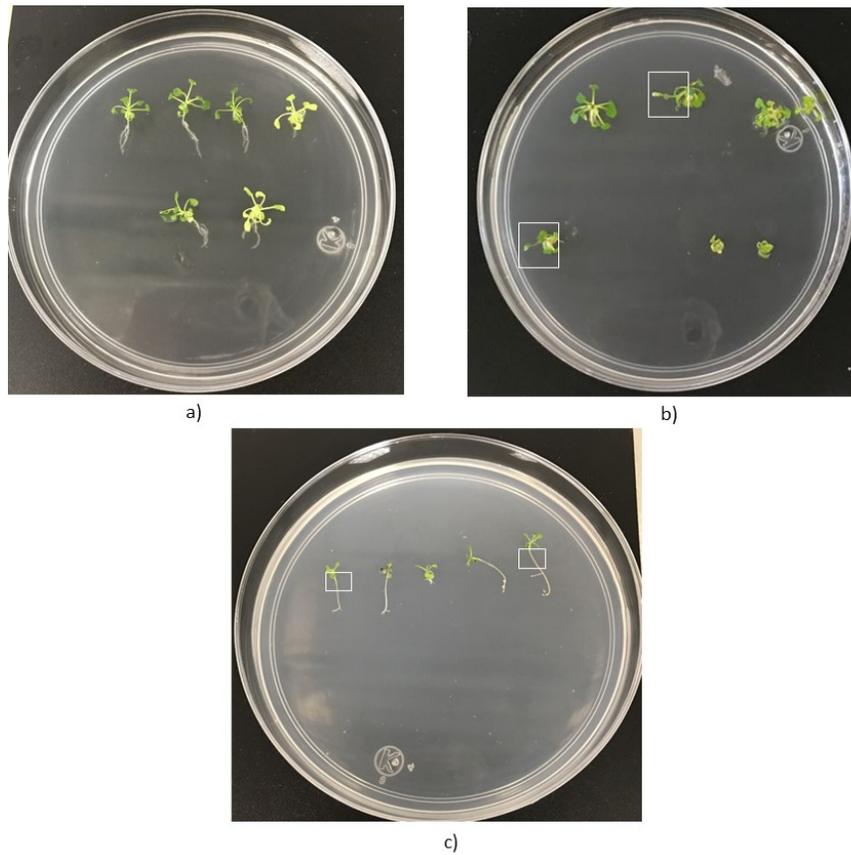


Figura 7. 13. Fenotipos de Plantas sobreexpresantes *A. thaliana*. a) Plantas control sin transformar, b) Plantas sobreexpresando gen *At3g12120*. Las plantas sobreexpresante presentan cambios en color de la hoja a verde más oscuro, raíz agravitropica y presencia de inflorescencias a temprana edad (mostrado en el recuadro). c) plantas sobreexpresando gen *At5g43760* presentando un alargamiento del hipocotilo (tallo) (mostrado en el recuadro).

Las plantas sobreexpresantes del gen *At3g12120* también mostraron una aceleración en su desarrollo, ya que se observaron inflorescencias prematuras (Figura 7.13b). Este fenotipo se puede deber al incremento en la desaturación de los ácidos grasos de la membrana plasmática, la cual estaría mediada por *At3g12120*. Se ha reportado que este gen es esencial para la función de las proteínas membranales que intercambian Na^+ por H^+ , lo que podría inducir a un crecimiento temprano de las plántulas en *A. thaliana* (Zhang *et al.*, 2012). En lo que respecta a este estudio, al llevar a cabo la sobreexpresión del gen *At3g12120*, se propone que habría un aumento del producto de este gen, que correspondería a una desaturasa, influenciando la aceleración del crecimiento de la planta.

En lo que respecta a las sobreexpresantes del gen *At5g43760*, al realizar la comparación con las plantas control, se observaron cambios fenotípicos, ya que la raíz de las plantas sobreexpresantes presentó pocas raíces laterales. Además, las plantas presentaron alargamiento del tallo (hipocotilo) (Figura 7.13c). Esto se puede explicar ya que el gen *At5g43760*, además de participar en el proceso biosintético de ácido grasos, también se ha reportado que responde a estímulos de luz, provocando una reacción hormonal en la planta, cuya consecuencia es un alargamiento del tallo hacia la fuente de luz (Halliday, 2004). Esta respuesta se denomina fototropismo, el cual implica un movimiento de la planta de acuerdo a la orientación de la luz (Li *et al.*, 2014). Las plantas de *A. thaliana* que sobreexpresaron al gen *At5g43760*, probablemente tuvieron una respuesta exacerbada a la luz, presentando un hipocotilo elongado a diferencia de las plantas control.

A estas plantas se les realizó un análisis histológico para detectar diferencias entre sus partes estructurales. De acuerdo con esto, se observó que las plantas sobreexpresantes del gen *At3g12120* presentaron un mayor número de tricomas

en las hojas, en comparación con las plantas control (Figura 7.14 a1). Los tricomas producen y acumulan metabolitos secundarios, como los flavonoides, fenilpropanoides, terpenoides y alcaloides que presentan una actividad antifúngica ante fitopatógenos (Agati *et al.*, 2012; Gang *et al.*, 2001; Tian *et al.*, 2018; Valletta *et al.*, 2013).

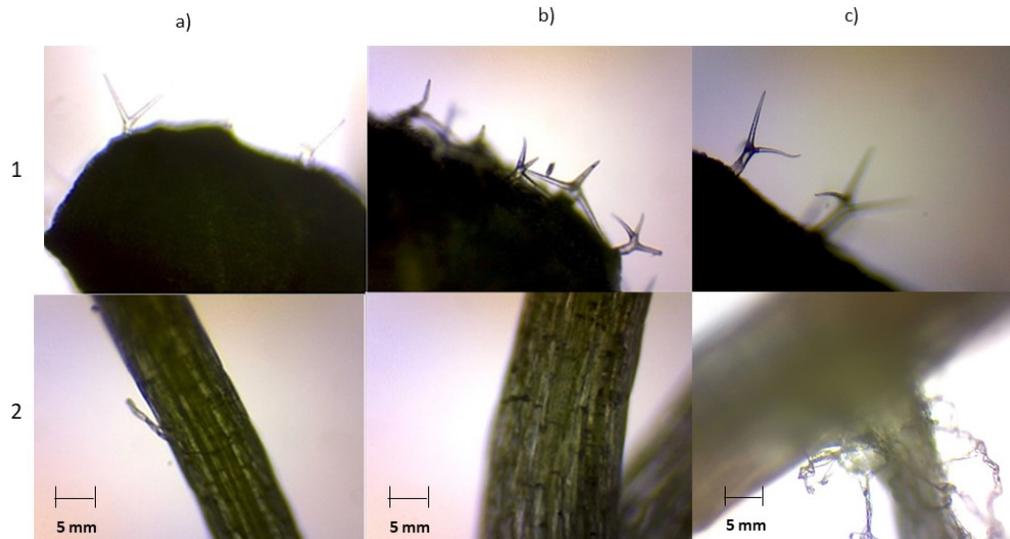


Figura 7. 14. Análisis histológico de plantas sobreexpresantes. a) Planta control, b) sobreexpresante de *At3g12120*, c) sobreexpresante de *At5g43760*. El número 1 corresponde a muestras de hojas. El número 2 corresponde a muestras de tallo.

Otro cambio observado en las plantas sobreexpresantes del gen *At3g12120*, fue es que presentó un aumento del grosor del tallo, en comparación con las plantas control (Figura 7.14b2). Se ha reportado que este gen presenta un mayor nivel de expresión en la parte estructural del tallo y parte de sus funciones están relacionadas con la formación del vástago del tallo (Da AA *et al.*, 2017).

De acuerdo con esto, es posible que las plantas que sobreexpresan al gen *At3g12120* sean más resistentes al ataque de fitopatógenos, dado que presentan más tricomas y su tallo es más grueso que las plantas control.

Con respecto al análisis histológico realizado para las plantas que sobreexpresan al gen *At5g43760*, no se observaron diferencias respecto al número de tricomas presentes en la hoja, en comparación con las plantas control (Figura 7.14a1). Sin embargo, al observar la parte estructural del tallo se observó un aumento en el grosor del tallo, comparado con el control (Figura 7.14 a2). De acuerdo a los análisis realizados en la base de datos del TAIR, este gen se expresaría mayoritariamente en el vástago del tallo, por lo que la sobreexpresión a este nivel puede ser la responsable del del tallo.

En un estudio se aislaron genes entre los cuales se encontraba el gen *At5g43760*, que mostraron una mayor expresión en la epidermis del tallo (Shu *et al.*,2005), por lo que se relacionaron funcionalmente en la elongación de dos carbonos a C₂₂ VLCFA (ácido grasos de cadena muy larga) que se requiere para la cera cuticular y la biosíntesis de la suberina en raíz, además que los VLCFA saturados promueven el alargamiento de tallo en *A. thaliana*, proporcionando así una lista de posibles genes candidatos para la maquinaria de ensamblaje, secreción y síntesis de lípidos de superficie (Lee *et al.*,2009) .

7.9 Actividad antifúngica *in vitro* de los extractos de las plantas de *A. thaliana* sobreexpresantes.

Para evaluar el efecto de la sobreexpresión sobre la biosíntesis de compuestos antifúngicos, se obtuvieron extractos crudos para evaluar posible efecto antifúngico frente al hongo fitopatógeno *C. gloeosporioides*.

En la Figura 7.15 se muestra el efecto de los extractos de las plantas sobreexpresantes del gen *At3g12120* evaluados a diferentes concentraciones. Como control fue evaluado el crecimiento micelial del hongo sin extractos y el crecimiento del hongo con extractos de plantas no sobreexpresantes. Es interesante observar que los extractos de las plantas control, modifican el crecimiento y desarrollo *C. gloeosporioides*, mostrando una inhibición del 10.52% sugiriendo que *A. thaliana* puede producir compuestos capaces de afectar el desarrollo de este fitopatógeno.

En lo que respecta a los extractos de las sobreexpresantes, se observó que en la concentración de 16mg/mL hubo un 45.45% de inhibición del crecimiento micelial comparado con las demás concentraciones y con los controles. Adicionalmente, se afectó el desarrollo del micelio, ya que su aspecto fue diferente al del control (Figura 7.15c). De acuerdo con estos resultados, se sugiere que la sobreexpresión del gen *At3g12120* indujo la formación de compuestos antifúngicos capaces de inhibir el crecimiento y desarrollo de *C. gloeosporioides*.

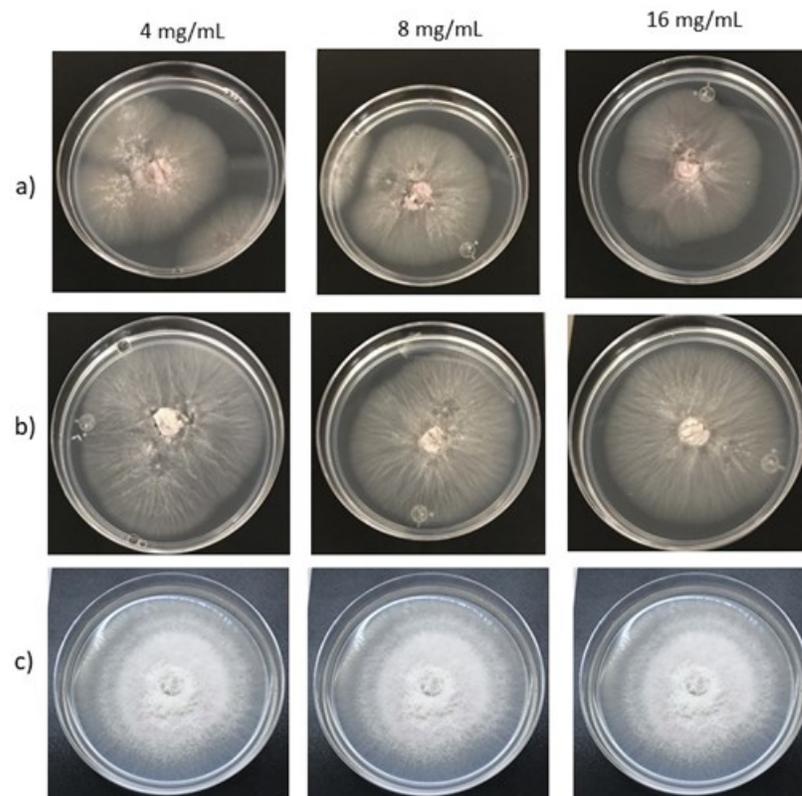


Figura 7. 15. Comparación de evaluación antifúngica de los extractos. a) Plantas sobreexpresantes con el gen *At3g12120*, b) Plantas control (sin transformar), c) Hongo *C. gloeosporioides* crecido sin extracto.

En relación al efecto antifúngico del extracto de plantas sobreexpresantes del gen *At5g43760*, no hubo diferencia entre las concentraciones de 4 y 16 mg/mL, sin embargo, la concentración de 8 mg/mL, presentó un porcentaje de inhibición del 20% comparado con las plantas control sin transformar (Figura 7.16b). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión del gen *At5g43760* también pudiera inducir la formación de compuestos que inhiben el crecimiento y desarrollo de *C. gloeosporioides*, aunque su efecto es menor al observado para el gen *At3g12120*.

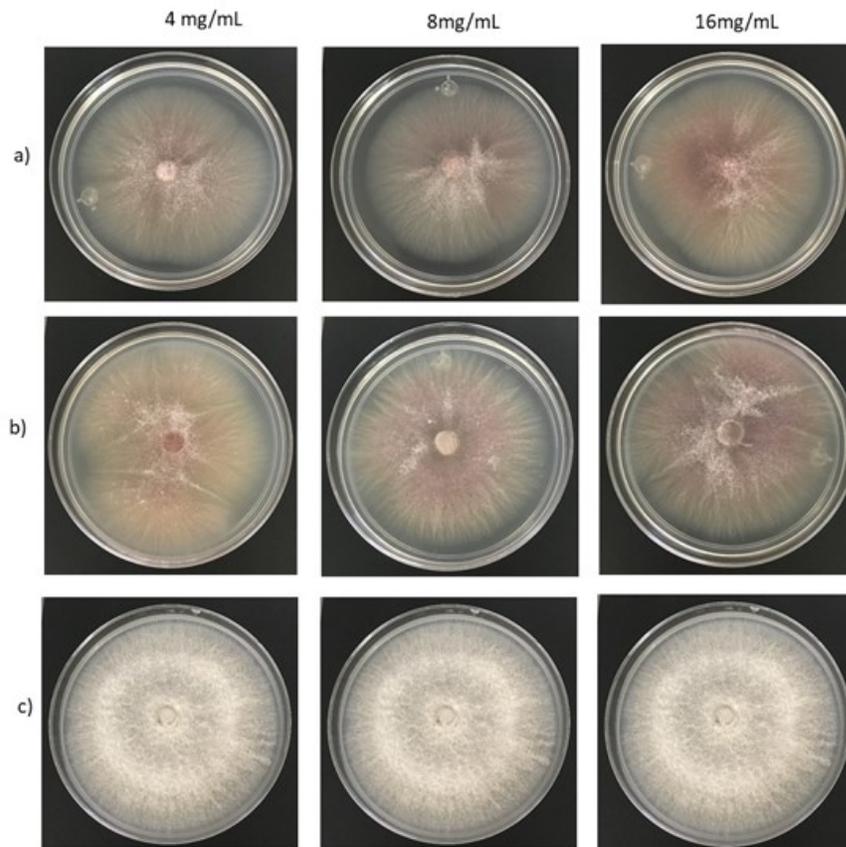


Figura 7. 16. Comparación de evaluación antifúngica de los extractos. a) Plantas sobreexpresantes con gen *At5g43760*, b) Plantas control (sin transformar), c) Hongo *C. gloeosporioides* sin extracto.

Los resultados obtenidos sugieren que *A. thaliana* reúne los elementos moleculares necesarios para responder a la inducción de genes similares a los de aguacate (*Avfae 1*, *Avfad 12-3*) involucrados en la biosíntesis de compuestos antifúngicos como la persina, el cual es el compuesto antifúngico más activo en aguacate que inhibe el desarrollo de *C. gloeosporioides* en el fruto (López, 2010), Se ha reportado que la persina de aguacate presenta estructura similar a la de un ácido graso (Rodríguez & Trumble, 2000), y por tener compuestos lipofílicos, puede acumularse en la bicapa de fosfolípidos del hongo fitopatógeno, logrando

perforar o dañar su membrana celular. Al aumentar la permeabilidad de la membrana del patógeno, dañaría su integridad y conduciría a la muerte del patógeno (Da Cruz *et al.*, 2013; Yun & Lee, 2017). Estas plantas de *Arabidopsis* podrían estar sintetizando compuestos antifúngicos con estructuras similares a ésta, las cuales serían las responsables del efecto de inhibición observado al evaluar los extractos. El gen *At3g12120* de *Arabidopsis*, al igual que el gen *Avfad 12-3* de aguacate, participan en la conversión del ácido oleico en ácido linoleico, siendo el ácido linoleico un precursor para formación del compuesto antifúngico persina (Prusky *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2012). A su vez, el gen *At5g43760* actúa como elongasa en el proceso biosintético de ácidos grasos al igual del gen *Avfae 1* (Madi *et al.*, 2003). En *Arabidopsis* están presentes ácidos grasos de cadena larga, de 16 y 18 carbonos, que podrían ser precursores de compuestos con actividad antifúngica (Suh *et al.*, 2005).

De acuerdo a los resultados, se plantea que esta propuesta podría representar una estrategia para el control del desarrollo del hongo de *C. gloeosporioides*. Sin embargo, se requiere de la realización de más estudios, mediante técnicas analíticas, con la finalidad conocer y cuantificar los metabolitos que podrían tener efecto antifúngico presentes en las plantas sobreexpresantes. Además, se requiere de llevar a cabo análisis para determinar la inocuidad de estos extractos y poder ser aplicados en alimentos.

CAPITULO 8. CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

El sistema Gateway es una tecnología que facilita la clonación de genes de manera eficiente.

La sobreexpresión de genes permite obtener información acerca de su función, la cual permite proponer su aplicación en el mejoramiento genético.

Los extractos de las plantas sobreexpresantes de los genes *At3g12120* y *At5g43760* presentaron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento y desarrollo del hongo de *C. gloeosporioides* de 45.45 y 20% respectivamente, lo cual puede representar una alternativa en el control de este hongo fitopatógeno.

A. thaliana resultó un modelo vegetal conveniente para llevar a cabo la sobreexpresión de estos genes homólogos a los de aguacate.

Se sugiere que la planta de *A. thaliana* tiene los elementos moleculares necesarios para la formación de compuestos antifúngicos, sin embargo es necesario profundizar en este estudio para comprobar la presencia de estos compuestos mediante técnicas analíticas.

CAPITULO 9. BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

- Agati G., Azzarello E., Pollastri S., Tattini M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science*. 2012;196:67–76.
- Aboulela M, Tanaka Y, Nishimura K, Mano S, Nishimura M, Ishiguro S, et al. (2017) Development of an R4 dual-site (R4DS) gateway cloning system enabling the efficient simultaneous cloning of two desired sets of promoters and open reading frames in a binary vector for plant research. *Science Direct*. 2017; 92:1-11
- Ananiev, E.B., Chernichef, A. (1989). Molecular organization of the genome of plants. In; genome organization. (Eds.) Bogdanov y Prozorov, *Edit.Ciencia*: 218-236.
- Ardi, R, I Kobiler, B Jacoby, N T Keen, and D Prusky. (1998). Involvement of Epicatechin Biosynthesis in the Activation of the Mechanism of Resistance of Avocado Fruits to *Colletotrichum Gloeosporioides*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 53 (5–6): 269–85.
- Beno-Moualem, D, and D Prusky. 2000. Early Events During Quiescent Infection Development by *Colletotrichum Gloeosporioides* in Unripe Avocado Fruits. *Phytopathology* 90 (5): 553–59.
- Bill, M., Sivakumar, D., Korsten, L., & Thompson, A. K. (2014). The efficacy of combined application of edible coatings and thyme oil in inducing resistance components in avocado (*Persea americana Mill.*) against anthracnose during post-harvest storage. *Crop Protection*, 64, 159–167.
- Bolívar, F. (2004). Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna. 1era edición .ISBN 970-640-235-7.

- Bowen, J., Billing, D., Connolly, P., Smith, W., Cooney, J., & Burdon, J. (2018). Maturity, storage and ripening effects on anti-fungal compounds in the skin of “Hass” avocado fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 146, 43–50.
- Bull, SD, Carman, RM.(1994). Synthesis of the Avocado Antifungal,(Z, Z)-2-Hydroxy-4-oxohenicosa-12, 15-dien-1-yl Acetate. *Aust. Journal of Chemical* 47(9): 1661-1672.
- Clough, S. J., Bent, A. F. (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 16, (6), 735-743.
- Da Cruz Cabral, L., Pinto, V.F., Patriarca, A., (2013). Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *Journal Food Microbiology*. 166, 1–14.
- Dar AA, Choudhury AR, Kancharla PK and Arumugam N (2017) The FAD2 Gene in Plants: Occurrence, Regulation, and Role. *Front. Plant Science*. 8:1789.
- Djami-Tchatchou AT, Straker CJ (2012) The isolation of high quality RNA from the fruit of avocado (*Persea americana* Mill.). *South African Journal of Botany* 78:44–46.
- Djami-Tchatchou, A. T., Allie, F., & Straker, C. J. (2013). Expression of defence-related genes in avocado fruit (cv. Fuerte) infected with *Colletotrichum gloeosporioides*. *South African Journal of Botany*, 86, 92–100.
- FAOSTAT (2016). “Statistics of crops production by country” Food and Agriculture Organization.

- Gateway® Technology (2019). A universal technology to clone DNA sequences for functional analysis and expression in multiple systems. User Guide. Invitrogen. Pp 5-25. www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/cloning/gateway-cloning.html
- Gang D.R., Wang J., Dudareva N., Nam K.H., Simon J.E., Lewinsohn E., Pichersky E. (2001) An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. *Plant Physiology*. 2001;125:539–555.
- Dröge, W., Broer I., & Pühler, A. (1992). Transgenic plants containing the phosphinothricin-N-acetyltransferase gene metabolize the herbicide l-phosphinothricin (glufosinate) differently from un-transformed plants. *Plants*. 187(1),142-151.
- Gutiérrez, M., Lara, B., Guillén, H., Chávez, A. (2010). Agroecología de la franja aguacatera en Michoacán, México. Retrieved from 0378-1844.
- Halliday, K. J. (2004). Plant hormones: the interplay of brassinosteroids and auxin. *Current Biology*. 14:1008-1010.
- Hamby, R.K. (1998). Ribosomal RNA sequences for inferring phylogeny within the grass family (Poaceae). *Plant Systematics and Evolution* 160: 29-37.
- Harrison, S. J., Mott, E. K., Parsley, K., Aspinall, S., Gray, J. C., & Cottage, A. (2006). A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Part of Springer Nature*. 5-16
- Hartley, J. L., Temple, G. F., and Brasch, M. A. (2000). DNA Cloning Using in vitro Site-Specific Recombination. *Genome Research* 10, 1788-1795.

- Hayashi, M., & Nishimura, M. (2006). Arabidopsis thaliana-A model organism to study plant peroxisomes. *Biochimica Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1763(12), 1382–1391.
- Hwang, Ok-Jin, *et al.* (2014) Phenotypic characterization of transgenic Miscanthus sinensis plants overexpressing Arabidopsis phytochrome B. *International Journal of Photoenergy*. 501-016.
- Landy, A. (1989). Dynamic, Structural, and Regulatory Aspects of Lambda Site-specific Recombination. *Annual review Biochemistry*. 58: 913-49.
- Leclercq, J., Szabolcs, T., Martin, F., y Montoro, P. (2015). Desarrollo de un nuevo vector binario *pCAMBIA* utilizando la tecnología Gateway®. *Plásmido*, 81, 50-54.
- Lee, S. , Jung, S. , Go, Y. , Kim, H. , Kim, J. , Cho, H. , Park, O. K. and Suh, M. (2009), Two Arabidopsis 3-ketoacyl CoA synthase genes, *KCS20* and *KCS2/DAISY*, are functionally redundant in cuticular wax and root suberin biosynthesis, but differentially controlled by osmotic stress. *The Plant Journal*, 60: 462-475
- Leonelli, S. (2007). Arabidopsis, the botanical Drosophila: from mouse cress to model organism. *Endeavour*, 31(1), 34–38.
- Li, J., Houpei, Z., Song, M., Su L., and Yang, J. (2014). Arabidopsis Phytochrome D Is Involved in Red Light-Induced Negative Gravitropism of Hypocotyles. *Journal of Integrative Agriculture* 13(8): 1634-1639.
- López, M. (2010). Tratamientos postcosecha en el control de la antracnosis y calidad de frutos de papaya “maradol”. Tesis de Maestría en Ciencias. Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas. Texcoco, Edo. De México.

- Mackay, I. M. (2004). Review Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology & Infection*, 10(3), 190–212.
- Madi L, Wang X, Kobilier I, Lichter A, Prusky D (2003) Stress on avocado fruits regulates 9-stearoyl ACP desaturase expression, fatty acid composition, antifungal diene level and resistance to *Colletotrichum gloeosporioides* attack. *Physiol Mol Plant Pathol* 62:277–283.
- Manchester, K.L. (1996). Use of UV methods for measurement of protein and nucleic acid concentrations. *Biotechniques*, 20(6), 968–970.
- Martínez, M., Limones V., Cabrera, J. and Herrera, L. (2004). Improving transformation efficiency of *Arabidopsis thaliana* by modifying the floral dip method. *Plant Mol Biol Rep* 22(1): 63-70
- Mendoza, V. 2010. Deshidratación de rebanadas de aguacate variedad Hass por el método Osmo-vac (osmótico-vacío) y evaluación de la calidad del producto. Tesis de Maestría en ciencias especialidad alimentos. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.
- Meinke, D., Cherry, J., Dean, C., Rounsley, S., Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science*, 282, (5389), 662.
- Pawluczyk, M., Weiss, J., Links, M. G., Egana Aranguren, M., Wilkinson, M. D., & Egea-Cortines, M. (2015). Quantitative evaluation of bias in PCR amplification and next-generation sequencing derived from metabarcoding samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(7), 1841.
- Proost, S., & Mutwil, M. (2016). Tools of the trade: Studying molecular networks in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 30, 130–140.

- Prusky, D, Ilana Kobiler, and Benjamin Jacoby. (1985). Inhibitors of Avocado Lipoxygenase : Their Possible Relationship with the Latency of Colletotrichum Gloeosporioides. *Physiological Plant Pathology* 27: 269–79.
- Prusky, Dov, and Amnon Lichter. (2007). “Activation of Quiescent Infections by Postharvest Pathogens during Transition from the Biotrophic to the Necrotrophic Stage.” 1415-1421.
- Rodriguez, C., & Trumble, J. (2000). Biologically Active Aliphatic Acetogenins from Specialized Idioblast Oil Cells. *Current Organic Chemistry*, 4, 1249–1260.
- Roger, S.O., Bendich, A.J. (1988). Recombination in *E. coli* between cloned ribosomal RNA intergenic spacers from *Vicia faba*: a model for the generation of ribosomal RNA gene heterogeneity in plants. *Plant science* 55:27-31.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989) . Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Sambrook, J., Russell, D.(2001). Molecular cloning: A laboratory manual. 3rd. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York
- Saura, F., Serrano J., Goñi, I. (2007) Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chem* 101:492–501.
- Sharma, V.; Xu, M.; Vail, J.; Campbel, R. (1998) . Comparative analysis of multiple techniques for semi-quantitation of RT-PCR amplicons. *Biotechnology Techniques* 12, 521-524.
- SAGARPA.gob.mx.<http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/nayarit/boletines/Paginas/BNSAGABR042017.aspx>.

- SIAP, (2016). “Resumen nacional por estado” Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera”. www.gob.mx/siap. Suh, M., Samuels, A., Jetter, R., Kunst, L., Pollard, M., Ohlrogge, J., & Fred Beisson. (2005). Cuticular Lipid Composition, Surface Structure, and Gene Expression in Arabidopsis Stem Epidermis. *Plant Physiology*, 139(4), 1649-1665.
- Tian, N., Liu, F., Wang, P., Yan, X., Gao, H., Zeng, X., & Wu, G. (2018). Overexpression of *BraLTP2*, a Lipid Transfer Protein of *Brassica napus*, Results in Increased Trichome Density and Altered Concentration of Secondary Metabolites 19 (6), 2018.
- Thompson, C.J., Movva, N.R., Tizard, R., Cramer, R., Davies, J.E., Lauwereys, M., & Botterman J. (1987). Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO Journal*, 6(9), 2519-2523.
- Ueki, S., Lacroix, B., Krichevsky, A., Lazarowitz, S. G., & Citovsky, V. (2008). Functional transient genetic transformation of Arabidopsis leaves by biolistic bombardment. *Nature Protocols*, 4(1), 71–77.
- Valletta A., Santamaria A. R., Canini A., Canuti L., Pasqua G. (2013) Trichomes in *Camptotheca acuminata* Decaisne (Nyssaceae): Morphology, distribution, structure, and secretion. *Plant Biosyst* 2013;147:548–556.
- Vicient CM, Delseny M. (1999). Isolation of total RNA from Arabidopsis thaliana Seeds. *Analytical Biochemistry*, 268(2): 412-413.
- Wang X, Kobiler I, Lichter A, Leikin-Frenkel A, Pesis E, Prusky D. (2006a). 1-MCP prevents ethylene-induced accumulation of antifungal diene in avocado fruit. *Physiol Mol Plant Pathol* 67:261–267.

- Wang X, Kobiler I, Lichter A, Leikin-Frenkel A, Prusky D. (2004b). Enhanced expression of *avfae1* encoding a long-chain fatty acid elongase during the induction of the antifungal diene in avocado fruits. *Physiol Mol Plant Pathol* 65:171–180.
- Wall, D. (2009). Recombinant DNA, basic procedures. *Encyclopedia of Microbiology* (third edition), pages 271-280.
- Weisberg, R. A., and Landy, A. (1983) Site-Specific Recombination in Phage Lambda. In *Lambda II*, R. A. Weisberg, ed. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press), pp. 211-250.
- Wohlleben, W., Arnold, W., Broer, I., Hillemann, D., Strauch, E., & Punier, A. (1988). Nucleotide sequence of the phosphinothricin N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene*, 70(1), 25-37.
- Xoca, L., Cuellar, E., González, S., Gutiérrez, P., López, U., Herrera, E., Vega, J., Chacón, A. (2017). Transcriptomic Analysis of Avocado Hass (*Persea americana Mill*) in the Interaction System Fruit-Chitosan-Colletotrichum. *Frontiers in Plant Science*, 8(6), 956.
- Xoca, L., Aguilera, S., Vega, J., Acevedo, G., Tovar, E., Stroll, A., Herrera, L., Chacón, A. (2018). Activation of the phenylpropanoid biosynthesis pathway reveals a novel action mechanism of the elicitor effect of chitosan on avocado fruit epicarp. *Food Research International*. 12-023.
- Yakoby, N, D Beno-Moualem, I Kobiler, and D Prusky. (2002). "The Analysis of Fruit Protection Mechanisms Provided by Reduced-Pathogenicity Mutants of *Colletotrichum Gloeosporioides* Obtained by Restriction Enzyme Mediated

Integration.” *Phytopathology* 92 (4): 1196–1201.

Yesilirmak, F., y Sayers, Z. (2009). Expresión heteróloga de genes vegetales. *Revista internacional de genómica de plantas*, 2009 , 296-482.

Yun, D.G., Lee, D. G., (2017). Silymarin exerts antifungal effects via membrane targeted mode action by increasing permeability and inducing oxidative stress. *BBA-Biomembr.* 1859, 467-474

Zhang, J., Liu H., Sun, J., Li, B., Zhu, Q., *et al.* (2012) Arabidopsis Fatty Acid Desaturase FAD2 Is Required for Salt Tolerance during Seed Germination and Early Seedling Growth. *PLoS ONE* 7(1): e30355.

CAPÍTULO 10. ANEXOS

10. ANEXOS

Preparación medio LB (Luria Broth) (250mL)

Triptona	2.5 g
Extracto Levadura	1.25 g
NaCl	1.25 g
Agar	3.75

Preparación medio MS (Murashige y Sookg) (150mL)

Sales MS	0.66 g
Sacarosa	1.5 g
Agar	1.2 g

Medio PDA Comercial Agar Papa dextrosa (250mL)

Agar papa dextrosa	9.75 g
Agua destilada	250mL

Para la preparación de medio se cultivos una vez preparados. Se esterilizan en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Preparación EDTA 1M

Pesar 14.612 g EDTA en agua desionizada 40 mL mezclar con agitación y calentamiento, ajustar PH 8

Preparación TAE 10 X	(1 litro)
Tris	48.4 g
Ácido acético	11.42 g
EDTA (1M)	10 mL

Disolver tris, ácido acético y EDTA en 500 mL de agua destilada, finalmente aforar a 1 litro.

TAE 1X

Tomar 100 mL del TAE 10X preparado y aforar a 1 litro con agua destilada en un frasco de vidrio.

Preparación de agua DEPC (Dietilpirocarbonato)

Colocar 1 mL de DEPC en un frasco con tapón con agua desionizada, dejar en agitación durante 24 horas, posteriormente esterilizar en autoclave y almacenar hasta su uso.

Preparación de Antibióticos

Rifampicina	Rif ¹⁰⁰	100 mg/mL disolver en DMSO
Carbenicilina	Cab ¹⁰⁰	100mg/mL disolver en agua destilada estéril
Espectionomicina	Sp ¹⁰⁰	100mg/mL disolver en agua destilada estéril
Kanamicina	Kn ⁵⁰	50mg/mL disolver en agua destilada estéril

Preparación gel agarosa al 1%

Pesar 1 gr de agarosa y disolver en 100mL de TAE IX mediante calentamiento, enfriar un poco y vaciar en cámara de electroforesis.



Otorgan la presente

CONSTANCIA

Al trabajo de investigación en la modalidad de **CARTEL**:
Sobreexpresión en *Arabidopsis thaliana* de los genes homólogos a los involucrados en la síntesis del compuesto antifúngico Persina en aguacate Hass (*Persea americana* Mill)

Realizado por:
Alejandra Chacón López

Gloria Arlette Rodríguez Aguirre | Luis Ángel Xoca Orozco
Selene Aguilera Aguirre | Ulises López García

Para el V SIMPOSIO NACIONAL DE HERRAMIENTAS DE BIOTECNOLOGÍA PARA UNA AGRICULTURA SUSTENTABLE
Realizado los días 3, 4 y 5 de Octubre del presente
en la ciudad de Guadalajara, Jalisco.

Dr. Gabriel Ernesto Enriquez
CIATEJ

Dr. Gustavo Javier Azavedo Hernández
CUCBA

Dra. Celilia Valencia Sánchez Hernández
CUCBA

Dr. Saúl Flores Velázquez
COORDINADOR DE LA RED

Año 2018

RESUMEN

El aguacate (*Persea americana*) es uno de los cultivos más importantes en México. Sin embargo, la comercialización de este fruto es reducida debido a pérdidas generadas por el desarrollo de enfermedades causadas por fitopatógenos como *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal de la antracnosis. Se ha reportado que el fruto de aguacate en madurez fisiológica, contiene compuestos con actividad antifúngica, entre los cuales se encuentra (12z, 5z)-1-acetoxy-2-hydroxy-4-oxo-heneicosa-12,15-diene (Persina) que inhibe el desarrollo de este fitopatógeno. Los genes *Avfad 1*, y *Avfae 12-3*, están involucrados en la biosíntesis de Persina, y aumentan su expresión al inducir el sistema de defensa del fruto, aún cuando éste ha alcanzado su madurez de consumo, proporcionándole mayor resistencia al ataque del hongo. Este trabajo presenta una propuesta para evaluar el efecto de la sobreexpresión en *Arabidopsis thaliana* de los genes homólogos a los involucrados en la biosíntesis del compuesto antifúngico Persina en aguacate Hass. Para realizar esta sobreexpresión primeramente se realizó un análisis bioinformático donde se determinó el gen con mayor homología a *Avfae 1* en *A. thaliana* fue *At5g43760* y para el gen *Avfad 12* su homólogo *At3g12120*, posteriormente se realizó la extracción de RNA total de *A. thaliana* con una concentración de 325 ng/uL, para posteriormente obtener cDNA. A partir del cDNA se lograron obtener los amplicones de los genes *At5g43760* y *At3g12120*. Finalmente se obtuvo una clonación de cada gen mediante recombinación homóloga, así como las construcciones con los genes para su posterior introducción en *Agrobacterium tumefaciens* y su sobreexpresión en *A. thaliana*.