

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER



BIBLIOTECA EDUARDO COTE LAMUS



RESUMEN TRABAJO DE GRADO

AUTOR(ES):

NOMBRE(S): JONATHAN JOSÉ APELLIDOS: ACOSTA BAYONA

FACULTAD: DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

PROGRAMA ACADÉMICO: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

DIRECTOR(ES):

NOMBRE(S): NEFTALI APELLIDOS: OCHOA ALEJO

TITULO DEL TRABAJO (TESIS): ESTUDIO FUNCIONAL DE LOS GENES ipp Y lcy IMPLICADOS EN LA RUTA DE LA BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES EN FRUTOS DE CHILE (Capsicum eximium) POR MEDIO DE SILENCIAMIENTO GÉNICO

RESUMEN

Se ha identificado una ruta de biosíntesis de carotenoides en frutos de Chile, en el cual se encuentran los genes ipp (isopentenil pirofosfato isomerasa) y lcy (licopeno ciclasa), reportados como participantes por otros autores en otras especies de Capsicum spp. En este trabajo se utilizó el método de silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) de esos genes, para estudiar su función en la regulación de la biosíntesis de carotenoides a través de la infiltración con, Agrobacterium tumefaciens. La acumulación de carotenoides totales fue determinada por espectrofotometría de luz ultravioleta, y la expresión relativa de los genes se midió por PCR en tiempo real. Los datos obtenidos fueron comparados, por un análisis de varianza ANOVA, seguido por la prueba de Tukey para determinar si existían diferencias significativas.

Se evaluaron cuatro tratamientos: plantas infectadas con las construcciones del vector de silenciamiento para cada gen pTRV1/pTRV2-ipp, pTRV1/pTRV2-lcy, plantas infectadas con el vector vacío y plantas control, las cuales no fueron infectadas. Al cabo de 60 días post-antesis, los frutos colectados de los tratamientos infectados con los vectores de silenciamiento de cada gen, presentaron fenotipo (blaqueamiento de frutos pasados los 60 días por falta de carotenoides); esos frutos se sometieron a análisis de expresión génica y de contenido de carotenoides, en los cuales se observó una reducción de la expresión génica relativa, y una reducción en la acumulación de carotenoides totales con diferencias significativas de los genes hacia las plantas infectadas con el vector vacío y el control.

CARACTERÍSTICAS

No de páginas: 89 PLANOS: ILUSTRACIONES: 23 CD-ROM: 1

**ESTUDIO FUNCIONAL DE LOS GENES *ipp* Y *lcy* IMPLICADOS EN LA RUTA
DE LA BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES EN FRUTOS DE CHILE (*Capsicum
eximium*) POR MEDIO DE SILENCIAMIENTO GÉNICO**

JONATHAN JOSE ACOSTA BAYONA

**UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERIA BIOTECNOLOGICA
CÚCUTA**

2015

**ESTUDIO FUNCIONAL DE LOS GENES *ipp* Y *lcy* IMPLICADOS EN LA RUTA
DE LA BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES EN FRUTOS DE CHILE (*Capsicum
eximium*) POR MEDIO DE SILENCIAMIENTO GÉNICO**

JONATHAN JOSE ACOSTA BAYONA

**Trabajo de grado modalidad investigación presentado como requisito para optar al
título de Ingeniero Biotecnológico**

Director:

DR. NEFTALÍ OCHOA ALEJO

INVESTIGADOR 3D, SNI III

**UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIA AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERIA BIOTECNOLOGICA
CÚCUTA**

2015

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE UN TRABAJO DE GRADO

FECHA: 22 DE MAYO 2015

HORA: 08:00 A.M.

LUGAR: SALA 3 CREAD

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

TÍTULO: ESTUDIO FUNCIONAL DE LOS GENES *ipp* Y *lcy* IMPLICADOS EN LA RUTA DE LA BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES EN FRUTOS DE CHILE (*Capsicum eximum*) POR MEDIO D SILENCIAMIENTO.

MODALIDAD: INVESTIGACIÓN

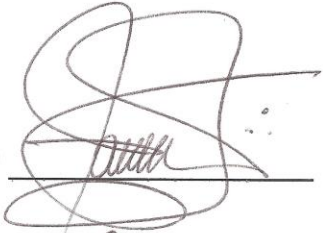
JURADOS:
LILIANA YANETH SUÁREZ CONTRERAS
LEIDY DIANA ÁRDILA LEAL
JUAN CARLOS RAMÍREZ BERMÚDEZ

DIRECTOR: Ph.D. NEFTALÍ OCHOA ALEJO - INVESTIGADOR 3D, SNI III - CINVESTAV

NOMBRE DEL ESTUDIANTE	CÓDIGO	CALIFICACIÓN
JONATHAN JOSÉ ACOSTA BAYONA	1610644	4.5

OBSERVACIONES: MERITORIA

FIRMA DE LOS JURADOS:

Liliana Yaneth Suárez Contreras Leidy Diana Ardila Leal 

Vo. Bo. Coordinador Comité Curricular José Ochoa Alejo

RESUMEN

El chile es un producto agrícola de gran importancia comercial, ya que presenta un alto contenido nutricional en comparación con otras hortalizas de amplio consumo como el tomate. Los frutos del chile *Capsicum* spp, sintetizan una serie de metabolitos entre los cuales encontramos los carotenoides y las antocianinas. Los carotenoides son los metabolitos objeto de estudio en este trabajo; estos compuestos son los responsables de los colores amarillos, anaranjados y rojos en frutos y algunas verduras. Estos pigmentos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y son usados como agente antioxidantes participantes en la desactivación de los radicales libres, además de poseer la capacidad de absorber luz, y propiedades nutraceuticas, pues algunos autores les atribuyen propiedades anticancerígenas y antiinflamatorias. A nivel comercial, son usados como colorantes de alimentos y cosméticos.

Se ha identificado una ruta de biosíntesis de carotenoides en frutos de chile, en el cual se encuentran los genes *ipp* (isopentenil pirofosfato isomerasa) y *lcy* (licopeno ciclasa), reportados como participantes por otros autores en otras especies de *Capsicum* spp. En este trabajo se utilizó el método de silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) de esos genes, para estudiar su función en la regulación de la biosíntesis de carotenoides a través de la infiltración con, *Agrobacterium tumefaciens*. La acumulación de carotenoides totales fue determinada por espectrofotometría de luz ultravioleta, y la expresión relativa de los genes se midió por PCR en tiempo real. Los datos obtenidos fueron comparados, por un análisis de varianza ANOVA, seguido por la prueba de Tukey para determinar si existían diferencias significativas.

Se evaluaron cuatro tratamientos: plantas infectadas con las construcciones del vector de silenciamiento para cada gen pTRV1/pTRV2-*ipp*, pTRV1/pTRV2-*lcy*, plantas infectadas con el vector vacío y plantas control, las cuales no fueron infectadas. Al cabo de 60 días post-antesis, los frutos colectados de los tratamiento infectados con los vectores de silenciamiento de cada gen, presentaron fenotipo (blanqueamiento de frutos pasados los 60 días por falta de carotenoides); esos frutos se sometieron a análisis de expresión génica y de contenido de carotenoides, en los cuales se observó una reducción de la expresión génica relativa, y una reducción en la acumulación de carotenoides totales con diferencias significativas de los genes hacia las plantas infectadas con el vector vacío y el control.

DEDICATORIA

A Jehová Dios altísimo, por permitirme terminar mi carrera profesional, por darme la vida y el sustento en cada día de mi vida, a Él le quiero dedicar este trabajo, porque me dio las fuerzas necesarias para seguir luchando, la sabiduría para entender cada concepto y la fortaleza para no desviarme del camino, a Él le agradezco por esta victoria, y que con su ayuda y compañía pueda cosechar muchas otras.

A mis padres Richard Cesar Acosta y mi querida madre Jackeline Bayona, por su gran esfuerzo, dedicación y paciencia. Agradezco por la confianza que depositaron desde un inicio en mí, porque sus ejemplos, me impulsan a seguir superándome cada día más, y sin esa motivación no estaría donde estoy, ni llegaría a donde quiero estar. Gracias a toda mi familia, mis padres, hermanos Anthony y Sebastián, tíos, primos y abuelos. Los quiero mucho y siempre estarán en mi corazón.

Por último, agradezco a mis amigos Yeily, Ismael, Diego, Elkin, Yorladys, Freddy, Cuellar, Zully, Diego Cárdenas, Pacy, Karime, Helen, a mis mejores amigos John Carlos Botia y Víctor Alexis Cely, que influyeron de manera positiva en mi vida, a todos ellos les agradezco el haberme acompañado en este largo camino. Agradezco además a una persona muy especial en mi vida, que siempre creyó en mí y me impulsó para superarme cada día más, me ayudó lo más que pudo, y siempre sacó lo bueno de mí; de todo corazón le doy las gracias a la señorita Erika Alfayuset Ochoa Chacón, esa lindura que siempre me da una buena razón para sonreír.

Jonathan José Acosta Bayona

AGRADECIMIENTOS

El autor del trabajo expresa sus más grandes agradecimientos a:

Doctor Neftalí Ochoa Alejo, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por la confianza depositada en mi, orientación, apoyo y sobre todo por ser un ejemplo a seguir con un gran sentido humano.

M. en C. Brisia Alejandra Aguilar Barragán, por su paciencia, importante dirección, valiosa asesoría y por compartir su conocimiento, el cual fue una clave fundamental para la realización de este proyecto.

A Estephany Tondopo, Esperanza y Edith, por su gran contribución de equipos y colaboración en la ejecución de los análisis del proyecto.

Mis compañeros, Silvia, Roberto, Martin, Monserrate, Teresa, Anthony y Miguel por su valiosa compañía, y su buena disposición en todo el tiempo de su estancia en el laboratorio.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	14
1. EL PROBLEMA	16
1.1. TITULO	16
1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
1.3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	17
1.4. JUSTIFICACIÓN	17
1.5. OBJETIVOS	18
1.5.1. Objetivo general.	18
1.5.2. Objetivos específicos.	18
1.6. ALCANCES Y LIMITACIONES	18
1.6.1. Alcances.	18
1.6.2. Limitaciones.	19
1.7. DELIMITACIONES	19
1.7.1. Delimitación espacial.	19
1.7.2. Delimitación temporal.	20
1.7.3. Delimitación conceptual.	20
2. MARCO REFERENCIAL	21
2.1. ANTECEDENTES	21
2.2. MARCO TEORICO	23
2.2.1. Importancia del chile.	23
2.2.2. Carotenoides: Definición, estructura e importancia.	27
2.2.3. Biosíntesis de carotenoides en células vegetales.	28
2.2.4. Biosíntesis de carotenoides en plantas de chile (<i>Capsicum</i> spp.).	34
2.2.5. Silenciamiento génico inducido por ARN interferencia.	35
2.3. MARCO CONCEPTUAL	37
2.3.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	37
2.3.2. Agroinfiltración.	38

2.3.3. <i>Capsicum eximium</i> accesión 1546.	38
2.3.4. Espectrofotometría visible-ultravioleta.	39
2.3.5. Electroporación	39
2.3.6. Expresión de proteínas.	39
2.3.7. PCR.	40
2.3.8. Virus del cascabeleo del tabaco (TRV).	41
2.3.9. Silenciamiento génico inducido por virus (VIGS).	42
2.3.10. Clonación.	42
2.3.11. Recombinación.	43
2.3.12. Dogma central de la biología molecular.	43
2.3.13. Enzimas de restricción.	43
2.3.14. Electroforesis.	44
2.4. MARCO CONTEXTUAL	44
2.5. MARCO LEGAL	45
3. METODOLOGÍA	46
3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN	46
3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA	46
3.2.1. Población.	46
3.2.2. Muestra.	47
3.3. HIPÓTESIS	47
3.4. VARIABLES	47
3.4.1. Dependientes.	47
3.4.2. Independientes.	47
3.5. FASES DE LA INVESTIGACIÓN	48
3.5.1. Muestras biológicas.	48
3.5.2. Diseño de oligonucleótidos de los genes <i>ipp</i> y <i>lcy</i>	48
3.5.3. Construcción de vectores de silenciamiento	49
3.5.4. Replicación de los vectores de silenciamiento e inoculación de las plántulas de chile.	57
3.5.5. Distribución del TRV en las plantas de chile agroinfectadas	57
3.5.6. Colecta de frutos.	59
3.5.7. Determinación del contenido de carotenoides totales en los frutos de chile.	59
3.5.8. Análisis de la expresión génica de la ruta de biosíntesis de carotenoides.	60

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS	63
4.1. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS DE LOS GENES <i>ipp</i> Y <i>lcy</i>	63
4.2. CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES DE SILENCIAMIENTO	64
4.3. DISTRIBUCIÓN DEL TRV2 EN LAS PLANTAS DE CHILE AGROINFECTADAS	67
4.4. COLECTA DE FRUTOS	68
4.5. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CAROTENOIDES TOTALES EN LOS FRUTOS DE CHILE COLECTADOS	72
4.6. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS GENES <i>IPP</i> Y <i>LCY</i> IMPLICADOS EN LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES	75
CONCLUSIONES	78
RECOMENDACIONES	80
BIBLIOGRAFÍA	81
ANEXOS	86