

	GESTIÓN DE SERVICIOS ACADÉMICOS Y BIBLIOTECARIOS	CÓDIGO	FO-GS-15
		VERSIÓN	02
	ESQUEMA HOJA DE RESUMEN	FECHA	03/04/2017
		PÁGINA	1 de 1
Elaboró		Revisó	
Equipo Operativo del Proceso		Comité de Calidad	
		Aprobó	
		Comité de Calidad	

RESUMEN TRABAJO DE GRADO

AUTOR

NOMBRES: ANGIE GABRIELLA APELLIDOS: ZAMBRANO PEREIRA

FACULTAD: CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERIA BIOTECNOLOGICA

DIRECTOR:

NOMBRES: NEFTALÍ **APELLIDOS:** OCHOA ALEJO

TÍTULO DEL TRABAJO (TESIS): CONSTRUCCIÓN Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL GEN DE LA FITOENO SINTASA (*PSY*) Y DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN *WRKY80* Y *NAC50* EN *Capsicum annuum*.

RESUMEN

La ruta de biosíntesis de carotenoides está finamente ligada a procesos de desarrollo y adaptación al ambiente en las plantas, y en el caso de los frutos de chile a los cambios graduales de color de amarillo, anaranjado y rojo. *PSY* es un gen estructural que codifica a la fitoeno sintasa que participa al inicio de dicha ruta. Los patrones de expresión de los factores de transcripción (FT) *NAC50* y *WRK80* correlacionan positivamente con la del gen de *PSY* del transcriptoma *in silico* y es posible que participen en la regulación transcripcional de la biosíntesis de los carotenoides en los frutos de chile. En el presente trabajo se generaron las construcciones de la región promotora del gen *PSY* en el vector pAbAi del sistema de un híbrido en levadura (Y1H), y las secuencias codificantes de los genes de los FT *NAC50* y *WRKY80* se clonaron en el vector de expresión pGADT7 con la finalidad de realizar experimentalmente el análisis de interacción entre DNA-proteína (promotor del gen *PSY* y los factores de transcripción *NAC50* y *WRKY80*), aplicando la técnica de Y1H, ya que en un futuro se quiere conocer si estos FT están regulando transcripcionalmente al gen *PSY* y, con ello, la vía de biosíntesis de los carotenoides en los frutos de chile. Por otro lado, con la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) cuantitativo, se determinaron los patrones de expresión de los genes de interés (*PSY*, *NAC50* y *WRKY80*) midiendo el perfil de patrón de expresión de los genes mencionados en una cinética del desarrollo del fruto del chile, desde la etapa de floración hasta su maduración. Confirmando la alta asociación de los genes al desarrollo del fruto y presentando una correlación positiva entre ello.

PALABRAS CLAVES: *Capsicum annuum*, Carotenoides, Fitoeno Sintasa (*PSY*), Factor de transcripción (FT).

CARACTERÍSTICAS:

PÁGINAS: 80 **PLANOS:** **ILUSTRACIONES:** **CD ROOM:** 1

CONSTRUCCIÓN Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL GEN DE LA FITOENO SINTASA
(*PSY*) Y DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN *WRKY80* Y *NAC50* EN *Capsicum*
annuum

ANGIE GABRIELLA ZAMBRANO PEREIRA

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA
SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2020

CONSTRUCCIÓN Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL GEN DE LA FITOENO SINTASA
(*PSY*) Y DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN *WRKY80* Y *NAC50* EN *Capsicum*
annuum.

Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de
Ingeniero Biotecnológico

Director

Dr. Nefalí Ochoa Alejo

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA
SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2020

ACTA DE SUSTENTACION DE UN TRABAJO DE GRADO

FECHA: 20 OCTUBRE DE 2020

HORA: 04:00 P.M.

LUGAR: CUCUTA, NORTE DE SANTANDER – EVALUACION VIRTUAL

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA

TITULO: “CONSTRUCCIÓN Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL GEN DE LA FITOENO SINTASA (PSY) Y DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN WRKY80 Y NAC50 EN *Capsicum annuum*.”

MODALIDAD: INVESTIGACION

JURADO: GERMAN LUCIANO LÓPEZ BARRERA
NELSON ALFONSO VEGA CONTRERAS
YANETH AMPARO MUÑOZ PEÑALOZA

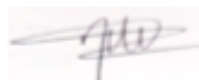
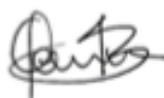
ENTIDAD: CINVESTAV - – UNIDAD IRAPUATO – MEXICO

DIRECTOR: NEFTALÍ OCHOA ALEJO

NOMBRE DE LOS ESTUDIANTE	CODIGO	CALIFICACION
Angie Gabriella Zambrano Pereira	1611030	4.6

OBSERVACIONES: MERITORIA.

FIRMA DE LOS JURADOS



German Luciano López Barrera Nelson Alfonso Vega Contreras Yaneth Amparo Muñoz Peñaloza

Vo. Bo Coordinador Comité Curricular _____



Esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y Manipulación Genética de Plantas del Departamento de Ingeniería Genética de Plantas del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional – México, Unidad Irapuato, bajo la asesoría del Dr. Nefthalí Ochoa Alejo.

DEDICATORIA

A MI FAMILIA:

Mis padres Maribel Pereira Laguado y Juan Carlos Zambrano Porto, por brindarme todo su amor, amistad y apoyo incondicional. Gracias por creer en mi e inculcarme todos los valores para ser mejor persona.

Mis hermanos Andrés, Alessandro, Fabrizio y Mateo, por brindarme su amistad y cariño.

Gracias por llegar a mi vida y hacer que mis días sean más felices.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Francisco de Paula Santander, Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente por aceptar y permitir realizar mi trabajo de grado fuera del País.

Al Cinvestav-Unidad Irapuato por proveer las instalaciones y el apoyo otorgado durante el desarrollo de mi trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt; México) por el apoyo financiero para la parte experimental a través de los proyectos de Fronteras de la Ciencia 1570, y de Ciencia Básica 280755.

Al Dr. Neftalí Ochoa Alejo por aceptarme como alumna en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y Manipulación Genética de Plantas del Departamento de Ingeniería Genética del Cinvestav-Unidad Irapuato, y por su asesoramiento a lo largo de este trabajo. Gracias.

Al Laboratorio de Biología Computacional Cinvestav UGA-Langebio dirigido por el Dr. Octavio Martínez de la Vega, por permitirme usar el equipo para el análisis de PCR cuantitativo en tiempo real.

A la Dra. Magda Lisette Arce Rodríguez por ser parte de mi formación, por todo sus cor y lecciones.

A la Dra. María Guadalupe Villa Rivera, un agradecimiento especial, por su asesoría y valiosas recomendaciones en las diferentes etapas del desarrollo del proyecto. También por su amistad. Muchas gracias.

A mis compañeros de laboratorio, Alejandra, Daniela y Fernando, por brindarme su amistad, apoyo y conocimientos.

A María Fernanda Peñaranda Bejarano, por su amistad y compañía incondicional durante todo el periodo de estancia en México.

A Jonathan José Acosta Bayona, por brindarme su apoyo, consejos, cariño y hacer más llevadera mi estancia en México.

A todos los amigos que hice, por todo el tiempo que estuve viviendo en México y hacerme sentir más cómoda.

RESUMEN

La ruta de biosíntesis de carotenoides está finamente ligada a procesos de desarrollo y adaptación al ambiente en las plantas, y en el caso de los frutos de Chile a los cambios graduales de color de amarillo, anaranjado y rojo. *PSY* es un gen estructural que codifica a la fitoeno sintasa que participa al inicio de dicha ruta. Los patrones de expresión de los factores de transcripción (FT) *NAC50* y *WRK80* correlacionan positivamente con la del gen de *PSY* del transcriptoma *in silico* y es posible que participen en la regulación transcripcional de la biosíntesis de los carotenoides en los frutos de Chile. En el presente trabajo se generaron las construcciones de la región promotora del gen *PSY* en el vector pAbAi del sistema de un híbrido en levadura (Y1H), y las secuencias codificantes de los genes de los FT *NAC50* y *WRKY80* se clonaron en el vector de expresión pGADT7 con la finalidad de realizar experimentalmente el análisis de interacción entre DNA-proteína (promotor del gen *PSY* y los factores de transcripción *NAC50* y *WRKY80*), aplicando la técnica de Y1H, ya que en un futuro se quiere conocer si estos FT están regulando transcripcionalmente al gen *PSY* y, con ello, la vía de biosíntesis de los carotenoides en los frutos de Chile. Por otro lado, con la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) cuantitativo, se determinaron los patrones de expresión de los genes de interés (*PSY*, *NAC50* y *WRKY80*) midiendo el perfil de patrón de expresión de los genes mencionados en una cinética del desarrollo del fruto del Chile, desde la etapa de floración hasta su maduración. Confirmando la alta asociación de los genes al desarrollo del fruto y presentando una correlación positiva entre ellos.

Tabla de contenido

Introducción	18
1. Problema	20
1.1. Título	20
1.2. Planteamiento del problema	20
1.3. Formulación del problema	22
1.4. Justificación	23
1.5. Objetivos	24
1.5.1. Objetivo General	24
1.5.2. Objetivos Específicos	24
1.6. Delimitación	25
1.6.1 Espacial	25
1.6.2 Temporal	25
1.6.3 Conceptual	25
2. Antecedentes	26
2.1.1. El chile (<i>Capsicum</i> spp.)	26
2.1.2. Carotenoides	28
2.1.3. Carotenoides en <i>Capsicum</i>	29
2.1.4. Biosíntesis de carotenoides	31
2.1.5 Factores de transcripción	
2.1.6. Familia de FT <i>WRKY</i>	36
2.1.7. Familia de FT <i>NAC</i>	37
3. Diseño metodológico	39

3.1 Tipo de investigación	39
3.2 Población y muestra	39
3.2.1. Población	39
3.2.2. Muestra	39
3.3 Hipótesis	40
3.4 Fases de la investigación	41
Fase i: Construcciones de los genes de trabajo: <i>wrky80</i> , <i>nac50</i> y <i>psy</i>	41
3.4.1. Material vegetal	41
3.4.2. Extracción de RNA total	41
3.4.3. Síntesis de cDNA con la Super Script II transcriptasa reversa	42
3.4.4. Construcciones de los genes de los FT <i>WRKY80</i> y <i>NAC50</i> en el vector pGADT7	42
3.4.5. Construcción de la región promotora del gen <i>PSY</i> en el vector pAbAi.	46
3.4.5.1 Amplificación de la región promotora del gen <i>PSY</i>	46
3.4.5.2 Clonación de pCR 4-TOPO – <i>PSY</i> e in silico en el plásmido <i>pAbAi-PSY</i>	47
Fase ii: Patrón de expresión del gen <i>psy</i> y del ft <i>wrky80</i> .	49
3.4.6. Análisis de expresión por PCR cuantitativo en tiempo real	49
3.4.6.1 Tratamiento con DNasa I	50
3.4.6.2 Síntesis de cDNA con transcriptasa reversa SuperScript™ III	50
3.4.6.3 PCR cuantitativo	50
4. Resultados y análisis	52
Fase i: Construcción de los genes de trabajo: <i>WRKY80</i> , <i>NAC50</i> y <i>PSY</i>	52
4.1. Construcción del vector <i>pGADT7-WRKY80</i>	52
4.2. Construcción del vector <i>pGADT7-NAC50</i>	
4.3. Construcción del vector <i>pAbAi-PSY</i>	56
Fase ii: patrón de expresión del gen <i>PSY</i> y de los genes de los FT <i>WRKY80</i> y <i>NAC50</i> en frutos de chile a los 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 DPA	60

Conclusiones	64
Recomendaciones	65
Bibliografía	66