

**POSGRADO EN CIENCIAS Y
BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS**

**Estudio de la expresión génica diferencial
durante el desarrollo *in vitro* de plántulas de
Capsicum chinense Jacq. en presencia de
etileno**

Tesis que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias presenta

IBQ. Eunice Gómez Uc

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN,
A.C.**

Mérida, Yucatán, México
2010





**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE
YUCATÁN A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado: "Estudio de la expresión génica diferencial durante el desarrollo *in vitro* de plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. en presencia de etileno", fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Nancy Santana Buzzy y el Dr. José Juan Zúñiga Aguilar, dentro de la Opción Biología Experimental, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias y Biotecnología de Plantas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Oscar Alberto Moreno Valenzuela

Director Académico

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento provienen de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en los laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán y que dicha información le pertenece en términos de la ley de propiedad industrial, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.

Atentamente



I.B.Q. Eunice Gómez Uc

CONTENIDO

	Pág.	
AGRADECIMIENTOS	I	
DEDICATORIA	II	
LISTA DE CUADROS	III	
LISTA DE FIGURAS	V	
LISTA DE ABREVIATURAS	VII	
RESUMEN	IX	
ABSTRACT	XI	
INTRODUCCIÓN	1	
BIBLIOGRAFÍA	3	
CAPÍTULO I Antecedentes	5	
1.1	EL CHILE HABANERO	5
1.1.1	Origen, clasificación taxonómica y características botánicas	6
1.2	EL CULTIVO DE TEJIDOS	7
1.2.1	Regeneración de plantas <i>in vitro</i>	7
1.2.2	Organogénesis	8
1.2.3	Utilización de las técnicas de cultivo de tejidos en plantas	8
1.2.4	Reguladores de crecimiento vegetal	10
1.2.5	El Etileno	10
1.2.5.1	Biosíntesis	11
1.2.5.2	Modo de acción	12
1.2.5.3	Inhibidores de los efectos del Etileno	13
1.3	TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES	15
1.3.1	Los receptores de etileno	15
1.3.2	Genes relacionados con el etileno	16
1.3.3	Regulación de la expresión génica	17
1.3.4	Identificación de la expresión génica diferencial	17
1.3.5	Análisis de la expresión génica diferencial	18
1.4	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	20
1.4.1	Hipótesis	20
1.4.2	Objetivo general	20
1.4.3	Objetivos particulares	20
1.5	BIBLIOGRAFÍA	21

CAPÍTULO II	 Materiales y métodos	25
2.1	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	25
2.2	GENERALIDADES	25
2.2.1	Material Vegetal	25
2.3	EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LAS PLÁNTULAS DE CHILE HABANERO EN DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVO	26
2.4	CUANTIFICACIÓN DE ETILENO	27
2.5	ANÁLISIS MOLECULARES	29
2.5.1	Extracción del ARN	29
2.5.1.1	Cuantificación y comprobación de la integridad del ARN total	30
2.5.2	Síntesis de ADNc: Transcripción reversa del ARN	30
2.5.2.1	Amplificación de las cadenas de ADNc	31
2.5.3	Fraccionamiento de las muestras de ADNc por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida	32
2.5.3.1	Tinción del gel de poliacrilamida	32
2.5.3.2	Análisis y reamplificación por PCR de las bandas diferenciales	33
2.5.4	Ligación de los fragmentos, transformación de bacterias y clonación	33
2.5.4.1	Verificación de la presencia del inserto	35
2.5.4.1	Cuantificación de los plásmidos y análisis de las secuencias	35
2.5.5	Verificación de la expresión diferencial	35
2.6	BIBLIOGRAFÍA	36

CAPÍTULO III Resultados y Discusión	37
3.1 ACUMULACIÓN DEL ETILENO EN RSV Y RCV DURANTE EL DESARROLLO DE LAS PLÁNTULAS DE CHILE HABANERO <i>IN VITRO</i>	37
3.2 COMPORTAMIENTO DE LAS PLÁNTULAS DURANTE SU DESARROLLO EN RSV Y RCV	37
3.3 EFECTO DEL NITRATO DE PLATA (AgNO_3) Y EL CLORURO DE COBALTO (CoCl_2) SOBRE LA RESPUESTA DE LAS PLANTAS DE CHILE HABANERO EN RECIPIENTES SIN VENTILACIÓN	41
3.4 ANÁLISIS MOLECULARES	44
3.4.1 Extracción de ARN de tejido foliar de <i>Capsicum chinense</i>	44
3.4.2 Amplificación de los ADN complementarios	45
3.4.3 Fraccionamiento de los productos en geles de poliacrilamida al 6%	47
3.4.4 Aislamiento del ADN plasmídico	50
3.4.5 Corroboración de la presencia de insertos en los plásmidos recombinantes	51
3.4.6 Resultados de la secuenciación	52
3.5 BIBLIOGRAFÍA	60
CAPÍTULO IV Análisis de Resultados	61
CAPÍTULO V Conclusiones	63
BIBLIOGRAFÍA	64
ANEXOS	71

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación Científica de Yucatán en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, bajo la dirección de la Dra. Nancy Santana Buzzy y el Dr. José Juan Zúñiga Aguilar.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar los estudios de doctorado (No. de becario: 177010).

A los miembros de mi comité tutorial y revisores de tesis: Dra. Nancy Santana Buzzy, Dra. Lourdes Georgina Iglesias Andreu, Dra. Sara Luz Nahuat Dzib, Dr. José Juan Zúñiga Aguilar, Dr. Manuel Martínez Estévez, Dr. Luis Alfonso Sáenz Carbonell y Dr. Javier Orlando Mijangos Cortés, por el tiempo dedicado a la revisión de éste trabajo.

Este trabajo fue financiado a través del proyecto: "Selección de genotipos de chile Habanero con mayor tolerancia a plagas y enfermedades que afectan al cultivo en la región, dentro de una colecta de especies conservadas en el CICY" (II Parte-clave 5605) por la Fundación Produce Yucatán y por el Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos (SINAREFI, clave: 185).

A Dios por ser mi apoyo en todo tiempo, por su ayuda y disciplina.

A mis padres Ernesto y Celia, y a mis hermanos Esther y Ernesto por su amor, comprensión, apoyo y consejos, asimismo a mi cuñada Nelly y a mi querido sobrino Ernesto.

A Ariel por ser además de mi novio, un verdadero amigo, quien siempre me apoyó y me impulsó a alcanzar metas que parecían imposibles y a su familia por considerarme como una integrante mas.

A mi grupo de trabajo actual: Susana, Emily, Stephanie, Daniela, Jericó, Carlos Regla, Carlos Lecona y Raúl, los técnicos del laboratorio: M. en C. Adriana Canto Flick y M. en C. Eduardo Balam Uc y a los que estuvieron aquí: Lisette, Lupita, Maricarmen, por su amistad, consejos, apoyo y colaboración.

A mis amigos y compañeros Goretty, Nancy, Rosalía, Reyna Collí...

Y por último, a todas aquellas personas que invirtieron un poco de su tiempo para que este trabajo se llevara a cabo.

DEDICATORIA

A Dios y a mi familia por su amor y su apoyo

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1.1	Genes relacionados con el Etileno	16
1.2	Comparación de técnicas utilizadas en el análisis de la expresión de genes	19
2.1	Cebadores para el despliegue diferencial	31
2.2	Condiciones de amplificación de las cadenas de ADNc	31
3.1	Comportamiento de la altura y el No. de hojas formadas en plántulas cultivados en RSV y RCV	39
3.2	Alineamiento de la secuencia 6.1 E con secuencias similares	57

LISTA DE FIGURAS

Fig.		Pág.
1.1	Diversidad de colores del fruto de chile Habanero (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.)	5
1.2	Comportamiento anormal de las plantas de Chile Habanero (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.).	9
1.3	Biosíntesis del Etileno	11
1.4	Efectos del Etileno	13
2.1	Estrategia experimental	25
2.2	Condiciones de cultivo	27
2.3	Curva de calibración de Etileno: RSV y RCV	28
2.4	Sitio múltiple de clonación del Vector pGEM-T Easy	34
2.5	Mapa del plásmido pGEM-T-Easy	34
3.1	Producción de Etileno en RSV y RCV	37
3.2	Morfología de las plántulas de chile Habanero cultivadas <i>in vitro</i> en recipientes sin ventilación (RSV)	38
3.3	Plántulas de chile Habanero durante el cultivo <i>in vitro</i> .	39
3.4	Desarrollo contrastante de las plántulas de chile Habanero.	40
3.5	Dendrograma del análisis de conglomerado	41
3.6	Comportamiento del contenido de etileno	42
3.7	Planta de <i>Capsicum chinense</i> cultivadas en presencia de inhibidores	43
3.8	ARN de chile Habanero a partir de tejido foliar	44
3.9	Síntesis del ADNc	45
3.10	Productos del Despliegue diferencial obtenidos con diferentes combinaciones de cebadores	46
3.11	Fraccionamiento de las poblaciones de ADN complementarios	48

3.12	Reamplificación de bandas “diferenciales”	49
3.13	Transformación bacteriana con los plásmidos recombinantes	50
3.14	Aislamiento de plásmidos recombinantes	51
3.15	Liberación de insertos	52
3.16	Alineamiento de la secuencia de aminoácidos (aa) de la clona 10.1 E	54
3.17	Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la clona 8.1 E	55
3.18	Análisis de la secuencia deducida de aa de la clona 6.1 E	56
3.19	Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la clona 6.1E	57

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AFLP	Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados
amp	ampicilina
ARN	Ácido Ribonucleico
ATP	adenosín trifosfato o trifosfato de adenosina
BrEt	bromuro de etidio
CTV	cultivo de tejidos vegetales
DD	Despliegue Diferencial
DEPC	Dietilpirocarbonato
GA ₃	Ácido giberélico
JaMe	Jasmonato de Metilo
LD-PCR	PCR de larga distancia
MS	Medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PR	Relacionados con Patogenicidad
RAD	Análisis representativo de diferencias
RCV	Recipiente con ventilación
RFLP	Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RSV	Recipiente sin ventilación
SA	Sobrenadante
SAGE	Análisis serial de la expresión génica
SSH	Hibridización substractiva por supresión
TA	Temperatura Ambiente
TDZ	Tidiazurón
TFs	Factores generales de transcripción
uS	Unidades Scoville

RESUMEN

Este trabajo describe el análisis del desarrollo de plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq. cv. RPS-04) bajo diferentes condiciones de cultivo en medio semisólido. El objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto de la ventilación de los contenedores durante el proceso del cultivo *in vitro*. Específicamente, se propuso que la ausencia de ventilación podría conducir a la acumulación de etileno en la micro-atmósfera del recipiente y que esto podría afectar negativamente el desarrollo de los cultivos y modificar los patrones de expresión génica.

Los resultados mostraron que efectivamente hubo una acumulación de etileno cuando los tejidos fueron cultivados *in vitro* en contenedores no ventilados, lo cual afectó diferentes aspectos del desarrollo como el crecimiento, el número de hojas, el tamaño, etc.

Los estudios de la expresión génica bajo diferentes condiciones de estrés abiótico son importantes porque constituyen una estrategia útil para el entendimiento, a nivel molecular, de cómo las plantas adecúan su fisiología ante condiciones adversas del ambiente. Los resultados de esta parte mostraron que, tal como se propuso, la acción de ventilar o no los contenedores modificó diferencialmente la expresión génica en los cultivos, afectando una serie de genes con diversas funciones en el metabolismo. No obstante, no se encontró similitud en bases de datos para algunas clonas de ADNC, por lo que se desconoce su identidad. A este respecto, la correlación que existió entre la expresión de estos genes "desconocidos" con la ventilación de los recipientes, con la acumulación de etileno y con diversas afectaciones en el desarrollo de las plántulas cultivadas *in vitro*, constituye los primeros aportes para el entendimiento de sus funciones.

ABSTRACT

In this work we analyzed the development of habanero pepper plantlets (*Capsicum chinense* Jacq., c.v. RPS-04) under different culture conditions in semi-solid medium. The main goal was to analyze the effect of the ventilation of the recipient during the *in vitro* culture process. Specifically, it was proposed that absence of ventilation could conduce to the accumulation of ethylene in the recipient's micro-atmosphere, which in turn could affect negatively the developmental of the culture and modify the gene expression patterns.

The results showed that there was an accumulation of ethylene when the tissues were cultured *in vitro* without ventilation, which coincided with the affectation of several aspects of the development, like the growth, the number of leaves, the size, etc.

The analysis of gene expression under abiotic stress conditions are important because they constitute a useful strategy to understand, at the molecular level, how the plants adequate their physiology to adverse conditions of the environment. The results of this part showed that, as it was proposed, ventilation of the containers modified differentially the gene expression of the plant cultures, affecting several genes with different metabolic functions. However, there were no sequence similarities in data bases for some cDNA clones, and then they remained unidentified. In this regard, the correlation that exists between these "unknown" genes and the recipient ventilation, accumulation of ethylene and with diverse affectations in the development of the plants cultivated *in vitro* constitute the first contributions to the understanding of their functions.

INTRODUCCIÓN

El género *Capsicum*, perteneciente a la familia de las Solanáceas, incluye alrededor de 25 especies. Su centro de origen se localiza en las regiones tropicales y subtropicales de América, probablemente en el área comprendida entre Bolivia y Perú, donde se han encontrado semillas de formas ancestrales, que datan de más de 7000 años, y desde donde se presume, se diseminó al resto del continente americano (Pickersgill, 1989). Al menos, cinco de sus especies de *Capsicum* son las más cultivadas en diferentes regiones: *Capsicum chinense* Jacq., cuyo cultivar es conocido como "chile Habanero" y produce el ají más picante que se conoce; *Capsicum frutescens*, cuyo o cultivar "Tabasco" es ampliamente utilizado para la elaboración de salsa picante; *Capsicum baccatum*, cuyo producto es conocido como ají andino, es cultivado en las zonas del altiplano; y *Capsicum pubescens*, cuyo cultivar "Rocoto" (Manzano o Siete Caldos), es muy apreciado por su sabor y su pungencia (picor) en algunas regiones de América (Pozo-Campodónico *et al.*, 1991).

Aunque el chile Habanero (*C. chinense*) es originario de Sudamérica, en México es muy conocido, y es mayormente cultivado, en las regiones de Yucatán, Quintana Roo, Campeche y Tabasco. Es una planta autógama y su fruto se caracteriza por su elevada pungencia, propiedad que los hace muy codiciados en muchas regiones del mundo. Esta sensación al paladar se la confiere su contenido de capsaicina.

Las técnicas biotecnológicas han sido ampliamente utilizadas en el género *Capsicum* para inducir la regeneración de plantas *in vitro* por diferentes vías morfogénicas (Agrawal & Chandra, 1983; Ochoa & Ireta, 1990; Arroyo & Revilla, 1991; Szasz *et al.*, 1995; Binzel *et al.*, 1996; Buyukalaca *et al.*, 1999; Husain *et al.*, 1999), sin embargo, todos los reportados coinciden en la baja eficiencia y reproducibilidad de protocolos, clasificando el género dentro de las especies vegetales recalcitrantes a la morfogénesis *in vitro*.

La regeneración de chile Habanero *in vitro* fue reportada por primera vez por Santana-Buzzy *et al.* (2005) utilizando nudos asépticos de plántulas de 25-30 días de edad para la inducción de brotes múltiples. En este estudio se reportó el comportamiento anormal de los explantes y los brotes cultivados en recipientes sin ventilación. Poco tiempo después, estos mismos autores (Santana-Buzzy *et al.*, 2006), demostraron que el etileno concentrado en el interior del recipiente era el agente responsable de las anomalías observadas en los explantes y brotes de chile Habanero cultivados en recipientes sin ventilación, durante su cultivo *in vitro*. La máxima concentración de esta hormona ocurrió a los 24 días de cultivo ($0.12 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$), mostrando una alta sensibilidad de los explantes a este gas, con efectos dramáticamente negativos sobre los brotes y sobre su desarrollo en plantas,

efectos que desaparecen al mejorar el intercambio gaseoso de los recipientes de cultivo.

La producción de etileno está asociada con una baja regeneración o con un comportamiento recalcitrante del material de cultivo (Chi & Pua, 2005) Dentro del género *Capsicum* se observó un fenómeno en algunos brotes de *Capsicum annuum* que crecieron 2 cm o más, fue la abscisión foliar, la cual les impedía sobrevivir en condiciones en invernadero. El etileno ha sido relacionado con la abscisión, autores como Beyer, 1976; Reid, 1990; Salisbury & Ross, 1994, mencionan que la simple presencia de este gas causa fenómenos como éste, por lo que se ha empleado inhibidores como el ión Ag^+ que puede interferir con su incorporación a los sitios receptores (Beyer, 1979), efecto que se ha observado en otros cultivos *in vitro* como maíz (*Zea mays*), *Nicotiana plumbaginifolia*, trigo (*Triticum aestivum*) y casava (*Manihot esculenta*) (Purnhauser *et al.*, 1987; Vain *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 2001), indicando que después de agregar $AgNO_3$ al medio de crecimiento, se evitó por completo la abscisión foliar, lo que permite suponer que efectivamente el etileno está involucrado en la pérdida de las hojas de las plantas regeneradas.

Se ha reportado el empleo del método de despliegue diferencial de genes para estudios de expresión en diferentes modelos para estudiar la respuesta de las plantas cultivadas bajo condiciones de estrés. El ataque de patógenos, la presencia de moléculas químicas como Jasmonato de Metilo (JaMe), Etileno y el ácido salicílico, estos son algunos de los ejemplos en los que el despliegue diferencial (DD) ha sido utilizado con la finalidad de identificar genes que se inducen o se reprimen durante esta interacción; además, permite visualizar qué genes se sobreexpresan y cuáles no sufren cambio en sus niveles de expresión.

En este estudio nos proponemos utilizar la técnica del despliegue diferencial de genes, para caracterizar molecularmente el fenómeno que se presenta durante el cultivo *in vitro* de esta especie en presencia de etileno y determinar si existen genes que se expresan diferencialmente bajo éstas condiciones de cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal, S. and Chandra, N. (1983). Differentiation of multiple shoot buds and plantlets in cultured embryos of *Capsicum annuum* L. var. Mathania. *Current Science*, 52:645-646.
- Arroyo, R. and Revilla, M. A. (1991). *In vitro* plant regeneration from cotyledon and hypocotyl segments in two bell pepper cultivars. *Plant Cell Report*, 10:414-416.
- Beyer, E. M., (1976). A potent inhibitor of ethylene action in plants. *Plant Physiology*. 58:268-271.
- Binzel, M. L., Sankhla, N., Joshi, S. and Sankhla, D. (1996)a. Introduction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Report*, 15:535-540.
- Binzel, M. L., Sankhla, N., Joshi, S. and Sankhla, D. (1996)a. Introduction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Rep.* 15:535-540.
- Buyukalaca, S. and F. Mavituna (1996). Somatic embryogenesis and plant regenerations of pepper in liquid media. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 46:227-235.
- Chi, G. L., and E-C. Pua. (1989). Ethylene inhibitors enhanced de novo shoot regeneration from cotyledons of *Brassica campestris* ssp. Chinensis (Chinese cabbage) *in vitro*. *Plant. Sci.* 64: 243-250.
- Husain, S., Jain, A. and Kothari, S. L. (1999). Phenylacetic acid improves bud elongation and *in vitro* plant regeneration efficiency in *Capsicum annuum*. *Plant Cell Report* 19:64-68.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473-497.
- Nakata, K. (1984). Production of mutant plants displaying traits which have herbicide resistance, disease resistance, resistance to stress conditions and improved quality factors and biotechnology. *J. Pestic. Sci.* 9: 355-364.
- Ochoa-Alejo, N. and Ireta-Moreno, L. (1990). Cultivar differences in shoot-forming capacity of hypocotyl tissues of chili pepper (*Capsicum annuum* L.) cultured *in vitro*. *Sci. Hort.* 42:21-28.
- Pickersgill, B. (1989). "Genetic resources of *Capsicum* for tropical regions", in *Tomato and Pepper production in the tropics*, Tainan, Taiwan. Asian Vegetable Research and Development Center, pp. 2-8.
- Pozo-Campodónico, O. and Montes-Hernández S. and Redondo-Juárez, E. (1991). "chile (*Capsicum* spp.)", en R, Ortega, G. Palomino, F. Castillo, V. Gonzáles y M. Livera (eds.). *Avances en el estudio de los recursos filogenéticos de México*. Sociedad Mexicana de fitogenética A.C., México, pp. 217-238.

- Purnhauser, L., Medgyesy, M. and Czeko, P. J. (1987). Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. tissue culture using the ethylene inhibitor AgNO₃. Plant Cell Rep. 6:1-4.
- Reid, M. S. (1990). The functioning of hormones in plant growth and development: In Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development. P. J. Davies (ed). Kluwer Academia Publishers. Netherlands. pp: 257-279.
- Salisbury, F. B. and Ross, C. W. (1994). Fisiología Vegetal. V. González Velázquez (trad). Grupo Editorial Iberoamérica. México, D. F. 759 p.
- Santana-Buzzy *et al.*, (2005). Regeneration of Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) Via Organogenesis. HortScience 40 (6): 1829-1831.
- Santana-Buzzy *et al.*, (2006). Improvement of *In vitro* Culturing of Habanero Pepper by Inhibition of Ethylene Effects. HortScience 41(2): 405-409.
- Szasz, A., Nervo, G. and Fari, M. (1995). Screening for *in vitro* shoot-forming capacity of seedling explants in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes and efficient plant regeneration using thidiazuron. Plant Cell Report 14: 666-669.
- Vain, P. *et al.*, (1989). Role of ethylene in Embryogenic Callu Initiation and Regeneration in *Zea mays* L. J. Plant Physiol. Vol. 135 pp. 537-540.
- Zagorska, N., Atanassov, A., Boyadjiev, P. and Djilianov, D. (1995). *In vitro* production of haploid plants. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 11: 400-408.
- Zhang, J. S., Xie, C., Shen, Y. G. *et al.*, (2001). A two-component gene (*NTHK1*) encoding a putative ethylene receptor homolog is both developmentally and stress regulated in tobacco, Theor. Appl. Genet., 102: 815-824.

CAPÍTULO I

Antecedentes

1.1 EL CHILE HABANERO

Las especies hortícolas de mayor importancia que se cultivan en Yucatán, se agrupan taxonómicamente en dos familias botánicas: Solanaceae y Cucurbitaceae, las cuales proporcionan una gama de frutos comestibles, que se consumen principalmente en fresco, aunque algunos también pueden industrializarse.

Dentro de la familia de las Solanaceae se encuentran como principales cultivos el tomate y el chile. Siendo este último de gran importancia para el estado de Yucatán, por su gran demanda para la condimentación de los platillos regionales. En la siguiente figura se muestra la variedad de colores de fruto en esta especie.



Figura 1.1. *Diversidad de colores del fruto de chile Habanero (Capsicum chinense Jacq.)* Canto-Flick, A.

El chile Habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) es un cultivo de gran importancia económica para los productores de hortalizas del estado de Yucatán, ocupando el segundo lugar después del cultivo del tomate. La mayor superficie de cultivo se encuentra en la parte norte del estado y contribuye en más del 90% del volumen de producción estatal, que en su mayor parte se comercializa y se consume en fresco y sólo una pequeña parte se utiliza en la industria como materia prima para la elaboración de salsa picante.

Los chiles, originarios de los trópicos de América, se cultivan ampliamente para su uso como especias o verduras tanto en las zonas tropicales como en las templadas. Todos los tipos de chile, tales como el Tabasco y Cayene, el chile dulce o "bell" y los pimientos, se derivan de las ramas de las diversas especies del mismo género *Capsicum*.

La pungencia de los frutos de algunas de estas especies, como es el caso del chile Habanero, está dada por su contenido de capsaicina, alcaloide que se sintetiza en las células de la placenta.

El contenido nutricional del chile es alto, es fuente de vitaminas, particularmente de la C, y en los tipos pungentes secos, de vitamina A (Tún Dzul, 2001).

1.1.1 Origen, clasificación taxonómica y características botánicas

Se desconoce con exactitud el origen del chile Habanero (Laborde, 1982) indica que es probable que sea originario de América del Sur, de donde fue introducido a Cuba, aunque en la isla no se consume ni se siembra, de ahí se cree que fue traído a la Península de Yucatán. Esta hipótesis se refuerza al comprobar que el chile Habanero es el único chile que no tiene nombre maya (Soria-Fregoso, 2002).

El género *Capsicum*, al cual pertenecen todos los chiles cultivados, es originario de los trópicos de América. Las cinco especies domesticadas y sus parientes silvestres estuvieron confinadas en el continente americano en la época precolombina.

Los primeros exploradores españoles y portugueses, encontraron los frutos tan pungentes que lo introdujeron rápidamente a Europa y Asia. Se han encontrado remanentes arqueológicos que han permitido determinar que las especies de este género se domesticaron en diferentes partes de América, principalmente en México (7000 A.C.).

El centro de diversidad de las formas cultivadas de *C. annuum* L. incluye a México y Centroamérica; existen centros secundarios en el centro y sureste de Europa, en África, Asia y América latina. Se indica como centro de origen de *C. frutescens* L. y *C. chinense* Jacq. a Bolivia, Perú, sureste de Brasil, Los Andes y Colombia, aunque algunos tipos también se pueden encontrar en África y el sureste de Asia, ya que fueron introducidos por los portugueses en la época Colonial.

La mayoría de las especies se encuentran en las tierras bajas de los trópicos, aunque existen variedades adaptadas a condiciones de altitudes de hasta 2500 msnm, en Los Andes, desde Bolivia hasta Colombia, en

México y América Central, aunque dicha adaptación pudo ocurrir en la época postcolombina (Tún-Dzul, 2001).

La clasificación taxonómica para el cultivo del chile Habanero de acuerdo a lo citado por Tún en el 2001, se clasifica como Reino Vegetal, Subreino Embriophyta, División Angiosperma, Clase dicotiledónea, subclase Metachlamidea, Orden Tubiflorea, Familia Solanaceae, Género *Capsicum* y especie *Capsicum chinense* Jacq.

1.2 EL CULTIVO DE TEJIDOS

La regeneración de plantas *in vitro*, es posible gracias a uno de los atributos más importantes de las células vegetales: la totipotencia celular, es decir que cada célula posee toda la información genética necesaria para constituir una planta completa o desempeñar las funciones de cualquier órgano o tejido vegetal. Sin embargo, en condiciones normales este potencial no se expresa, y se requieren condiciones extraordinarias como las que pueden derivarse del cultivo *in vitro* para que una célula exprese su potencial y pueda originar un órgano o una planta completa. Por otro lado, aún cuando en teoría cualquier célula viva que posea núcleo es totipotente, se ha visto que en la realidad no todos los tipos celulares son capaces de desencadenar el proceso de organogénesis y la probabilidad de que esto suceda decrece conforme se incrementa el grado de diferenciación de una célula (Pérez-Molphe-Balch *et al.*, 1999).

La capacidad de ciertos tejidos vegetales, como el callo, flores, raíces y embriones de crecer de manera más o menos indefinida, se ha utilizado durante muchas décadas en los laboratorios científicos como un instrumento de investigación por genetistas, botánicos y fitopatólogos.

A estos métodos se les ha llamado colectivamente cultivo de tejidos, una expresión que en ocasiones se usa como sinónimo de micropropagación. Los procedimientos de cultivo de tejidos utilizan un sistema de producción *in vitro* que requiere instalaciones de tipo laboratorio y técnicas asépticas similares a las empleadas para cultivar hongos, bacterias y otros microorganismos (Hartmann, *et al.*, 2001).

1.2.1 Regeneración de plantas *in vitro*

La regeneración de plantas *in vitro* puede ocurrir por diferentes vías: a) Alargamiento de ápices meristemáticos, b) producción de brotes en yemas axilares, c) inducción de brotes adventicios o brotes múltiples, d) organogénesis y e) embriogénesis (Hartmann *et al.*, 2001).

1.2.2 Organogénesis

El término organogénesis aplicado al cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se refiere a la formación de novo de órganos en los explantes cultivados. Entre los órganos que se pueden formar están las raíces o los llamados brotes adventicios, los cuales son estructuras muy similares a una yema y tienen la capacidad de originar una nueva planta después de elongarse y formar raíces. El fenómeno de la organogénesis *in vitro* se basa en la llamada totipotencialidad celular.

La organogénesis puede ser directa, cuando tiene lugar en el explante original, o bien indirecta cuando primeramente se origina tejido calloso (masa amorfa de células poco diferenciadas y de rápida proliferación) y luego se originan los órganos a partir de éste. Aún cuando la organogénesis *in vitro* es un proceso muy utilizado en la actualidad, incluso con fines comerciales para la propagación de plantas, es muy poco lo que se sabe acerca de los fenómenos fisiológicos, bioquímicos y genéticos que la hacen posible. De manera general, se sabe que bajo las condiciones adecuadas, ciertas células dentro de un explante comienzan a dividirse cambiando su estado de diferenciación y dando lugar a regiones llamadas meristemoides, que son las que posteriormente darán origen a una planta completa (Pérez-Molphe-Balch *et. al.*, 1999).

1.2.3 Utilización de las técnicas de cultivo de tejidos en plantas

El cultivo *in vitro* ha sido por años una herramienta utilizada para la conservación y propagación de especies importantes agronómica y forestalmente (hablando de especies en peligro de extinción o que tardan muchos años en reproducirse), por lo que actualmente sigue siendo de especial interés su uso. Entre las especies vegetales propagadas por CTV, se encuentran la zanahoria, papa, alfalfa, chile, etc.

Un fenómeno presente en algunas especies es la llamada recalcitrancia, en chile (*Capsicum* spp.), un producto agrícola de gran demanda. No obstante, existe el riesgo de una pérdida irreversible de este recurso genético a causa de fenómenos meteorológicos, la introducción de nuevos materiales, contaminación física y genética de la semilla, la falta de tecnologías adecuadas para conservarla, la recalcitrancia propia de la especie (Canto-Flick, 2005). El término recalcitrante (Del lat. *recalcitrans*, *-antis*), definido por el diccionario de la Real Academia Española como adj. Terco, reacio, reincidente, obstinado, aferrado a una opinión o conducta (<http://buscon.rae.es/draeI/>, lunes 15 de Enero 2007), en el cultivo *in vitro* es aplicado al tejido que no procede o desarrolla su característica de totipotencialidad de forma normal.

Algunos factores que contribuyen a la recalcitrancia, son la edad de la semilla, el cultivar, pero no se ha encontrado aun el componente genético que lo provoca. Por este motivo, es necesaria tanto su caracterización morfológica y molecular como su conservación en bancos de semillas, al igual que su mantenimiento, en la que una de las herramientas más ampliamente utilizadas es el cultivo *in vitro*. Sin embargo, existen problemas asociados al uso de esta técnica, Santana-Buzzy, *et al* (2006), reportaron la producción de etileno durante el cultivo *in vitro* de Chile Habanero en medio MS semisólido. En este estudio se observó que la máxima concentración de esta hormona ocurrió a los 24 días de cultivo ($0.12 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$), mostrando una alta sensibilidad de los explantes a este gas, con efectos dramáticamente negativos sobre los brotes y el desarrollo de las plantas de Chile Habanero *in vitro*, efectos que desaparecen al mejorar el intercambio gaseoso, manteniendo ventilados los recipientes de cultivo. En la siguiente figura se muestran algunos de los efectos que causa el etileno en el cultivo *in vitro* de *Capsicum chinense* Jacq., en recipientes no ventilados.

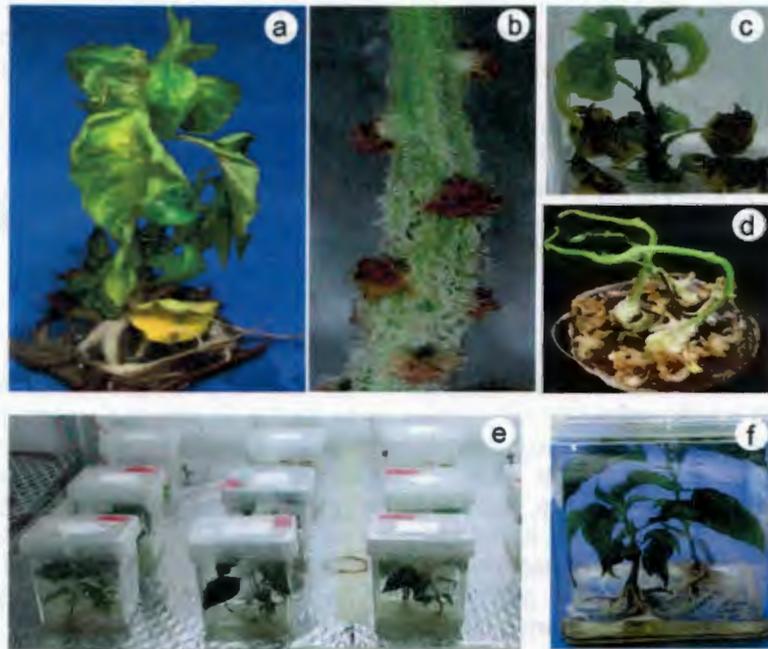


Figura 1.2. Comportamiento anormal de las plantas de Chile Habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Plantas de Habanero desarrolladas *in vitro* en recipientes sin ventilación (RSV) (a,b,c,d) y plantas normales desarrolladas en recipientes ventilados (RCV) (e,f) (Santana-Buzzy *et al.*, 2006).

1.2.4 Reguladores de crecimiento vegetal

Entre los factores internos que controlan el desarrollo de los diferentes tejidos de una planta destacan los llamados reguladores del crecimiento vegetal, también conocidos como hormonas vegetales o fitohormonas. Los reguladores de crecimiento vegetal son compuestos orgánicos sintetizados por la propia planta, que en muy pequeñas cantidades alteran el crecimiento o los patrones de desarrollo de los tejidos vegetales (Pérez-Molphe-Balch *et. al.*, 1999).

Los reguladores de crecimiento vegetal se clasifican en 5 grupos básicos dependiendo de su estructura química y efecto fisiológico: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno. Actualmente, se han aislado y estudiado otras sustancias fuera de estos grupos, que podrían ser también consideradas como reguladores de crecimiento vegetal, como por ejemplo las poliaminas, jasmonatos, ácido salicílico y los brasinoesteroides (Davies, 1995).

Sin embargo, así como entre los reguladores de las plantas se encuentran sustancias endógenas, producidas por la planta misma, también se encuentran sustancias exógenas, que son aplicadas desde afuera y que con frecuencia son sintéticas. Denominamos "hormonas de plantas" a los reguladores endógenos que se transportan en la planta del sitio de síntesis al sitio de acción, pudiéndose considerar a éstas como portadores de información. El etileno se considera como la hormona del envejecimiento, y el ácido salicílico funciona como transmisor de la información de la invasión de algún patógeno (Jankiewicz, 2003).

1.2.5 El Etileno

El etileno es una de las sustancias orgánicas más simples, que sin embargo tiene una amplia esfera de actividades en la planta. El etileno representa un elemento importante del sistema de regulación endógena en las plantas, especialmente durante la maduración y envejecimiento. El etileno, al estimular el envejecimiento, frecuentemente causa también graves pérdidas en la producción de frutas, hortalizas y flores. El problema de inhibir, o por lo menos retrasar el proceso de envejecimiento del material vegetal, es siempre muy actual en la agricultura y ésta es una razón importante para desarrollar las investigaciones sobre este regulador (Jankiewicz, 2003).

El etileno es miembro de la clase de compuestos orgánicos llamados alquenos, que contienen al menos, un doble enlace carbono-carbono. Es un gas incoloro, con un olor ligeramente dulce, y su fórmula es $H_2C=CH_2$. Es ligeramente soluble en agua y se produce comercialmente mediante craqueo y destilación fraccionada del petróleo, así como del gas natural. El

Etileno arde con una llama brillante y debido a su doble enlace, es muy reactivo y forma fácilmente numerosos productos como el bromoetano, el 1,2-etanodiol (etilenglicol) y el polietileno. En agricultura se utiliza como colorante y agente madurador de muchas frutas. Tiene punto de fusión -169,4 °C y un punto de ebullición de -103,8 °C. "Eteno" Microsoft® Encarta® 2006. Es una molécula gaseosa que regula diversos procesos en las plantas, incluyendo etapas del desarrollo, respuestas de defensa a factores de estrés bióticos y abióticos (Bleecker y Kende, 2000). Se cuenta con suficiente evidencia que indica que el etileno juega un papel importante en las respuestas de defensa, se ha observado que los niveles de etileno se ven incrementados ante una herida, tratamiento con elicitores y más aun ante una infección por patógenos (Enyedi *et al.*, 1992; O'Donnell *et al.*, 1996). El etileno regula la expresión de varios genes, incluyendo los que participan en las repuestas de defensa a estrés biótico; por ejemplo, proteínas PR tal como glucanasas y quitinasas son inducidas por etileno (Deikman, 1997). Entre sus efectos se encuentran: la estimulación de la maduración, de esto existen resultados acerca del beneficio que se obtiene con la remoción del etileno de lugares de almacenamiento, dependiendo de la madurez en la cosecha y de la duración y tipo de almacenamiento (aire o AC).

1.2.5.1 Biosíntesis

Deriva de los C₃ y C₄ del aminoácido metionina, que pasa, con gasto de ATP, a S-adenosilmetionina (SAM), posteriormente por acción de la enzima Ácido-1-aminociclopropano carboxílico (ACC) sintasa se convierte a Ácido-1-aminociclopropanocarboxílico (ACC) y por oxidación de este por la ACC oxidasa se forma etileno. Una característica de esta hormona es que posee acción autocatalítica, se debe a que la presencia de etileno activa la acción del gen que codifica la enzima que pasa de ACC a etileno (Figura 1.3).

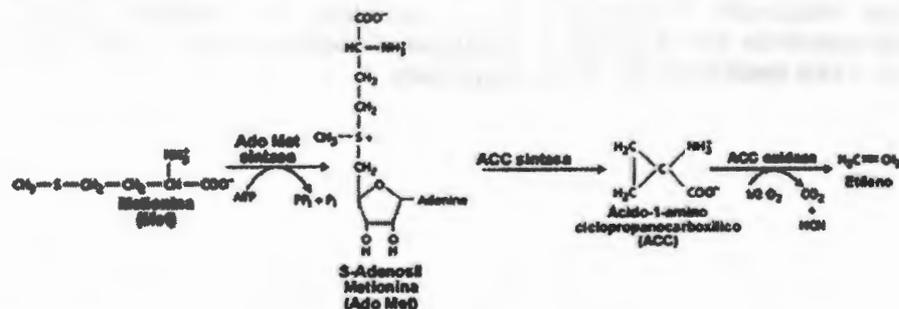


Figura 1.3. Biosíntesis del Etileno. (Modificado de Jankiewicz 2003).

El etileno parece ser producido esencialmente por todas las partes vivas de las plantas superiores, y la tasa varía con el órgano, tejido específico, su estado de crecimiento y desarrollo. Las tasas de síntesis varían desde rangos muy bajos (0.04-0.05 $\mu\text{L}/\text{kg}\cdot\text{hr}$) en "blueberries" (*Vaccinium* sp.) a extremadamente elevadas (3.400 $\mu\text{L}/\text{kg}\cdot\text{hr}$) en flores devanecientes de orquídeas Vanda. El etileno se aplica como gas en ambientes cerrados o en forma líquida como pulverizaciones de Etefón que al ponerse en contacto con la planta libera etileno.

1.2.5.2 Modo de acción

Su modo de acción se da principalmente porque: Se une a receptores del tipo proteico que reconocen moléculas pequeñas de doble ligadura, deber ser una metalproteína que contiene Cu o Zn, sus receptores son principalmente dos (ETR y ERS) uno formado por dos elementos: un sensor y otro de respuesta (ETR) y otro con solo el elemento sensor (ERS), además actúan en la traducción y amplificación de la señal de la hormona, cuando el etileno se une a sus receptores, se desencadenan las reacciones que llevan a la respuesta al etileno y en general se observa un aumento en la síntesis de enzimas.

Algunos de sus efectos fisiológicos incluyen la maduración de frutos, senescencia de órganos, epinastia, hipertrofias, exudación de resinas, látex y gomas, promoción o inhibición de los cultivos de callos *in vitro*, inhibición de la embriogénesis somática, apertura del gancho plumular, inducción de raíces, inhibición del crecimiento longitudinal e incremento del diámetro caulinar. Entre los efectos del Etileno, está que promueve la maduración de frutos en tomate y otras frutas climatéricas. Plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana* tratada con etileno muestran una inhibición dramática de expansión celular. Plántulas expuestas a etileno muestran la llamada triple respuesta: exageración en la curvatura del meristemo apical, engrosamiento del hipocotilo y enanismo. Tratamiento con etileno causa una mayor producción de raíces adventicias.

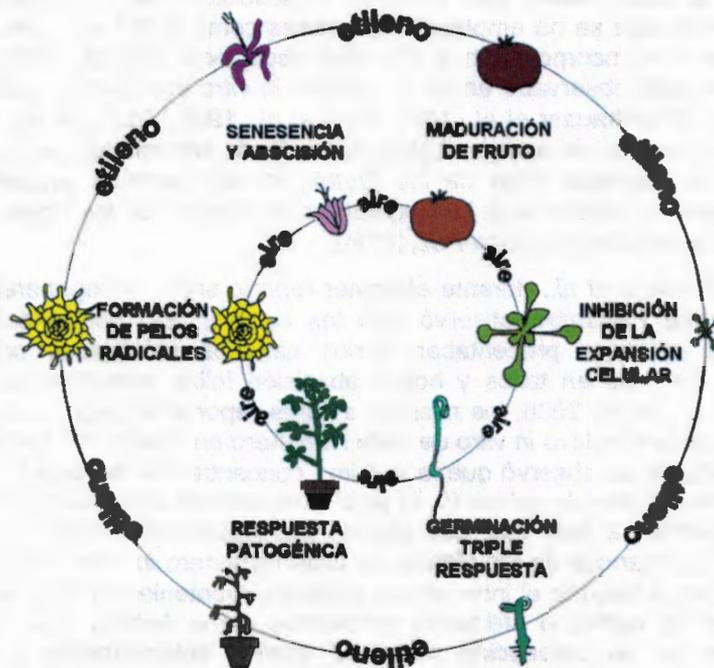


Figura 1.4. Efectos del Etileno. El etileno provoca diferentes respuestas en el reino vegetal (Modificado de Johnson, 1998).

1.2.5.3 Inhibidores de los efectos del Etileno

Entre sus antagonistas se encuentran el CO_2 que compite por el sitio de unión del etileno con el receptor. Por eso se utiliza para la conservación de frutas, el ion Ag^+ que interfiere la unión del etileno con su receptor. Se utiliza para la conservación de flores y el 2,5 norbornadieno cis buteno que inhibe la acción del etileno de manera competitiva por unirse al mismo receptor.

Se ha aplicado en la agricultura en los ámbitos de maduración de frutos climatéricos, evitar vuelco en cereales, provocar abscisión de órganos y frutos, estimular la germinación, inducción de floración, incremento del flujo de látex, gomas y resinas, inhibición de la nodulación inducida por *Rizhobium*, de la tuberización y bulbificación y promoción de la floración femenina en Cucurbitáceas.

En experimentos realizados en el género *Capsicum*, se ha observado que algunos brotes presentan abscisión foliar, lo que impedía su supervivencia en condiciones en invernadero. Algunos autores (Beyer, 1976; Reid, 1990;

Salisbury & Ross, 1994), han asociado la abscisión con la presencia de etileno, por lo que se ha empleado inhibidores como el ión Ag^+ que puede interferir con su incorporación a los sitios receptores (Beyer, 1979), esto además ha sido observado en otros cultivos *in vitro* incluyendo maíz, trigo entre otros. (Purnhauser *et al.*, 1987; Vain *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 2001), en los que después de agregar $AgNO_3$ al medio de crecimiento, se evitó por completo la abscisión foliar de los brotes, lo que permitió suponer que efectivamente el etileno está involucrado en la pérdida de las hojas de las plantas regeneradas (Robledo-Paz, 2004).

En 2005 Santana *et al.*, durante el primer reporte sobre la regeneración *in vitro* de chile Habanero observó que los cultivos que permanecían en recipientes cerrados presentaban serios cambios fisiológicos como la presencia de callo en tallos y hojas, abscisión foliar, senescencia, entre otros, por lo que en 2006, los mismos autores reportaron la producción de etileno durante el cultivo *in vitro* de chile Habanero en medio MS semisólido. En este estudio se observó que la máxima concentración de esta hormona ocurrió a los 24 días de cultivo ($0.12 \mu L L^{-1}$), mostrando una alta sensibilidad de los explantes a este gas, con efectos dramáticamente negativos sobre los brotes y desarrollo de las plantas de chile Habanero *in vitro*, efectos que desaparecen al mejorar el intercambio gaseoso, manteniendo ventilados los recipientes de cultivo o utilizando inhibidores como $AgNO_3$ y $CoCl_2$ que intervienen en su percepción como se explicó anteriormente y en su biosíntesis, respectivamente.

1.3 TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

Los llamados receptores moleculares cuya localización es la superficie celular de las plantas, son importantes componentes en la percepción de estímulos extracelulares del entorno. En la última década, se han identificado varios tipos de receptores en las células vegetales, y basándose en sus características estructurales se han clasificado en diferentes categorías. Por mencionar algunas se encuentran los receptores de Histidina-Cinasa, los receptores que se agrupan de acuerdo al número de dominios transmembranales con los que cuentan y los receptores tipo cinasa, llamados RLKs (Satterlee & Sussman, 1998; Walker, 1994; Grignon, 1999). Posterior a la percepción por los receptores, que marca el sitio de la infección y por lo tanto el inicio del proceso de señalización, se establecen o activan las respuestas de defensa, ya sea de manera sistémica o local. Algunas de las modificaciones que se presentan incluyen cambios en la permeabilidad de la membrana, esto por el influjo de iones Ca^{2+} y protones y del eflujo de K^+ y Cl^- , lo que induce la producción extracelular de intermediarios de reactivos de oxígeno, entre los que se encuentran el ión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales libre de hidrófilo. Estos eventos primarios desencadenan posteriores eventos de transducción de señales resultando en un complejo y fuertemente integrada red de señales que disparan un conjunto de respuestas, Entre las que se puede mencionar la respuesta de hipersensibilidad y la expresión de genes de presentes en estas condiciones. Muchos detalles de los procesos de interacción planta-patógeno son conocidos (Baker *et al.*, 1997).

Una vez que la planta y el patógeno entran en contacto, el organismo hospedero activa una serie de respuestas de defensa. Son inducidas diferentes vías de señalización, entre ellas las mediadas por especies reactivas de oxígeno (ROS), ácido salicílico, óxido nítrico, etileno y ácido jasmónico. También es activada la expresión de genes relacionados con patogenicidad (PR) y la síntesis de compuestos antimicrobianos que son generalmente fitoalexinas, defensinas, compuestos fenólicos y flavonoides producidos para atacar directamente al patógeno (Baker *et al.*, 1997).

1.3.1 Los receptores de etileno

La familia de receptores de etileno en *Arabidopsis* consta de cinco miembros (ETR1, ETR2, ERS1, ERS2, and EIN4; Schaller, 2000). Los receptores contienen tres dominios N-terminal que contienen el sitio de unión a etileno (Schaller and Bleecker, 1995; Rodríguez *et al.*, 1999).

El sitio de unión contiene un cofactor de cobre que se requiere para la alta afinidad de la unión del etileno al receptor (Rodríguez *et al.*, 1999). El receptor de etileno ETR1; en *Arabidopsis thaliana* es un dímero de 2 proteínas integrales de membrana, con actividad histidina kinasa y capacidad autofosforilante.

La unión del etileno a su receptor induce su autofosforilación a nivel de residuos de histidina y luego transferencia de estos fosfatos hacia residuos de aspartato. El receptor así activado inicia una cascada de señalizaciones hacia otras proteínas efectoras (cascada del tipo MAP Kinasa, con destino final a nivel del ADN).

La unión del etileno al receptor da como resultado la inactivación de un regulador negativo CTR1 (que se hallaba inhibiendo a la proteína transmembranal EIN2) por lo que la proteína EIN2 cobra actividad, funcionando como un canal de iones (probablemente iones Ca^{+2}), lo que se traduce en una posterior activación del factor de transcripción EIN3, que actúa a nivel genómico induciendo la expresión genética de proteínas efectoras (Soberón, 2007).

1.3.2 Genes relacionados con el etileno

Existen diversos genes que se relacionan con la presencia de Etileno. Algunos de los genes reportados que tienen relación con la presencia de Etileno, son los enunciados en el siguiente cuadro:

Cuadro 1.1. Genes relacionados con el Etileno.

Proteína	Especie	Referencia
S-adenosilmetionina sintasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Kim <i>et al.</i> , 1994
ACC sintasa	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Liu <i>et al.</i> , 1993
	<i>Glycine max</i>	Lincoln <i>et al.</i> , 1993
	<i>Cucumis melo</i>	Diallinas & Kanelli, 1994
ACC oxidasa Sn1 and Sn2	<i>Cucumis melo</i>	Diallinas & Kanelli, 1994
	<i>Capsicum annum</i>	Pozueta-Romero <i>et al.</i> , 1995
LEA-like protein	<i>Lycopersicum esculentum</i>	Zegzouti H. <i>et al.</i> , 1997

1.3.3 Regulación de la expresión génica

Todo organismo tiene la capacidad para sintetizar muchas proteínas diferentes y debido a que estas son necesarias en cantidades distintas y en momentos diferentes, la expresión genética debe ser finamente regulada. Esta regulación puede ser a diferentes niveles, a nivel de transcripción del ADN, a nivel de la traducción o el recambio del ARNm, en los eucariotas, a nivel del procesamiento del transcrito o del transporte del ARNm al citoplasma. Por expresión génica se entiende la serie de sucesos que conducen a la síntesis de algún producto génico, generalmente un polipéptido.

Estos sucesos constituyen el flujo de información genética, que incluye, la transcripción del gen, el procesamiento del transcrito primario en ARNm y su traducción en una proteína. En principio, cada uno de los pasos que van de la transcripción del ADN a la síntesis de la proteína puede estar regulado. Dependiendo del tipo de organismo y del gen en cuestión, la regulación de la expresión génica dependerá, en mayor o en menor grado, de algunos pasos (Balbás, 2002).

1.3.4 Identificación de la expresión génica diferencial

El análisis de los patrones de expresión génica se ha empleado para la identificación de genes, lo que ha permitido relacionar las funciones de genes específicos con procesos del desarrollo o del establecimiento de actividades metabólicas o moleculares, los métodos experimentales desarrollados para analizar la expresión génica diferencial han tenido un gran avance en los últimos años. Algunos genes cuya expresión es modificada durante la infección codifican diferentes tipos de proteínas involucradas, tanto en mecanismos celulares así como también otras de respuesta de defensa, entre las que podemos mencionar factores de transcripción (Lin *et al.*, 2004) y MAPK (He *et al.*, 1999), entre otras.

Se han realizado estudios sobre la expresión diferencial durante la respuesta a patógenos con la finalidad de identificar genes que se inducen o reprimen durante la interacción planta-patógeno, para la cual se han empleado técnicas como el despliegue diferencial (DD), el análisis de polimorfismo de fragmentos de ADNc amplificados (AFLP), análisis serial de la expresión génica (SAGE), la hibridación substractiva y el análisis por microarreglos.

1.3.5 Análisis de la expresión génica diferencial

Existen diferentes técnicas empleadas para el análisis diferencial de la expresión génica, entre las que podemos mencionar el despliegue diferencial (DD) de ARNs. Este fue reportado por primera vez por Liang y Pardee en 1992, y se ha utilizado para amplificar transcritos de baja abundancia por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). De manera estadística se ha comprobado que con una combinación de entre 80 y 120 cebadores específicos es suficiente para cubrir toda la población de transcritos de la célula (Liang, 1993). Esta técnica posee las siguientes ventajas sobre otras técnicas similares: está basada en un método simple que ya está establecido, no se requiere información bioquímica sobre las proteínas, pueden ser comparadas simultáneamente más de dos muestras, y solamente se requiere una pequeña cantidad de muestra.

En los últimos 10 años, esta técnica ha sido utilizada con el fin de aislar genes de plantas que están involucrados en eventos fisiológicos, transducción de señales, respuesta a estrés y metabolismo secundario.

Está constituida por una combinación de tres técnicas de uso frecuente en biología molecular, la cual es acompañada por una de visualización en la expresión de patrones entre dos o más muestras (Liang, 1992). Requiere la transcripción reversa de un ARN poliadenilado (poly-A), que dependiendo del método no siempre es necesario, ya que es posible utilizar ARN total como muestra, la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del transcrito de la cadena complementaria del ADN (ADNc) usando cebadores del despliegue diferencial y geles de poliacrilamida para la electroforesis. Para ello, las muestras de ARN son transcritas usando una enzima transcriptasa inversa y un cebador oligo-dT para alinear con la cola poly-A de los ARN mensajeros maduros (ARNm), los ADNc resultantes son usados como moldes en un PCR, utilizando un cebador de anclaje en combinación con un cebador arbitrario.

Debido a que las uniones de estos cebadores no son específicas, se utilizan oligonucleótidos pequeños (10-13 pb), lo que lleva a una expresión de varias especies de ADNc, las cuales pueden ser visualizadas fraccionando los productos en un gel de poliacrilamida (Liang, 1997), es en este paso donde es posible la comparación entre dos condiciones, en función del tamaño de las bandas, su presencia o ausencia, es decir su expresión génica. Seguidamente es necesario cortar las bandas del gel, para su posterior amplificación y confirmación de que realmente son diferenciales. Es necesario su secuenciación para conocer su identidad al comparar con bancos de datos e identificar su posible función durante el proceso en estudio. En el siguiente cuadro, se comparan la técnica del DD con otras técnicas que pueden complementarla o sustituirla.

Cuadro 1.2. Comparación de técnicas utilizadas en el análisis de la expresión de genes (modificado de Liang, 2002).

Técnica	Comparación de muestras	Complejidad	Diferencias detectables	Detección de nuevos genes	Costo
Despliegue diferencial (DD)	Cualquier número	Baja	Incremento de 1.1 o más	Si	De bajo a medio
Hibridización substractiva	Dos	Alta	> 10 veces	Si	Bajo
RDA (análisis representativo de diferencias)	Dos	Alta	> 15 veces	Si	Bajo
SSH (Hibridización substractiva por supresión)	Dos	Alta	> 10 veces	Si	Bajo
SAGE (Análisis serial de la expresión de genes)	Cualquier número	baja	Todas las diferencias	No	De bajo a medio
Microarreglos	Dos	Dependiendo del punto de inicio	> 2 veces	Generalmente no	Alto

1.4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.4.1 Hipótesis

Si la acumulación de etileno en los recipientes sin ventilación influye en el comportamiento de la especie *Capsicum chinense* Jacq. durante el cultivo *in vitro*, entonces es de esperar que las plántulas cultivadas bajo estas condiciones presenten modificaciones en el patrón de expresión génica.

1.4.2 Objetivo general

Demostrar que el ambiente dentro del recipiente sin ventilación modifica diferencialmente la expresión de genes relacionados con el desarrollo de plántulas *in vitro*.

1.4.3 Objetivos particulares

- Evaluar el contenido de etileno en recipientes sin ventilación durante el desarrollo *in vitro* de plántulas del chile Habanero.
- Evaluar los cambios en la expresión génica diferencial durante el proceso de desarrollo *in vitro* de chile Habanero en recipientes sin ventilación (RSV) y en recipientes con ventilación (RCV) utilizando la técnica del Despliegue Diferencial de ARN.
- Identificar y caracterizar la expresión de genes de chile Habanero.

1.5 BIBLIOGRAFÍA

- Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B., Dineshkumar S. P. (1997). Signaling in Plant-Microbe Interaction. *Science*. 276: 726-733.
- Balbás, P. (2002). De la Biología Molecular a la Biotecnología. Ed. Trillas, México, D.F.
- Beyer, E. M., (1976). A potent inhibitor of ethylene action in plants. *Plant Physiology*. 58:268-271.
- Beyer, E. M. (1979). Effect of Silver Ion, Carbon Dioxide, and Oxygen on Ethylene Action and Metabolism. *Plant Physiol*. 63, 169-173.
- Bleecker, A. B. and Kende H. (2000). Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 16:1-18.
- Canto-Flick, A. (2005). Caracterización Morfológica de una colección de 18 accesiones de Chile Habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) establecida en el CICY. Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica de Yucatán.
- Davies, P. J. (1995). *Plant hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers).
- Deikman, J. (1997). Molecular mechanisms of ethylene regulation of gene expression. *Physiol. Plant*. 100:561-566.
- Diallinas, G. and Kanellis, A. K. (1994). A phenylalanine ammonia-lyase gene from melon fruit: cDNA cloning, sequence and expression in response to development and wounding. *Plant Mol. Biol*. 26:473-479.
- Enyedi, A. J., Yalpani, N., Silverman, P. and Raskin, I. (1992). Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests. *Cell* 70:879-886.
- "Eteno" Microsoft® Encarta® 2006 Microsoft Corporation, 2005.
- Grignon, C. (1999). Recent advances on proteins of plant terminal membranes. *Biochimie* 81:577-596.
- Hartmann, H. T. and Kester, D. E. (2001). Propagación de plantas, Principios y Prácticas. Compañía Editorial Continental, Octava reimpresión, México.
- He Z-H, Cheeseman I., He D., Kohorn B.D., (1999). A cluster of five cell wall-associated receptor kinases, Wak1-5, are expressed in specific organs of Arabidopsis. *Plant Mol. Biol*. 39:1189-1999.
- Jankiewicz, L. S. (2003). Reguladores del crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas, Vol.1 (Propiedades y acción) UACH. Edición Mundi-Prensa. México, D.F. pp. 15-16 y 257-294.
- Johnson, P. and Ecker J., (1998). The ethylene gas signal transduction pathway: A molecular perspective. *Annual Review Genetic* 32:227-254.

- Kim, C. S., Kwak, J. M., Nam, H. G., Kim, K. and Cho, B. H. (1994). Isolation and characterization of two cDNAs that are rapidly induced during the wound response of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* 13: 340-343.
- Laborde, C. y Pozo, Q., (1982). Presente y pasado del chile en México. SARH-INIA. México, D.F. pp 79.
- Liang, P. and A. B. Pardee, (1992). Differential display of eukaryotic mRNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257:967-971.
- Liang, P., Averboukh L. and Pardee A. B., (1993). Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of diferencial display: refinements and optimización. *Nucleic Acids Res.* 21: 3269-3275.
- Liang, P. and Pardee, A. B. (1997). Differential display-a general protocol. In: *Methods in Molecular Biology: Differential display Methods and protocols*, pp 3-11, P. Liang and Pardee A.B. (eds), Humana Press, Totowa, NJ.
- Liang, P and Stein. J. (2002) Differential display technology: a general guide. *CMLS. Cell. Mol. Life. Sci.* 59: 1235-1240.
- Lin, J., Brader G. and Palva E. T. (2004). The WRKY 70 transcription factor: a node of convergente for jasmonate mediated and salicilate mediated signal in plant defense. *The plant cell* 16:319-331.
- Lincoln, J. E., Campbell, A. D., Oetiker, J., Rottmann, W. H., Oeller, P. W., Shen, N. F., Theologis, A. (1993). Le-Acs4, a fruit ripening and wound-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of tomato (*Lycopersicon esculentum*): expression in *Escherichia coli*, structural characterization, expression characteristics, and phylogenetic analysis. *Journal of Biological Chemistry* 268, 19422-19430.
- Liu, J., Stevens, C., Khan, V. A., Lu, J. Y., Wilson, C. L., Adeyeye, O., Kabwe, M. K., Pusey, P. L., Chalutz, E., Sultana, T. and Droby, S. (1993). Application of ultraviolet-C light on storage rots and ripening of tomatoes. *J. Food Protect.* 56:868-872.
- O'Donnell, P. J., Calvert, C., Atzorn, R., Wasternack, C., Leyser, H. M. O., Bowles, D. J. (1996). Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science* 274:1914-1917.
- Pérez-Molphe-Balch, E. M., Ramírez-Malagón, R., Núñez-Palenius, H. G., Ochoa-Alejo, N. (1999). Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes, pp. 9-55.
- Pozueta-Romero, J., Klein, M., Houlné, G., Schantz, M-L., Meyer, B. and Schantz, R. (1995). Characterization of a family of genes encoding a fruit-specific wound-stimulated protein of bell pepper (*Capsicum annuum*): identification of a new family of transposable elements. *Plant Molecular Biology* 28:1011-1025.
- Purnhauser, L., Medgyesy M. and Czeko P. J. (1987). Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana plumbaginifolia* Viv.

- tissue culture using the ethylene inhibitor AgNO₃. *Plant Cell Rep.* 6:1-4.
- Reid, M. S. (1990). The functioning of hormones in plant growth and development: In *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*. P. J. Davies (ed). Kluwer Academia Publishers. Netherlands. pp: 257-279.
- Robledo-Paz, A. (2004). Regeneración *in vitro* de plantas de Chile (*Capsicum annuum* L.) mediante cultivo de cotiledones e hipocotilos. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 27 (2):121-126.
- Rodríguez, F. I., Esch, J. J., Hall, A. E., Binder, B. M., Schaller, G. E. and Bleecker, A. B. (1999). A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from Arabidopsis. *Science* 283: 996-998.
- Salisbury, F. B. and Ross, C. W. (1994). *Fisiología Vegetal*. V. González Velázquez (trad). Grupo Editorial Iberoamérica. México, D.F. pp 759.
- Santana-Buzzy *et al.*, (2005). Regeneration of Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) Via Organogenesis. *HortScience* 40 (6): 1829-1831.
- Santana-Buzzy *et al.*, (2006). Improvement of *In vitro* Culturing of Habanero Pepper by inhibition of Ethylene Effects. *HortScience* 41 (2): 405-409.
- Satterlee, J. S. and Sussman, M. R. (1998). Unusual membrane-associated protein kinases in higher plants. *J. Membr. Biol.* 164:205-213.
- Schaller, G. E. (2000). Histidine kinases and the role of two-component systems in plants. *Adv. Bot. Res.* 32: 109-148.
- Schaller, G. E. and Bleecker, A. B. (1995). Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the Arabidopsis *ETR1* gene. *Science* 270: 1809-1811.
- Soberón, J. R., Quiroga, E. N., Sampietro, A. R. and Vattuone, M. A. (2007). Etileno. Hipertextos del área de la Biología. Univesidad Nacional del Nordeste. República Argentina.
- Soria-Fregoso, M. J. (2002). Paquete Tecnológico para la producción de Chile Habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). INSTITUTO TECNOLÓGICO AGROPECUARIO No. 2 "Ing. José Alberto Navarrete Ruiz", Conkal, Yucatán.
- Tún-Dzul, José de la Cruz (2001). Chile Habanero. Características y Tecnología de producción. SAGARPA. INIFAP produce. Yucatán. Página 74.
- Vain, P. *et al.*, (1989). Role of ethylene in Embryogenic Callu Initiation and Regeneration in *Zea mays* L. *J. Plant Physiology* Vol. 135 pp. 537-540.
- Walker, J. C. (1994). Structure and function of the receptor-like protein kinase of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 26:1599-1609
- Zegzouti, H. *et al.*, (1997). ER5, a tomato cDNA encoding an ethylene-responsive LEA-like protein: characterization and expression in

response to drought, ABA and wounding. *Plant Molecular Biology* 35:847-854.

Zhang, J. S., Xie, C., Shen, Y. G. *et al.*, (2001). A two-component gene (*NTHK1*) encoding a putative ethylene receptor homolog is both developmentally and stress regulated in tobacco, *Theor. Appl. Genet.*, 102: 815-824.

CAPÍTULO II

Materiales y métodos

2.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En la figura 2.1 se muestra la estrategia experimental de este proyecto.

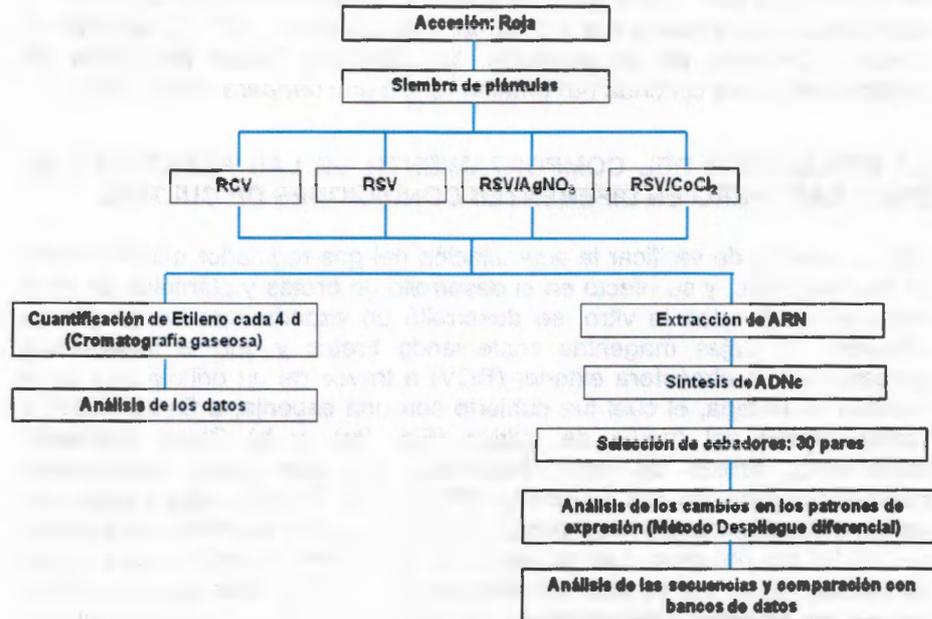


Figura 2.1. Estrategia experimental.

2.2 GENERALIDADES

2.2.1 Material vegetal

Se emplearon semillas de la accesión: RPS de Chile Habanero Rojo, conservada en el Banco del Germoplasma de Chile Habanero del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). En estudios previos, esta accesión mostró una alta sensibilidad al Etileno acumulado en el recipiente de cultivo, por lo que se utilizó como modelo de estudio.

Estas semillas fueron desinfectadas siguiendo el protocolo reportado por Santana-Buzzy *et al.* (2005) para esta especie. Para su germinación *in vitro* fueron colocadas en medio semisólido MS (Murashige and Skoog, 1962) suplementado con $1.15 \mu\text{M}$ de ácido giberélico (GA_3).

Una vez germinadas fueron trasladadas a condiciones de fotoperiodo 16 horas-luz ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) durante 5 días. Una vez transcurrido este tiempo se procedió a la disección de las plántulas en condiciones de asepsia. Para todos los experimentos se empleó medio de cultivo MS (Anexo 1), el medio fue solidificado con 0.22% (w/v) de gelrite y ajustado a pH 5.7 antes de su esterilización en autoclave a $1.5 \text{ Kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ de presión y $121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 minutos. Después de su disección, las plántulas fueron incubadas en condiciones de luz continua ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a una temperatura de $25\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.3 EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LAS PLÁNTULAS DE CHILE HABANERO EN DIFERENTES CONDICIONES DE CULTIVO.

Con el objetivo de verificar la acumulación del gas-regulador etileno dentro de las magentas, y su efecto en el desarrollo de brotes y plántulas de chile Habanero cultivados *in vitro*, se desarrolló un experimento en el que se utilizaron: a) Cajas magentas conteniendo brotes y con el intercambio gaseoso con la atmósfera exterior (RCV) a través de un orificio que se le practicó en la tapa, el cual fue cubierto con una esponja, a fin de evitar la contaminación del medio de cultivo (Fig. 2a), y b) Cajas magentas conteniendo brotes de chile Habanero, sin que estos mantuvieran intercambio gaseoso con el exterior (RSV) (Fig. 2b). En cada tratamiento fueron utilizadas 4 cajas magentas, y en cada una fueron cultivados 4 brotes de 0.5-1.0 cm de altura. Las muestras de gas fueron tomadas cada 4 días de cultivo, hasta los 40 días de establecido el cultivo. Además del etileno acumulado en interior del recipiente de cultivo, fue evaluado la altura de las plantas, y el número de hojas desarrolladas. Fueron observadas además, otras características relacionadas con el desarrollo y calidad de las plántulas durante el experimento (presencia o ausencia de raíz, vigor, color, senescencia de las hojas, vitrificación, flacidez y otras anomalías del crecimiento).

La respuesta de la plántula en presencia de inhibidores de Etileno, fue evaluada empleando $300 \mu\text{M}$ de AgNO_3 (inhibidor de los receptores de etileno) y $300 \mu\text{M}$ de CoCl_2 (inhibidor de la síntesis de etileno), (Fig. 2), siguiendo la metodología recomendada por Santana-Buzzy *et al.* (2006). La composición del medio de cultivo fue la misma que se utilizó en el experimento anterior, excepto la adición de los dos inhibidores evaluados. Durante el experimento se tomaron muestras de gas del interior de cada recipiente de cultivo cada cuatro días y se evaluó el comportamiento de las plantas en los diferentes tratamientos realizados.

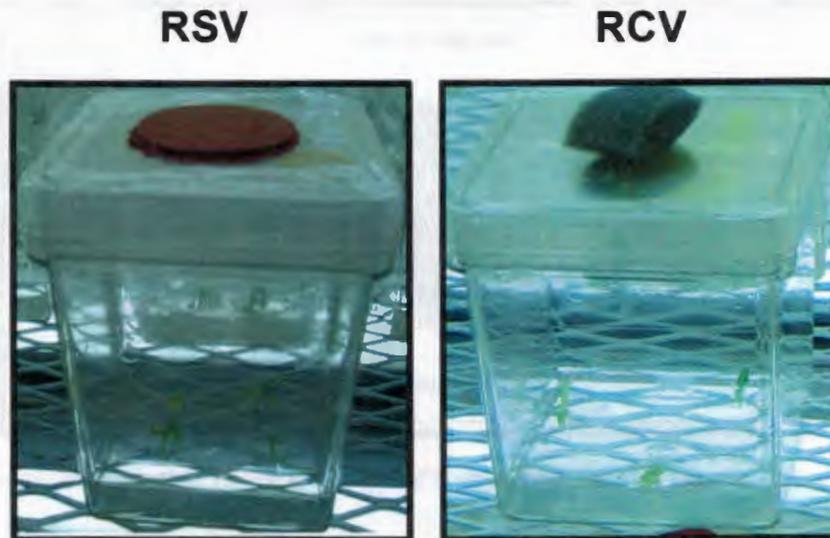


Figura 2.2. Condiciones de cultivo: RSV y RCV en luz continua.

2.4 CUANTIFICACIÓN DE ETILENO

El etileno fue cuantificado en *recipientes sin ventilación* (RSV) y en *recipientes con ventilación* (RCV). Para ello, de cada magenta se extrajo, con ayuda de una jeringa 2 mL de la atmósfera contenida. Estas mediciones se realizaron cada 4 días durante un periodo de 40 días. Para cada medición se emplearon 3 magentas conteniendo cada una 4 plantas para dar un total de 12 plantas por medición. La muestra extraída fue inyectada en el cromatógrafo Series II Gas Chromatograph 5890 de la compañía hp. Se empleó como gas acarreador Nitrógeno y como columna una de megaboro, isoteno a 70 °C y con una presión de 8 psi estandarizado para la medición de etileno. Para evitar contaminación por otras muestras, se calentaba a 150 °C la columna durante 30-40 min y después se procedía a enfriar a 70 °C antes de inyectar la muestra. En la figura 2.3 se muestra la curva de calibración utilizada para la cuantificación de etileno, en su fabricación se empleó etileno puro como estándar.

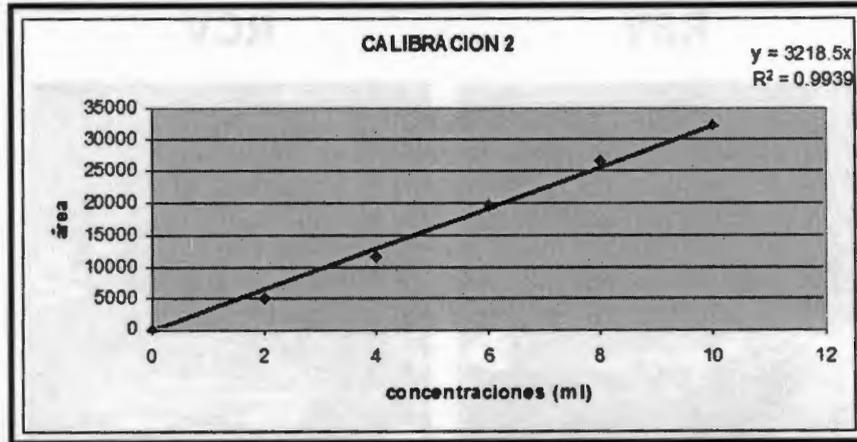


Figura 2.3. Curva de calibración de Etileno. Se empleó etileno puro como estándar.

Posteriormente, se analizaron los datos de la última semana de evaluación, para ello se calcularon las estadísticas descriptivas y se realizaron ANOVA (clasificación simple) así como tukey de los datos, asimismo se concluyó con un análisis conglomerado con los datos de longitud y número de hojas obtenidos de los 2 recipientes (RSV y RCV). Los datos de número de hojas fueron transformados en base $\log_{10} + 1$.

2.5 ANÁLISIS MOLECULARES

2.5.1 Extracción del ARN

Para la extracción del ARN se siguió la metodología reportada por Chomczynski and Sacchi (1987), ligeramente modificada por Gómez-Uc (2006). Todos los pasos fueron desarrollados por centrifugación a 13000 rpm en un rotor Sorvall # 3328 (Sorvall® fresco).

De cada tratamiento se utilizó 1g de hoja. Las muestras fueron maceradas en nitrógeno líquido, agregando 5 mL de Trizol (manufacturado en el laboratorio) compuesto por 38% v/v de Fenol, 12.5 mM de Tiocianato de Guanidina ultrapura, 6.25 mM de Tiocianato de Amonio, 100 mM de Acetato de Sodio y 5% de Glicerol grado biología molecular.

Posteriormente las muestras fueron incubadas por 10 min a temperatura ambiente. Después de incubadas, las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm por 15 min a 4 °C, el sobrenadante fue retirado y depositado en un tubo, agregándole 1/5 de volumen de una mezcla de Cloroformo:Alcohol Isoamílico (49:1). Seguidamente las muestras se agitaron en un vórtex y se incubaron por 3 min a temperatura ambiente, procediendo luego a centrifugar las muestras a 13000 rpm por 15 min a 4 °C para la separación de fases.

La fase incolora acuosa (superior) se transfirió a un tubo nuevo y se agregó un volumen igual de Isopropanol frío. Se incubaron las muestras a 4 °C toda la noche, posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm por 15 min a 4 °C. Las pastillas fueron lavadas con etanol al 70% frío y centrifugadas a 13000 rpm por 15 min a 4 °C, este paso se repitió tres veces, y en la última repetición se empleó etanol al 100% frío. Se eliminó el etanol, y las pastillas se dejaron secar a temperatura ambiente.

Posteriormente las pastillas se resuspendieron en 35 µL de agua tratada con Dietilpirocarbonato (DEPC) y se almacenaron a -80 °C.

Para el análisis de las poblaciones de ARN mensajeros se eliminó el ADN cromosómico a fin de evitar la presencia de falsos positivos.

El protocolo empleado fue el de la casa comercial AMBIÓN™, como se describe en anexos (Anexo 2).

2.5.1.1 Cuantificación y comprobación de la integridad del ARN total

La cuantificación del ARN total se realizó por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm con la fórmula siguiente:

$$[\mu\text{g de ARN mL}^{-1}] = \frac{(\text{DO}_{260\text{ nm}}) (40 \mu\text{g de ARN mL}^{-1}) (2 \text{ mL})}{2 \mu\text{L}}$$

Donde:

DO 260 nm= Lectura espectrofotométrica de la solución de ARN a 260 nm
40 $\mu\text{g ARN}\cdot\text{mL}^{-1}$ = Factor que relaciona la concentración de una solución de ARN con su absorción a 260 nm, determinado empíricamente
2 mL= Volumen total de la celda
2 μL = Volumen de la alícuota de ARN evaluada

Para verificar la integridad del ARN, se fraccionó una alícuota de éste mediante electroforesis en un gel nativo de agarosa al 1.4%, este ARN se mezcló con amortiguador de carga que contenía bromuro de etidio en concentración de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

2.5.2 Síntesis de ADNc: transcripción reversa del ARN

Para la síntesis de ADNc fue utilizada la enzima SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen).

El procedimiento fue el siguiente: se mezclaron 1 μL de ARN (1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 1 μL de Oligo-dT, 1 μL de dNTP 10 μM y agua hasta un volumen final de 13 μL . La mezcla se incubó a 65 °C por 5 min y posteriormente se incubó en hielo por 2 min. Seguidamente se le adicionó 4 μL del amortiguador 5X first strand, 1 μL de DTT 0.1 M y 1 μL de la transcriptasa reversa y se incubó a 50 °C por 60 min, y a 70 °C por 15 min (para inactivar a la enzima).

A continuación, para verificar la integridad fue fraccionada una alícuota en un gel nativo de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

2.5.2.1 Amplificación de las cadenas de ADNc

Para la amplificación de los ADNc tanto del control como de los tratamientos, se utilizaron diferentes combinaciones de los cebadores del Despliegue Diferencial, los cuales se muestran en el cuadro 2.1.

Cuadro 2.1. Cebadores para el Despliegue Diferencial

Cebadores arbitrarios o universal (Pn)	Cebadores de anclaje Oligo dT (Tn)
P1: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGGGA-3'	T1: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTAA-3'
P2: 5'-ATTAACCCTCACTAAATCGGTCATAG-3'	T2: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTAC-3'
P3: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGTGG-3'	T3: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTATAG-3'
P4: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGTAG-3'	T4: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTCA-3'
P5: 5'-ATTAACCCTCACTAAAGATCTGACTG-3'	T5: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTCC-3'
P6: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGGTG-3'	T6: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTCG-3'
P7: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGTATG-3'	T7: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTGA-3'
P8: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGGAGCTGG-3'	T8: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTGC-3'
P9: 5'-ATTAACCCTCACTAAATGGCAGG-3'	T9: 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTGG-3'
P10: 5'-ATTAACCCTCACTAAAGCACCGTCC-3'	

Se hicieron reacciones con mezclas PnTn a partir de ADN de cadena sencilla tanto del control como de los tratamientos. Para la reproducibilidad de este experimento se realizó una mezcla de los componentes a emplear en esta reacción de PCR, excepto los cebadores y la muestra. A esta mezcla se le denominó "supermix" (Anexo 5). Para las reacciones se mezclaron 17 µL de "supermix", 1 µL de Pn, 1 µL de Tn, 4 µL del correspondiente ADN de cadena sencilla y 2 µL de agua sigma. Las condiciones para el estudio se describen en el cuadro 2.2.

Cuadro 2.2. Condiciones de amplificación de las cadenas de ADNc.

Condiciones de amplificación			
1 ciclo:	94 °C 5 min	40 °C 5 min	68 °C 5 min
2 ciclos:	94 °C 2 min	40 °C 5 min	68 °C 5 min
22-25 ciclos:	94 °C 1 min	60 °C 1 min	68 °C 2 min
1 ciclo:	68 °C 7 min		

Para las amplificaciones se utilizó una termocicladora MyCycler™ (BIORAD), con capacidad para 96 muestras. Las muestras amplificadas se almacenaron a -20 °C. Las condiciones aquí presentadas son las que especifica el manual del protocolo Delta® Differential Display (CLONTECH) en el cual se basó para la realización de estos estudios. Estas amplificaciones se fraccionaron en geles nativos de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio (1 µg·mL⁻¹) para su visualización.

2.5.3 Fraccionamiento de las muestras de ADNc por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida

Para el fraccionamiento de los ADNc amplificados se empleó un gel desnaturizante de acrilamida-bisacrilamida (poliacrilamida) al 6% (Anexo 7), antes del fraccionamiento el gel se precalentó 1 hora, el amortiguador empleado fue TBE 1X (Anexo 4).

Las muestras se prepararon adicionándoles 1/3 del amortiguador de formamida (Anexo 7), estas mezclas se incubaron a 94 °C por 4 min para su desnaturización y de esta se cargó 7 µL en el gel. Asimismo se cargó una mezcla de 2 µL de marcador de 1 Kb plus de la casa comercial Invitrogen + 4 µL de amortiguador de formamida, que igual que las muestras, se desnaturizó.

2.5.3.1 Tinción del gel de poliacrilamida

El protocolo empleado fue el de Promega Silver Sequence™ DNA como se describe a continuación: Una vez terminada la corrida, se separaron los vidrios y el que tenía pegado el gel se colocó en una bandeja de plástico (por seguridad), el cual contenía una solución de ácido acético al 10%. Se agitó durante 20 min para que el ADN se fije. Posteriormente se realizaron 3 lavados con agua destilada para la eliminación de posibles residuos químicos no deseados, como lo recomienda el protocolo. Entre cambio y cambio de agua, no se dejaron pasar más de 10 seg. Inmediatamente después, se colocó el gel en contacto con la solución de plata y se agitó durante 30 min. En este tiempo se preparó la solución de revelado.

Posterior a los 30 min se retiró la solución de plata de manera rápida y se dió un breve lavado con agua destilada fría por no más de 10 segundos. Seguidamente se colocó el gel en contacto con la solución de revelado (fría a 4 °C) con agitación uniforme.

El tiempo de contacto fue hasta que las bandas se hicieron visibles. Una vez alcanzado este tiempo, se detuvo la reacción adicionando la solución de fijado antes utilizada. Ambas soluciones se retiraron, se dieron tres lavados de 2 min con agua destilada cada uno, y posteriormente se dejó secar el gel a temperatura ambiente.

2.5.3.2 Análisis y reamplificación de las bandas

Las bandas seleccionadas como diferenciales se seccionaron con ayuda de un bisturí y se colocaron en tubos de PCR a los cuales se les adicionó 40 μL de amortiguador Tris-EDTA (TE) preparado como se describe en anexos (Anexo 4), estos se incubaron a TA durante 15 min, luego a 94 °C por 4 min y por último a temperatura ambiente por 3 hr, después se almacenaron a -20 °C o se utilizaron inmediatamente. Para reamplificarlas se utilizaron las mismas condiciones que la amplificaron, incluyendo los cebadores, se emplearon 17 μL de "supermix", 1 μL de cebador universal (Pn), 1 μL de cebador anclaje (Tn) y 6 μL de ADN (de la banda que ya fue eluída). Para su verificación se fraccionó una alícuota en un gel nativo de agarosa al 3% teñido con Bromuro de etidio junto con el mismo marcador empleado en el gel de poliacrilamida.

2.5.4 Ligación de los fragmentos, transformación de bacterias y clonación

El vector empleado fue el pGEM T-Easy de la casa comercial PROMEGA, para lo cual se procedió a realizar la siguiente mezcla: 25 ng del vector pGEM, 1 μL de T4 ADN ligasa, 2.5 μL del amortiguador de la ligasa y 6 μL del producto de PCR. En las figuras 2.4 y 2.5 se muestran el sitio múltiple de clonación del vector y el mapa del plásmido, respectivamente.

La mezcla se incubó a 4 °C toda la noche. Posterior a esto se procedió a la transformación empleando células competentes de la cepa DH-5 α (Anexo 10). Después de la transformación se seleccionaron las colonias blancas recombinantes. Estas colonias se picaron con palillos estériles y se colocaron para su crecimiento en 3 mL de medio LB líquido adicionado con 100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de amp. Estas se incubaron toda la noche a 37 °C con agitación. De estas colonias se hicieron las extracciones del ADN plasmídico (Anexo 11). Para su visualización se fraccionó una alícuota en un gel nativo de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

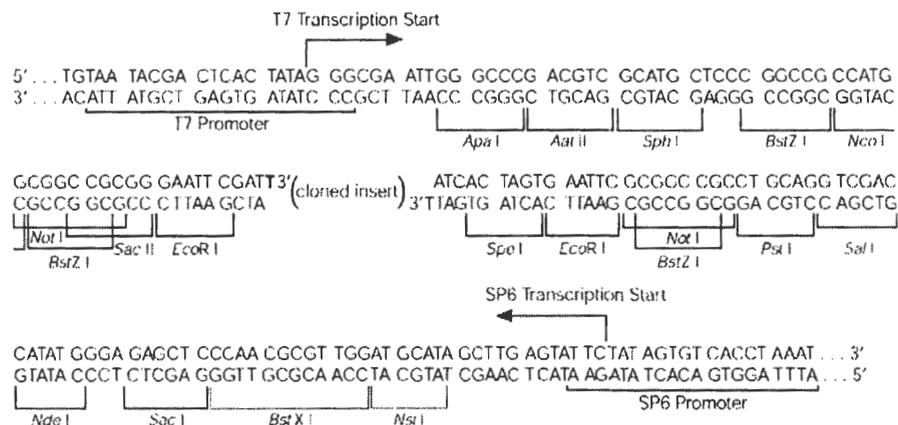


Figura 2.4. Sitio múltiple de clonación del vector pGEM-T Easy de la casa comercial PROMEGA.

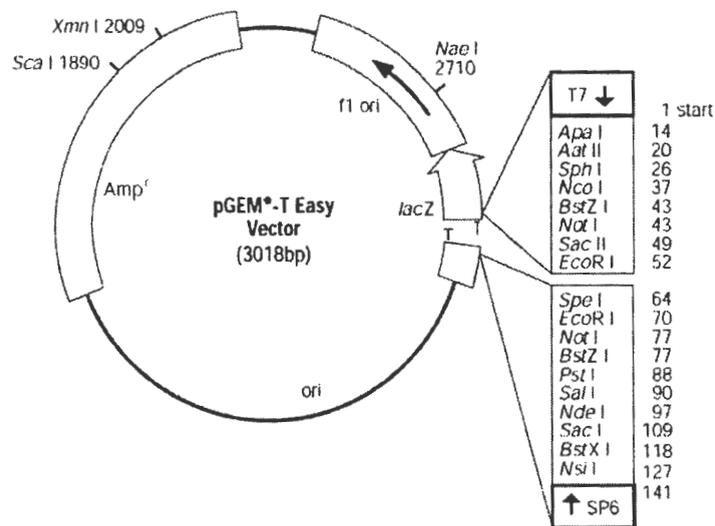


Figura 2.5. Mapa del plásmido pGEM-T-easy.

2.5.4.1 Verificación de la presencia del inserto

Una vez obtenido el ADN plasmídico, se verificó la presencia del fragmento mediante la restricción con alguna enzima que flanquee el sitio múltiple de clonación del vector, en este estudio se empleó la enzima *Eco RI*. Se verificó la presencia de los fragmentos en un gel nativo de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

2.5.4.2 Cuantificación de los plásmidos y análisis de las secuencias

La cuantificación de los plásmidos se realizó a una longitud de onda de 260 nm. Estos se mandaron a secuenciar a la Universidad de Davis en California. Las secuencias recibidas serán comparadas en bancos de datos de "National Center for Biotechnology Information" (NCBI) con el programa Blast para su identificación y análisis en la siguiente dirección electrónica: (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Recipon/bs_seq.html).

2.5.5 Verificación de la expresión diferencial

La verificación de la expresión diferencial puede realizarse por medio de Northern o por Northern reverso, usando como sonda los ADNc clonados a partir de las bandas cortadas del gel. Estos ADNc complementarios pueden marcarse por métodos radiactivos siguiendo protocolos establecidos (Sambrook *et al.*, 2001), o no radiactivos como la digoxigenina. A continuación se presenta un protocolo empleado para Northern blot. La verificación de la expresión diferencial se realizará mediante ensayos de hibridación Northern blot o por Northern blot reverso, como se describe a continuación: 10 µg de ARN aislados de plantas control (en recipientes ventilados) y de plantas tratamiento crecidas en recipientes sin ventilación, serán separados en un gel desnaturalizante de agarosa al 1% con formaldehído 0.5 M. Los ARN desnaturalizados serán transferidos a una membrana de nylon utilizando el método de transferencia por capilaridad en solución alcalina. Se hibridará utilizando como sondas a cada una de las clonas aisladas, marcadas con digoxigenina (DIG) y la sonda hibridada será detectada usando un anticuerpo anti-DIG acoplado a una fosfatasa alcalina. Posteriormente la hibridación positiva será revelada con el reactivo CSPD (Disodio 3-(4-metoxispiro{1,2-dioxetano -3,2- (5-cloro) triciclo [3.3.1.1^{3,7}] decan}-4-yl) fenilfosfato) como sustrato de quimioluminiscencia (Ryang *et al.*, 2002) y detectada con una película sensible a la fluorescencia.

2.6 BIBLIOGRAFÍA

- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single Step Method of RNA isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate Phenol-Chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
- Delta® Differential Display Kit de la casa comercial CLONTECH.
- Gómez-Uc, E. (2006). Clonación de genes expresados durante la inducción de sistemas de defensa en callos de *Cocos nucifera* L. tratados con quitosano. Tesis de Licenciatura, Instituto Tecnológico de Mérida. p.p. 83, Mérida, Yucatán, México.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Ryang, S. H, Chung, S. Y., Lee, S. H., Chan, J. S., Kim, H. Y., and Cho, T. J. (2002). Isolation of pathogen-induced Chinese cabbage by subtractive hybridization employing selective adaptor ligation. *Biochemical and biophysical research communication* 299: 352-359.
- Sambrook, J. y Russell, D. (2001), *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Santana-Buzzy *et al.*, (2005). Regeneration of Habanero Peper (*Capsicum chinense* Jacq.) Via Organogenesis. *HortScience* 40 (6): 1829-1831.
- Santana-Buzzy *et al.*, (2006). Improvement of *In vitro* Culturing of Habanero Pepper by inhibition of Ethylene Effects. *HortScience* 41 (2): 405-409.

CAPÍTULO III

Resultados y Discusión

3.1 ACUMULACIÓN DE ETILENO EN RSV Y RCV DURANTE EL DESARROLLO DE LAS PLÁNTULAS DE CHILE HABANERO *IN VITRO*.

Al analizar la dinámica de acumulación del etileno en recipientes sin ventilación (RSV) y con ventilación (RCV) (Fig. 3.1), durante el desarrollo de plántulas de chile Habanero *in vitro*, se pudo observar que en recipientes ventilados no se registró la presencia de este gas regulador. Sin embargo, en los recipientes sin ventilación, desde las primeras horas de cultivo, su contenido aumentó gradualmente hasta alcanzar un pico máximo el día 20 de cultivo, donde se registró $0.36 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$. A partir de este momento, el nivel del contenido de etileno disminuyó drásticamente hasta el día 24 ($0.12 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$) para mantenerse ligeramente por encima de este valor hasta el día 40 de cultivo.

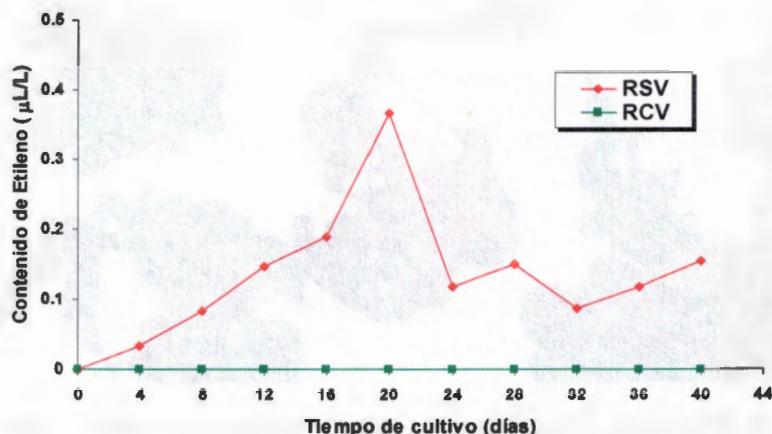


Figura 3.1. Producción de Etileno en RSV y RCV.

3.2 COMPORTAMIENTO DE LAS PLÁNTULAS DURANTE SU DESARROLLO EN RSV Y RCV

Como resultado del análisis de la respuesta de las plántulas de Chile Habanero, durante su desarrollo en recipientes ventilados y sin ventilar, se

pudo observar que la falta de ventilación y probablemente debido a la presencia de etileno, las plántulas manifestaron síntomas evidentes de senescencia, defoliación, maduración temprana, formación de callo en toda la superficie de la plántula (tallo y hojas), así como arrosetamiento de las hojas (Fig. 3.2). Estos resultados permiten corroborar lo reportado por Santana et al. (2005), quienes detectaron una alta sensibilidad de esta especie (*C. chinense*) al etileno concentrado en el recipiente, durante el cultivo *in vitro*.



Figura 3.2. Morfología de plántulas de chile Habanero cultivadas *in vitro* en recipientes sin ventilación (RSV). Se puede observar abscisión, senescencia, formación de callo, arrosetamiento de las hojas y floración temprana.

En la figura 3.3 se muestra el desarrollo diferenciado en ambas condiciones de cultivo, en diferentes momentos del cultivo, en RSV y RCV, donde se observa que desde los primeros momentos el etileno ejerce un efecto negativo sobre el comportamiento de las plántulas, reflejándose en un retraso en el desarrollo y un menor vigor, haciéndose más marcado a medida que está más tiempo expuesta la plántula a la condición estresante

(RSV). Esto permite inferir que el incremento del etileno en el recipiente de cultivo (Fig. 3.1) pudiera estar asociado con este comportamiento, resultando las plántulas en RSV las que menos desarrollo alcanzaron a los 28 días de cultivo.

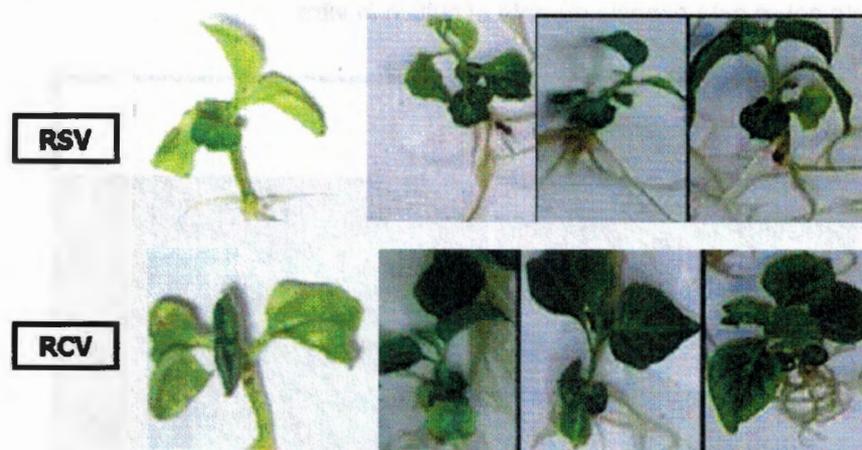


Figura 3.3. Plántulas de chile Habanero durante el cultivo in vitro. En RCV o en RSV en diferentes momentos de su desarrollo in vitro.

Como se pudo apreciar, la falta de ventilación del recipiente influyó notablemente en el crecimiento y el desarrollo de las plántulas. En el cuadro 3.1 se muestra que, tanto la altura de las plántulas como el número de hojas formadas fueron significativamente diferentes en ambos tratamientos (RCV y RSV), resultando menor tanto la altura (2.83cm vs 4.80cm) como el número de hojas formadas (6 vs 11) cuando las plántulas se desarrollaron en recipientes sin ventilación (RSV).

Cuadro 3.1. Comportamiento de la altura y el número de hojas formadas en plántulas cultivados en RSV y RCV.

Condición	Altura promedio de plantas (cm) \pm SE	No. de hojas \pm SE
RSV	2.83 \pm 0.11	6 \pm 0.52
RCV	4.80 \pm 0.42	11 \pm 0.63

(Tukey, $p < 0.05$).

En la Fig. 3.4 se muestra el desarrollo contrastante de las plántulas de chile Habanero mantenidas en recipientes sin ventilación (RSV) y en recipientes

con ventilación (RCV) en ambas condiciones (RCV y RSV). No sólo la altura y el número de hojas formadas de las plántulas, mostraron un comportamiento diferenciado. El desarrollo propiamente de las hojas, el grosor del tallo, así como el color y el vigor de toda la parte aérea de la planta, permitieron apreciar el efecto negativo de la falta de ventilación del recipiente sobre esta especie durante el cultivo *in vitro*.

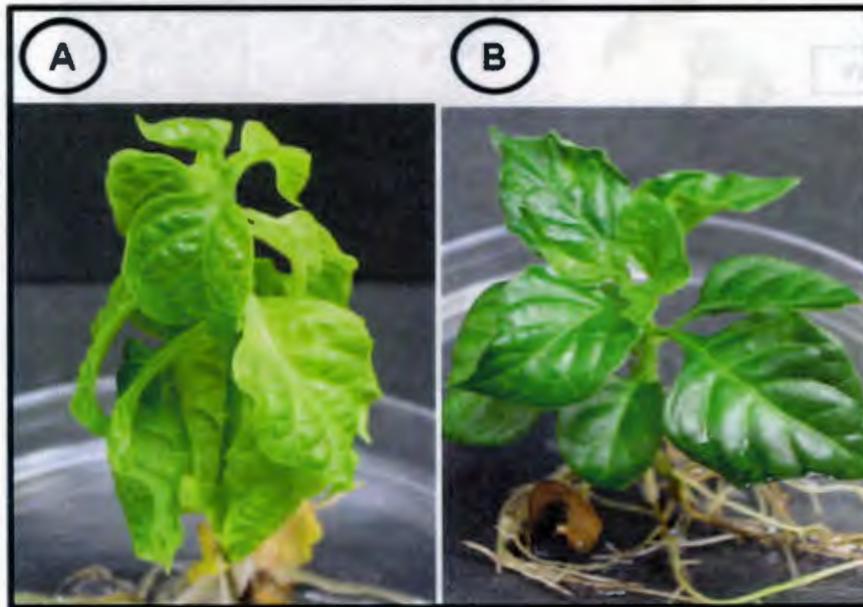


Figura 3.4. Desarrollo contrastante de las plántulas de chile Habanero. Plantas de chile Habanero fueron cultivadas en A: recipientes sin ventilación (RSV), o en B: recipientes con ventilación (RCV).

Mediante un análisis de conglomerado, tomando en cuenta la altura de las plántulas y el número de hojas formadas en ambas condiciones de cultivo (RCV y RSV), se pudo apreciar la formación de dos grupos bien diferenciados. El Grupo I estuvo representado por plantas en general (77.3%) provenientes de recipiente sin ventilación (RSV), mientras que el grupo II estuvo constituido por plantas (88.8%) provenientes de recipientes con ventilación RCV, lo que permite inferir que las condiciones de cultivo influyen notablemente en el desarrollo de las plantas, durante el cultivo *in vitro*.

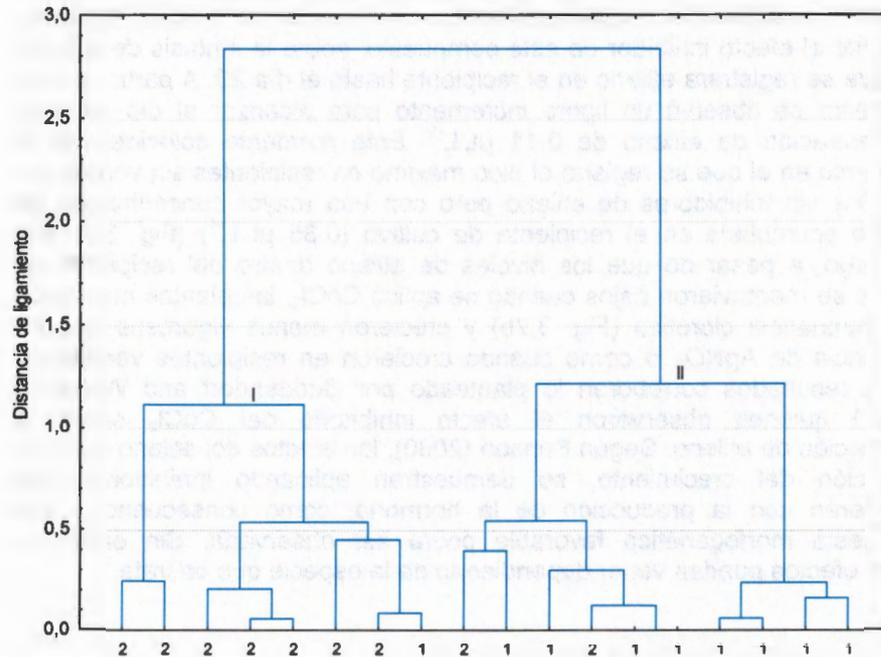


Figura 3.5. Dendrograma del análisis de conglomerado. Dendrograma realizado empleando la distancia euclidiana y ligamiento completo a las variables longitud y número de hojas.

3.3 EFECTO DEL NITRATO DE PLATA (AgNO_3) Y EL CLORURO DE COBALTO (CoCl_2) SOBRE LA RESPUESTA DE LAS PLÁNTULAS DE CHILE HABANERO EN RECIPIENTES SIN VENTILACIÓN

Como se puede observar en la Figura 3.6, en recipientes ventilados (RCV) no se registró contenido de etileno, mientras que en recipientes sin ventilación (RSV) aún con inhibidores de etileno en el medio de cultivo, se registró la presencia de este gas regulador en la atmósfera interna del recipiente de cultivo. Cuando se utilizó AgNO_3 , como se puede apreciar, la producción de etileno comenzó a registrarse aproximadamente a partir del día 8 del cultivo, y su acumulación se dio de manera gradual, hasta alcanzar un pico máximo ($1.09 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$) ubicado entre los días 30-34 del cultivo. Después de ese día la concentración de etileno comenzó a disminuir. Sin embargo, las plántulas nunca mostraron síntomas de estar en presencia de etileno (Foto 3.7a). Este comportamiento permite inferir que el AgNO_3 está

actuando directamente sobre los receptores de etileno en la planta, haciendo que esta no cense su presencia en el ambiente que la rodea. Mientras que con la adición de CoCl_2 en el medio de cultivo, se pudo apreciar el efecto inhibitorio de este compuesto, sobre la síntesis de etileno, sin que se registrara etileno en el recipiente hasta el día 20. A partir de este momento se observó un ligero incremento para alcanzar el día 24, una concentración de etileno de $0.11 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$. Este momento coincide con el momento en el que se registró el pico máximo en recipientes sin ventilación (RSV) y sin inhibidores de etileno pero con una mayor concentración de etileno acumulada en el recipiente de cultivo ($0.36 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$) (Fig. 3.1). Sin embargo, a pesar de que los niveles de etileno dentro del recipiente de cultivo se mantuvieron bajos cuando se aplicó CoCl_2 , las plantas mostraron una apariencia clorótica (Fig. 3.7b) y crecieron menos vigorosas que en presencia de AgNO_3 , o como cuando crecieron en recipientes ventilados. Estos resultados corroboran lo planteado por Buddendorf and Woltering (1994) quienes observaron el efecto inhibitorio del CoCl_2 sobre la producción de etileno. Según Benson (2000), los efectos del etileno sobre la inhibición del crecimiento, se demuestran aplicando inhibidores que interfieran con la producción de la hormona; como consecuencia, una respuesta morfogénica favorable podrá ser observada. Sin embargo, estos efectos pueden variar dependiendo de la especie que se trate.

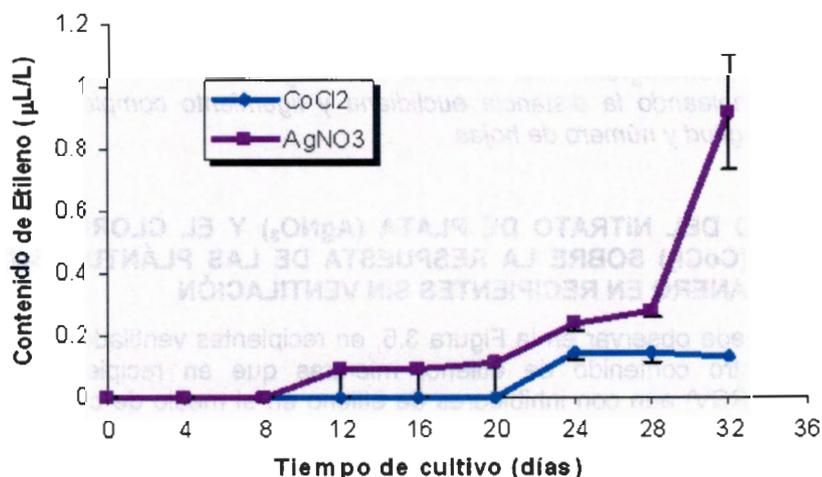


Figura 3.6. Comportamiento del contenido de etileno. El contenido de etileno en la micro-atmósfera de los recipientes, en presencia de un inhibidor de la síntesis de etileno (CoCl_2) o de un inhibidor del receptor de etileno (AgNO_3) fue medida por cromatografía. Las barras verticales representan $\mu \pm \text{ES}$ ($n=3$).

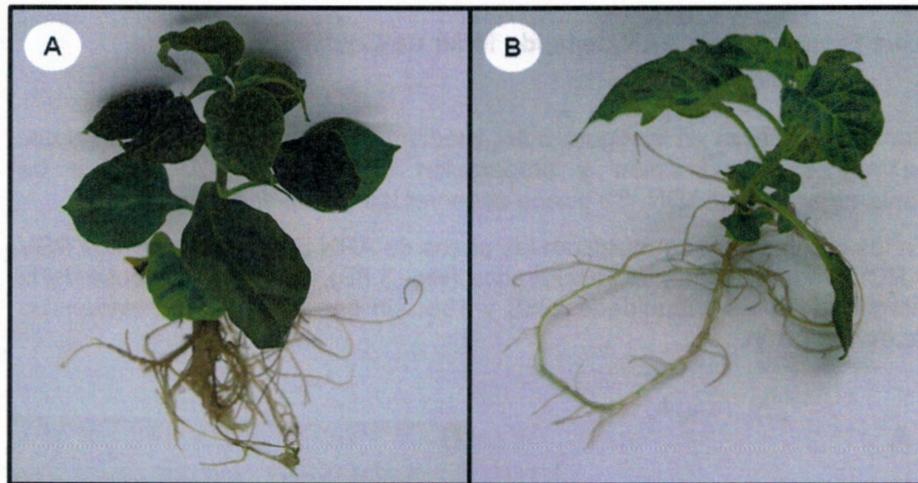


Figura 3.7. Plantas de *Capsicum chinense* cultivadas en presencia de inhibidores. Las plantas fueron cultivadas en RSV con medio MS suplementado con AgNO_3 (A) y CoCl_2 (B). En el tratamiento con CoCl_2 puede observarse la presencia de callo en las hojas, clorosis y una menor cantidad de raíces.

3.4 ANÁLISIS MOLECULARES

3.4.1 Extracción de ARN de tejido foliar de *Capsicum chinense*.

Como se observa en la Figura 3.8A, mediante el ajuste de las condiciones, se realizó la extracción y preparación eficientes de ARN, libre de contaminación por ADN. Se puede observar las subunidades íntegras.

En los carriles I y II se muestran las pozas de ARN de los tratamientos RSV y RCV, respectivamente fraccionadas (Fig. 3.8B), asimismo se observa la integridad de las subunidades 28S y 18S, sin que se observen evidencias de degradación.

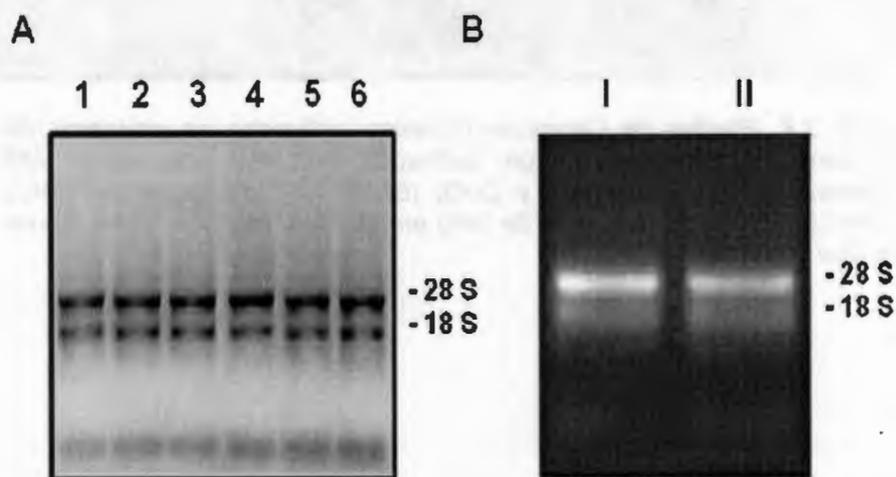


Figura 3.8. ARN de Chile Habanero a partir de tejido foliar. Muestras de dos microlitros de ARN extraído de diferentes muestras fueron fraccionados por electroforesis nativa en un gel nativo de agarosa al 1.4%, teñido con $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. A: ARN de los diferentes días de cultivo; B: Pozas de ARN de I: RSV y II: RCV. 28S y 18S denotan la posición de los ARN de las subunidades ribosomales.

3.4.2 Amplificación de los ADN complementarios

Para la amplificación, se sintetizó ADNc de primera cadena. En la figura 3.9 se muestra el ADNc cuyo tamaño indica que existen mensajeros de tamaños diversos, puesto que el ADNc se observa por encima de los 12000 pb., sin embargo, la mayor concentración de las poblaciones de mensajeros fue localizada entre 300 y 1000 pb.

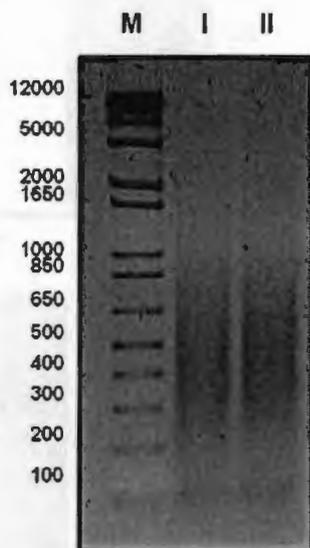


Figura 3.9. Síntesis del ADNc. Muestras de siete microlitros de ADN complementario fueron fraccionadas por electroforesis en un gel nativo de agarosa al 1%, teñido con $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. I: RSV; II: RCV; M: escalera de ADN (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen).

El ADNc sintetizado y amplificado empleando distintas combinaciones de cebadores se muestra en la figura 3.10. Como se puede observar, en las poblaciones de mensajeros amplificadas, los patrones entre el tratamiento RSV y el control RCV son diferentes en cuanto a la intensidad de las bandas, lo cual supone una diferencia en sus concentraciones. Como se aprecia, las distintas combinaciones de cebadores amplificaron poblaciones de mensajeros de diferentes tamaños. Esto permite inferir que cada par de cebadores amplificó una región diferente del ADNc. Sin embargo, cabe señalar que los geles de agarosa son indicativos ya que no favorecen la resolución de las bandas, por lo que normalmente se utiliza geles de acrilamida para visualizar un mejor despliegue de las bandas presentes.

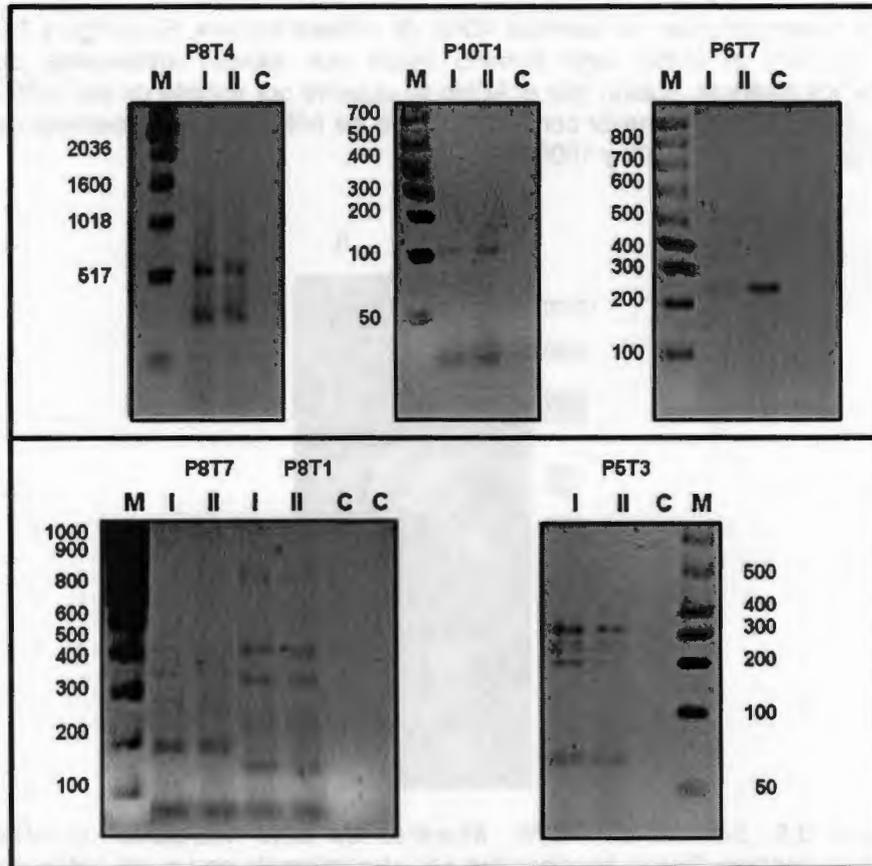


Figura 3.10. Productos del Despliegue diferencial obtenidos con diferentes combinaciones de cebadores. Cinco microlitros de los productos de PCR fueron fraccionados por electroforesis en un gel nativo de agarosa al 3%, teñido con $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. M: escalera de ADN (1 Kb Plus DNA Ladder de Invitrogen, para P8T4; 100 pb DNA Ladder de Invitrogen, para todas las demás combinaciones); I): RSV; II): RCV; C): Control.

3.4.3 Fraccionamiento de los productos en geles de poliacrilamida al 6%

Los productos visualizados previamente en agarosa al 3%, fueron fraccionados en geles de poliacrilamida al 6%. Después de usar 30 combinaciones de los cebadores arbitrarios, se pudo observar que las diferencias en el perfil de expresión entre los tratamientos se manifestaron con respecto, a la intensidad y a la presencia o ausencia de estas. La diferencia se detectó por la intensidad de algunas bandas (Fig. 3.11), en la combinación P8T1, el patrón de expresión permitió observar bandas características del tratamiento RSV (1) que se encuentran modificadas con respecto al tratamiento RCV (2). La banda A de aproximadamente 1200 pb se encuentra aumentada en su expresión en el tratamiento RSV (1) con respecto al tratamiento RCV (2). En esta misma combinación la banda B de aproximadamente 750 pb, se encuentra disminuida en su expresión en el tratamiento RSV (1) con respecto al tratamiento RCV (2).

En la combinación P8T7, la banda E de aproximadamente 250 pb, se encuentra aumentada en su expresión en el tratamiento RSV (3) con respecto al tratamiento RCV (4) y la banda F disminuyó su expresión en el tratamiento RSV (3) con respecto al tratamiento RCV (4). Las bandas cuya intensidad era mayor o menor que la del grupo con el que se le comparaba se consideraron como aumentadas o disminuidas en su expresión, respectivamente.

Con respecto a la presencia o ausencia de las bandas en el tratamiento, la banda C del tratamiento RCV (2), solo se encontró en este tipo de tratamiento, lo que nos indica que hubo bandas que se reprimieron con respecto a los tratamientos RSV (1). Asimismo, la banda D, se encontró presente solo para el tratamiento RSV (3), no así para el tratamiento RCV (4). Las bandas que no se presentaron en una u otra condición se consideraron como reprimidas o expresadas. Otras bandas diferenciales (marcadas con flechas) igualmente evidenciaron que los cambios en los patrones de expresión fueron debidos a la condición de cultivo al que fueron sometidos. Estas bandas fueron seleccionadas para su posterior análisis. Estos hallazgos indican que los perfiles de expresión pueden identificarse con base en la comparación de la presencia o ausencia de las bandas y en las intensidades de su expresión.

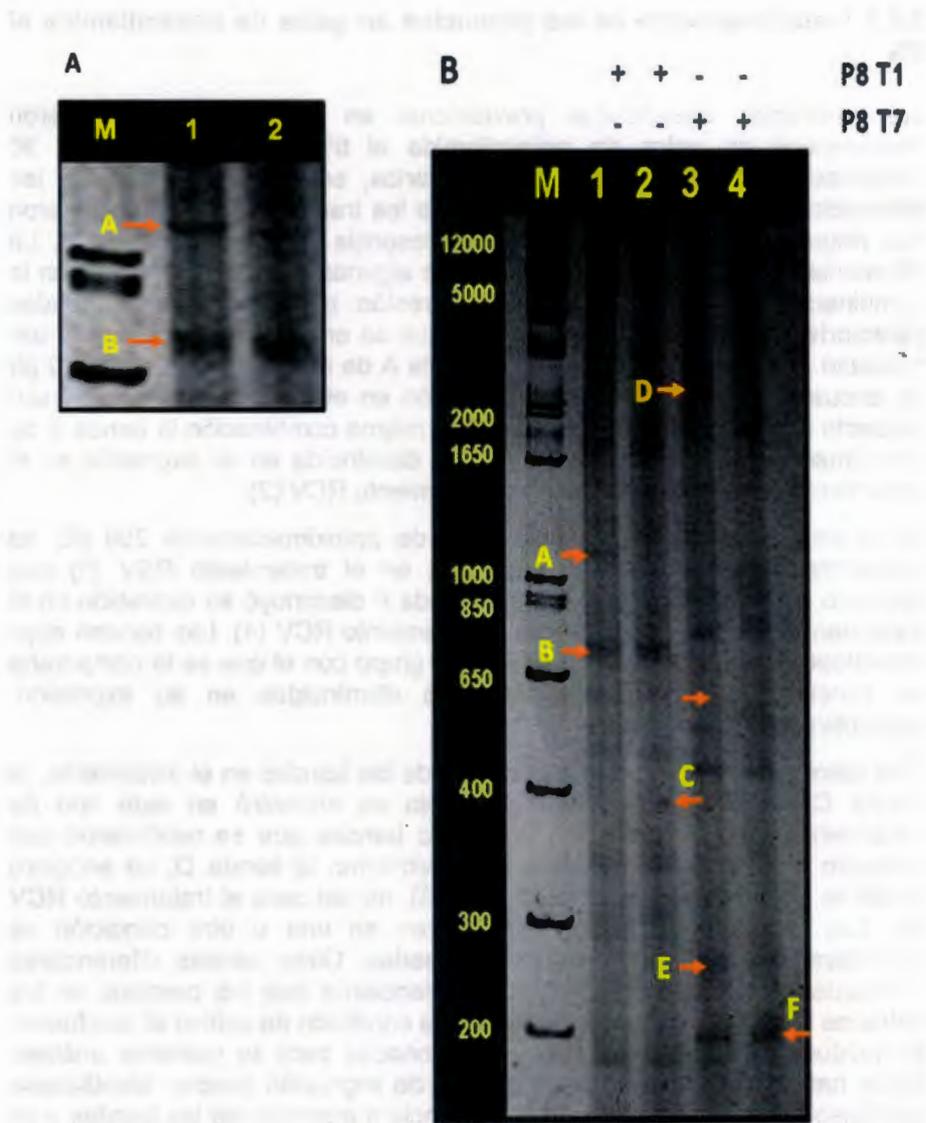


Figura 3.11. Fraccionamiento de las poblaciones de ADN complementarios. Muestras de siete microlitros de los productos de PCR fueron fraccionadas por electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida conteniendo urea, a 2000 V por 3 hrs. M: 1 μ L de 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); C: Control, cebadores sin ADNc. T: Tratamientos 1 y 3) RSV y 2 y 4) RCV. A. Acercamiento del gel (Bandas A y B, en amarillo) y B. Gel completo con bandas señaladas. Bandas diferenciales señaladas con flechas naranjas.

Para la posterior clonación de las muestras, se aislaron del gel las bandas diferenciales y se reamplificaron bajo las mismas condiciones del PCR original. Del total de bandas seleccionadas, pudieron reamplificarse siete bandas, cuyos tamaños variaron entre 300-500 pb, como se observa en la figura 3.12.

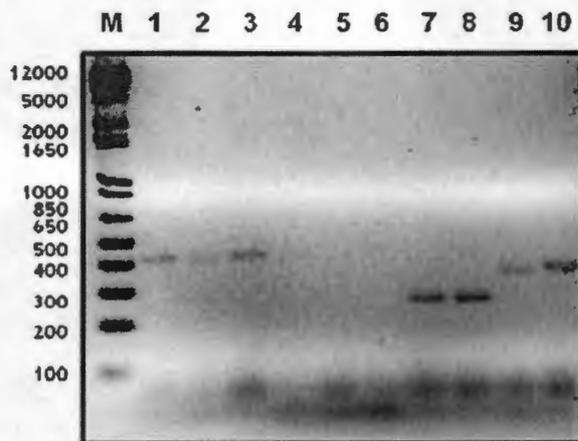


Figura 3.12. Reamplificación de bandas “diferenciales”. Muestras de cinco microlitros de los productos de PCR fueron fraccionadas por electroforesis en gel nativo de agarosa al 3%, teñido con $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. Carriles 1-10: Productos obtenidos a partir de diferentes bandas de ADN complementario extraído del gel de poliacrilamida; M: escalera de ADN (1 Kb plus Invitrogen).

Los resultados muestran que de las 10 bandas seleccionadas originalmente y que fueron extraídas del gel de poliacrilamida, solamente siete se lograron reamplificar. Cinco de ellas corresponden al tratamiento (RSV) y dos al control (RCV).

Como siguiente paso para su clonación, los productos reamplificados fueron ligados en el vector pGEM-T-Easy® y los plásmidos recombinantes fueron empleados para transformar células de la cepa DH5- α de *Escherichia coli*.

En la figura 3.13 se muestra el resultado del proceso de la clonación.

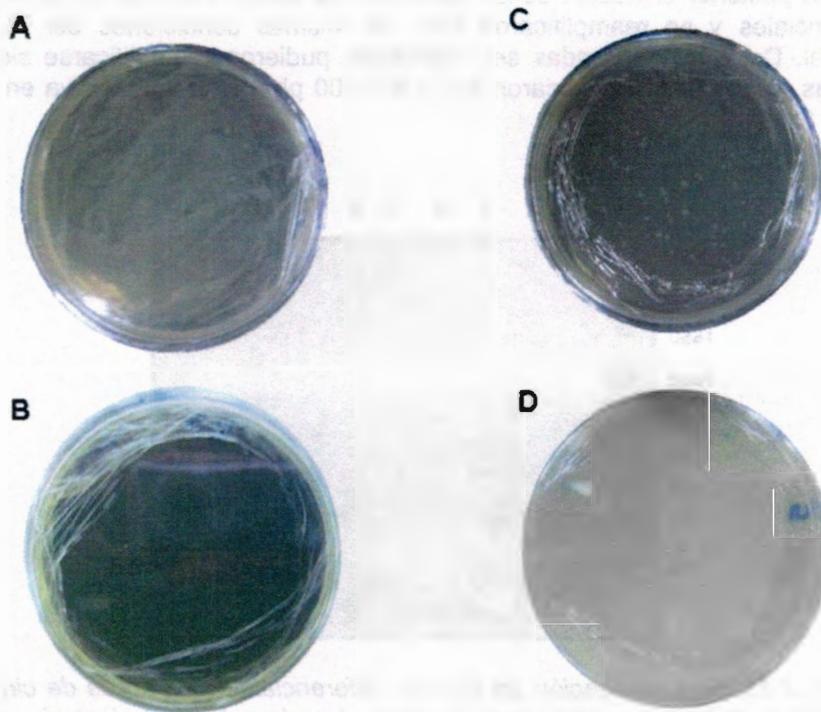


Figura 3.13. Transformación bacteriana con los plásmidos recombinantes. Bacterias de la cepa *DH5 α* fueron transformadas por choque térmico y sembradas masivamente a 37 °C en medio LB sólido conteniendo un antibiótico de selección. A: bacterias silvestres en medio sin antibiótico; B: control bacterias silvestres en medio con antibiótico; C y D: bacterias transformadas en medio con antibiótico (Ampicilina).

3.4.4 Aislamiento del ADN plasmídico

El aislamiento de los plásmidos recombinantes se realizó como se describe en el anexo 11. La presencia de plásmidos en los extractos fue verificada fraccionando una alícuota por electroforesis nativa en un gel nativo de agarosa al 1% teñido con 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. En la figura 3.14 se muestra un ejemplo del fraccionamiento electroforético de diferentes aislados plasmídicos.



Figura 3.14. Aislamiento de plásmidos recombinantes. Una alícuota de los plásmidos aislados mediante lisis alcalina fue fraccionada por electroforesis en gel nativo de agarosa al 1%, teñido con $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. Carriles 1-3: plásmidos correspondientes a diferentes clonas recombinantes; M: escalera de ADN (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen).

3.4.5 Corroboración de la presencia de insertos en los plásmidos recombinantes

Para demostrar que los plásmidos aislados tuvieran inserto, se realizó un corte con la enzima de restricción *Eco* RI, la cual flanquea ambos lados en el sitio múltiple de clonación del vector y que permite liberar el fragmento.

Como puede observarse en la figura 3.15, en algunos plásmidos se logró escindir claramente el inserto, el cual correspondió en cada caso al tamaño esperado (carriles 1, 2, 7, 8 y 9); sin embargo, en otros casos no se logró escindir el inserto o éste no se observó nítidamente (carriles 3, 4, 5 y 6).

Los plásmidos de los que se liberó un inserto fueron enviados para su secuenciación a la empresa "Davis Sequencing" en California, las secuencias recibidas se compararon con bancos de datos empleando el programa Blast de la agencia "National Center of Biotechnology Information", desplegado en Internet con la siguiente dirección: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

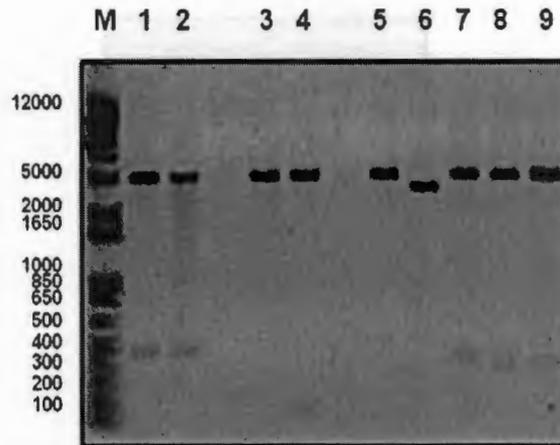


Figura 3.15. Liberación de insertos. Una alícuota de los productos de la digestión con la enzima *Eco RI* fue fraccionada por electroforesis en un gel nativo de agarosa al 1% teñido con $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. Carriles 1 a 9: productos de digestión de diferentes plásmidos aislados; M: escalera de ADN (1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen).

3.4.6 Resultado de la secuenciación

Se enviaron seis clonas de ADN complementario para su secuenciación. De las secuencias entregadas por Davis Sequencing, se obtuvo la secuencia deducida de aminoácidos y ambas fueron comparadas con bases de datos. Los resultados mostraron que tres secuencias no presentaron identidad con secuencias de aminoácidos reportadas (GenBank, EMBL, etc.) y tres de ellas sí presentaron niveles altos de identidad con secuencias reportadas.

Estas tres secuencias se presentan a continuación, para una de ellas se encontró altos niveles de identidad con la subunidad epsilon de una ATP sintasa.

Debido a que en este estudio se analizó los genes presentes en los diferentes tratamientos, se analizaron las secuencias y se tomaron las clonas 10.1 E, 8.1 E y 6.1 E como ejemplo para hacer un análisis comparativo con bancos de datos y así conocer su identidad. Las secuencias 9.1 E y 11.1 E no tuvieron similitud con ninguna secuencia reportada en los bancos de datos. Estos análisis se muestran a continuación.

CLONA 9.1 E

Secuencia de nucleótidos (385 pb)

CATTATGCTG	AGTGATATCT	TTTTTTTTGA	TTTGAAGTAG	GAGTGTGAAA
GAGTATTTGC	TTAAGTTTAC	TTAGTTGGAA	AGGTATCCTT	CTTTAATGGT
AGCTGATAAT	AGATCTAGAA	TGAGTAGGTT	TGTTTCTGGT	AAAGCTGATA
GTGTGGTCAA	AGATTGTATT	ACTGCTATGC	TTATTAAAGA	GATGGATATA
TCTAGGCTTA	TGGTCCATGC	TCAGCAGATT	GAAGAGCAA	AGCTTAAGGA
GAAAGAGAGC	GATAGAGAGA	ATAAGAGGGA	TAGAATAGGT	AGCTTTAATT
TTTCTCAGCC	TAGGTTAGAT	GGTGGTAATA	GTTCTCAGTT	CCATCAGAAA
TCTTTGTCCC	CAGCTCCATT	TAGTGAGGGT	TAATA	

Secuencia deducida de aminoácidos (127 aa)

LTLTKWSWGQ	RFLMELRTIT	TIXPRLRKIK	ATYSIPLILS	IALFLLKLLL
FNLLSMDHKP	RYIHLFNKHS	SNTIFDHTIS	FTRNKPTHRS	SIISYHXRRR
PFQLSKLKQI	LFHTPTSNOK	KRYHSAX		

CLONA 11.1 E

Secuencia de nucleótidos (349 pb)

ATTAACCCCTC	ACTAAATGCT	GGGTGGATTG	GTGGTCTGCT	AGGCAAACCTG
TGTGAGAAAC	AGGGAATATC	TTATGAGTAT	GGAAGGGGAC	GTCTAGAGGA
TCGCTCACTA	CTTTTGGCAG	ATATTCATGC	TGTGAAGCCT	ACACATGTAT
TCAATGCTGC	TGGTGTCACT	GGTAGACCTA	ACGTTGATTG	GTGTGAGAGT
CATAAGACTG	AAACAATTCTG	TACAAATGTT	GCTGGAACCTC	TAAACTTGCC
AGATGTTTTGT	AAAGAGCACG	GTTTACTGAT	GATGAATTTT	GCAACTGGTT
GCATATTTGA	ATATGATGCT	GCACACCAG	CATTTAGTGA	GGGTTAATA

Secuencia deducida de aminoácidos (115 aa)

XPSLNAGWIG	GLLGKLCCKQ	GISYEGRGR	LEDRSLLLAD	IHAVKPTHVF
NAAGVTGRPN	VDWCESHKTE	TIRTNVAGTL	NLADVCKEHG	LLMMNFATGC
IFEYDAAHPA	FSEGX			

Las secuencias 9.1 E y 11.1 E no tuvieron similitud con ninguna secuencia reportada en los bancos de datos.

CLONA 10.1 E

Secuencia de nucleótidos (348 pb)

ATTAACCCCTC ACTAAATGCT GGGTGGATTG GTGGTCTGCT AGGCAAACCTG
 TGTGAGAAAC AGGGAATATC TTATGAGTAT GGAAGGGGAC GTCTAGAGGA
 TCGCTCACTA CTTTTGGCAG ATATTCATGC TGTGAAGCCT ACACATGTAT
 TCAATGCTGC TGGTGTCACT GGTAGACCTA ACGTTGATTG GTGTGAGAGT
 CATAAGACTG AAACAATTCTG TACAAAATGTT GCTGGAACTC TAAACTTGGC
 AGATGTTTGT AAAGAGCACG GTTTACTGAT GATGAATTTT GCAACTGGTT
 GCATATTTGA ATATGATGCT GCACACCCAG CATTTAGTGA GGGTTAATA

Secuencia deducida de aminoácidos (115 aa)

XPSLNAGWIG GLLGKLCEKQ GISYEYGRGR LEDRSLLLAD IHAVKPTHVF
 NAAGVTGRPN VDWCESHKTE TIRTNVAGTL NLADVCKEHG LLMMNFATGC
 IFEYDAAHPA FSEGX

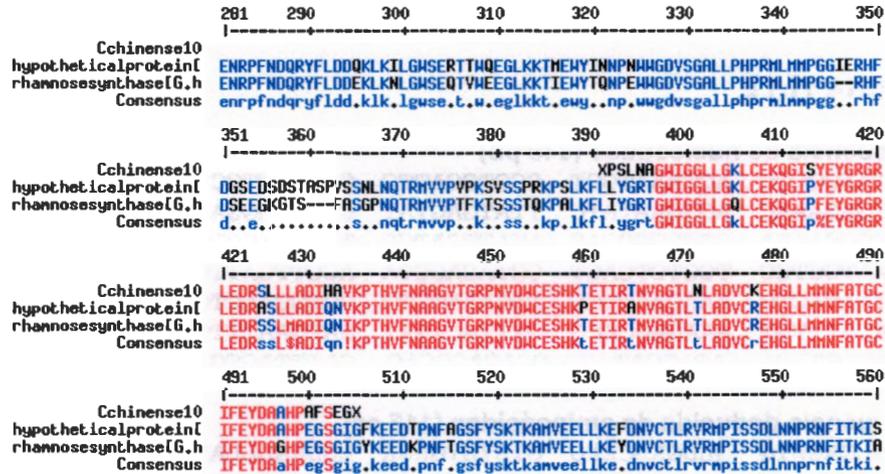


Figura 3.16. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos (aa) de la clona 10.1 E. La secuencia deducida de aminoácidos se alineó con secuencias de especies diferentes tanto de la misma familia como de otras. Los residuos idénticos se muestran en rojo y los residuos conservados en azul.

La secuencia deducida de aminoácidos de la clona 10.1 tuvo una identidad de más del 90% con la secuencia de una proteína hipotética de *Vitis vinifera*, de la cual se desconoce su función y con la secuencia de una proteína denominada ramnosa sintasa, la cual está involucrada en la síntesis de ramnosa, un monosacárido componente estructural de la pared celular (Showalter, 1993).

CLONA 8.1 E

Secuencia nucleotídica (256 pb)

ATTAACCCCTC ACTAAATGCT GGGTGACAAA AACTAGCTTC TGGTCGGGCC
 GTTGGTGAAA GAAAGCAATT AACTTCTGAC AAGCTGATAC AATAACATCT
 TCTGATTATC CTGTTCTTAA AGATGATACT AACTTGCTGA ATTCTACAGC
 CTGAAGGTGA AACAGATTTT CTGTCGGTAA TTTATCATCG AAGCCTAAAC
 CATCCATGTC TATTACATCC TCCTTCAACA CACCCAGCAT TTAGTGAGGG
 TTAATA

Secuencia deducida de aminoácidos (85 aa)

INPHXMLGVL KEDVIDMDGL GFDDKLPTEN LFHLQAVEFS KLVSSLRTDE
 SEDVIVSACQ KLIAFFHQRP DQKLVFVTQH LVRVN

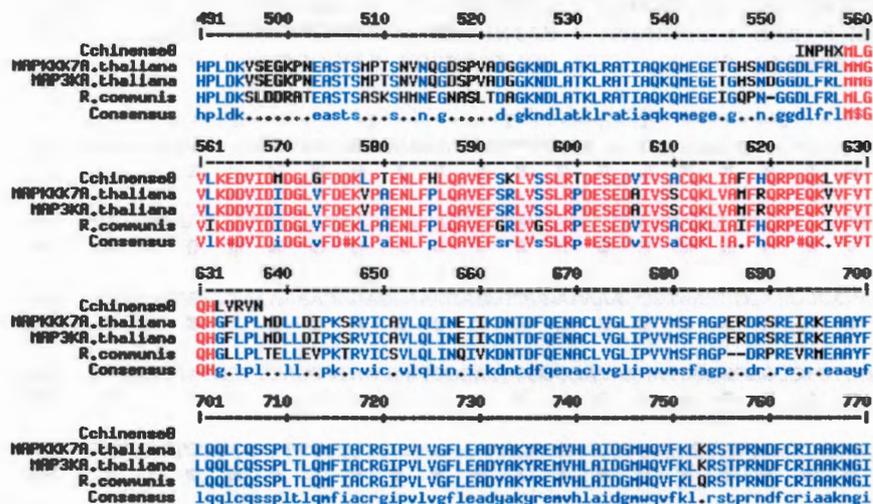


Figura 3.17. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la clona 8.1 E. La secuencia deducida de aminoácidos se alineó con secuencias de otras especies. Los residuos idénticos se muestran en rojo y los residuos conservados en azul.

Esta secuencia deducida de aa tuvo una identidad de más del 90% con la secuencia de una MAPKKK7 de *Arabidopsis thaliana* (MAPKKK7; ATPbinding/binding/kinase/proteinkinase/proteins(er)ine/threoninekinase/prot(eo)intyrosinekinase[*Arabidopsisthaliana*]). Esta proteína es parte de la cascada de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKK, por sus siglas en inglés). Esta cascada transduce señales de diferente naturaleza, desde señales de estrés, hormonales (incluyendo al etileno), pero no es específica del estrés producido por este gas regulador.

CLONA 6.1 E

Secuencia nucleotídica (425 pb)

ATTAACCCCTC ACTAAATGCT GGGTGGTTTT GCTAGAATAG GCAATAATGA
 GATCACTGTT TTAGTAAATG ATGCGGAGAA GGGTAGTGAC ATTGATCCAC
 AAGAAGCTCA GCAAACCTCTT GAAATAGCGG AGGCTAATGT GAAAAAGGCT
 GAAGGAAGGA GACAAAAAAT TGAGGCAAAT CTAGCTCTCC GACGAGCTAG
 AACACGGGTG GAGGCTATCA ATCCGATTTT ATAAGTAGTT AGTACGACTA
 GTTAGTACGT TCGAATAATA AAAAGAAGTT CTCTTTCTAA TCCTATTTAG
 ATTCGTGTCG GTGAATACAA TCAAATACAA TCAAACAGAA GCCAATTCTG
 ATGCAAAAAT TCAAATTTAA AAATGAAATA GAAAAGATAC AAAATCAAAA
 AAAAAGATAT CACTCAGCAT AATGA

Secuencia deducida de aminoácidos (141 aa)

INPH**X**MLGGF ARIGNNEITV LVNDAEKGS IDPQEAQQTLEIAEANVKKA
 EGRR**Q**KIEAN LALRRARTRV EAINPIS**X**LV STTS**X**YVR II KRSSLSNPI**X**
 ILSGEYNQIQ SNRSQ**F**XCKN SNLKM**K**KRY KIKKKDITQH N

I-----I-----I-----I-----I-----I-----I	
ATTAACCCCTCACTAAATGCTGGGTGGTTTTGCTAGAATAGGCAATAATGAGATCACTGTT	60
I N P H X M L G G F A R I G N N E I T V	20
TTAGTAAATGATGCGGAGAAAGGGTAGTGACATTGATCCACAAGAAGCTCAGCAAACTCTT	120
L V N D A E K G S D I D P Q E A Q Q T L	40
GAAATAGCGGAGGCTAATGTGAAAAAGGCTGAAGGAAGGAGACAAAAAATGAGGCAAAT	180
E I A E A N V K K A E G R R Q K I E A N	60
CTAGCTCTCCGACGAGCTAGAACACGGGTGGAGGCTATCAATCCGATTTTCATAACTAGTT	240
L A L R R A R T R V E A I N P I S X L V	80
AGTACGACTAGTTAGTACGTTTCGAATAATAAAAAGAAGTTCTCTTTCTAATCCTATTTAG	300
S T T S X Y V R I I K R S S L S N P I X	100
ATTCTGTGCGGTGAATACAATCAAATACAATCAAACAGAAGCCAATTTCTGATGCAAAAAT	360
I L S G E Y N Q I Q S N R S Q F X C K N	120
TCAAATTTAAAAAT GAAATAG AAAAGATACAAAATCAAAAAAAGATATCACTCAGCAT	420
S N L K M K X K R Y K I K K K D I T Q H	140
AATGA	425
N	141

Figura 3.18. Análisis de la secuencia deducida de aa de la clona 6.1 E. La secuencia deducida de aa se muestra en negritas. Enmarcada y en negritas se destaca una secuencia que podría corresponder a la señal de poliadenilación (ATGAAA). Los dos nucleótidos del sitio de inicio de la poliadenilación se muestran subrayados y en negritas (CA). Para fines ilustrativos, se muestra un tramo de la cola de poliadenilación.

idénticos se muestran en rojo y los residuos conservados en azul. N. tabacum EMBL NP_054505.1; *S. tuberosum* EMBL YP_514858.1; *S. lycopersicum* EMBL YP_514858.1; y *P. veitchii* EMBL CAD22880.1.

Como ya se mencionó, la búsqueda de similitud de la clona 6.1 E con otras secuencias reportadas en bases de datos disponibles (GenBank, EMBL) vía BLAST reveló una identidad de mas del 90% con secuencias reportadas, las cuales codifican la subunidad epsilon de la enzima ATP sintasa (número de acceso al GenBank NP_054505.1), sugiriendo que las plantas de Habanero expresan este gen. Con base en esta comparación y el alineamiento de las secuencias de la clona 6.1 E, podemos sugerir que esta clona corresponde a un segmento de la subunidad epsilon de una ATP sintasa de *Capsicum chinense* Jacq., existen varias proteínas ATP sintasas, las cuales se encargan de producir ATP como molécula energética empleada en múltiples reacciones, por lo que el despliegue diferencial ha demostrado ser una técnica que permite la detección de genes que no han sido reportados para la especie de estudio *Capsicum chinense*. Al analizar la expresión diferencial se observó la alteración en el patrón de bandas, algunas veces reguladas positiva y otras negativamente.

A pesar de que se han logrado avances significativos acerca de la elucidación de los mecanismos que intervienen en la percepción de etileno y la transducción de su señal (Bleecker y Schaller, 1996), la identificación y la función de los genes regulados por el etileno son importantes para una mejor comprensión del papel de esta hormona en procesos fisiológicos. Estudios previos han llevado al aislamiento de un número de genes regulados por el etileno a través de técnicas de detección diferencial (revisadas en Deikman, 1997). Por ejemplo, un conjunto de genes, incluyendo inhibidores de Proteasas, E4 y E8 fueron aislados con la detección sistemática de frutas de tomate verde maduras tratadas con etileno (Lincoln *et al.*, 1987). Mediante el uso del despliegue diferencial de ARNm (Zegzouti *et al.*, 1997) aislaron 19 genes responsivos a etileno en tomates verdes inmaduros incluyendo reguladores.

Los elementos en la ruta de defensa biótica y abiótica son cascadas de señalización en las que intervienen cascadas de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y grupos de factores de transcripción responsivos a estrés, que son también reguladores centrales de diversos procesos bioquímicos y moleculares en las células, tales como el crecimiento, la inhibición y el estrés (León *et al.*, 2001; Pieterse *et al.*, 2001; Thomashow, 2001).

La morfología y la distribución de los síntomas de estrés abióticos y bióticos visibles en partes de la planta, como las hojas y las ramas, proporcionan una indicación de diagnóstico primaria para comprobar el tipo de estrés y

las respuestas de la planta, así como para diferenciar los síntomas de estrés de los síntomas de senescencia natural (Vollenweider & Gunthardt-Goerg, 2005). Como resultado del presente estudio, hemos identificado un fragmento correspondiente a una ATP sintasa CF1 epsilon unit, que se expresa en las condiciones en las que el etileno estuvo presente, por lo que probablemente está muy relacionado con el estrés producido durante el cultivo *in vitro* en la ausencia de ventilación, para esta especie.

Estos resultados pueden ser útiles para identificar genes expresados en términos de estrés producido por etileno y su posible relación con la recalcitrancia del género *Capsicum* a la regeneración *in vitro*.

3.5 BIBLIOGRAFÍA

- Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B., Dineshkumar S. P. (1997). Signaling in Plant-Microbe Interaction. *Science*. 276: 726-733.
- Benson, E. (2000). Special Symposium: *In vitro* plant recalcitrance, *In vitro* plant recalcitrance: An introduction. *In vitro* Cell. Dev. Biol.-Plant 36:141–148.
- Bleecker, A. B. and Schaller, G. E. (1996). The Mechanism of Ethylene Perception. *Plant Physiol.* 111, 653–660.
- Buddendorf-Joosten, J. M. C and Woltering, E. J. (1994). Components of the gaseous environment and their affects on plant growth and development in vitro. *Plant Growth Regulation*, v.15, p.1-16.
- Deikman, J. (1997). Molecular mechanisms of ethylene regulation of gene expression. *Physiol. Plant.* 100:561-566.
- Leon, J., Rojo, E., and Sánchez-Serrano, J. J. (2001). Wound signaling in plants. *Journal Exp. Bot.* 52, 1–9.
- Lincoln, J. E., Cordes, S., Read, E. and Fischer, R. L. (1987). Regulation of gene expression ethylene during *Lycopersicon esculentum* (tomato) fruit development. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 84, 2793-2797.
- Pieterse, C. M. J. *et al.*, (2001). Cross-talk between plant defence signaling pathways: boost or burden?. *AgBiotechNet* Vol. 3: 1-8.
- Showalter, A. M. (1993). Structure and function of plant cell wall proteins. *The Plant Cell* 5: 9–23.
- Thomashow, M. *et al.*, (2001). Role of the Arabidopsis CBF transcriptional activators in cold acclimation. *Physiologia Plantarum* 112: 171-175.
- Vollenweider, P. and Günthardt-Goerg, M. S. (2005). Diagnosis of abiotic and biotic stress factors using the visible symptoms in foliage. *Environmental Pollution* Volume 137, Issue 3, Pages 455-465.
- Zegzouti, H. *et al.*, (1997). ER5, a tomato cDNA encoding an ethylene-responsive LEA-like protein: characterization and expression in response to drought, ABA and wounding. *Plant Molecular Biology* 35:847-854.

CAPÍTULO IV

Análisis de Resultados

El chile Habanero es un producto agrícola de gran importancia para las economías de diferentes Estados de la República Mexicana. Sin embargo, su mejoramiento por medios biotecnológicos se ha visto retrasado debido a las dificultades para su cultivo *in vitro* y su recalcitrancia a la transformación genética, lo que lo convierte también en un modelo para la investigación de la regulación del desarrollo. En el presente proyecto se decidió estudiar si una de las causas por las que se presentan estos problemas podría ser la acumulación de etileno en los recipientes donde se cultiva al chile Habanero *in vitro*. Para ello, se cultivaron plántulas del chile en recipientes con y sin ventilación y se analizó su efecto sobre diferentes parámetros del crecimiento y el desarrollo de las plántulas, así como en las poblaciones de transcritos.

Diversas evidencias obtenidas en este trabajo permiten suponer que tanto el crecimiento como el desarrollo *in vitro* de la especie *Capsicum chinense* se ven afectados negativamente por la presencia de etileno en la atmósfera interna del recipiente de cultivo. Por ejemplo, se encontró que el etileno se produjo de manera gradual en cultivos mantenidos en RSV, detectándose su presencia entre los días 4 y 8, alcanzando su valor máximo entre los días 20 y 24 del cultivo. En contraste, en los RCV no se detectó la presencia de etileno durante los días monitoreados en el experimento.

La especificidad de los síntomas por efecto del etileno se evaluó mediante la adición de agentes inhibidores de la síntesis y la percepción de etileno por las plantas, obteniendo resultados indicativos.

Primero, la adición de nitrato de plata (AgNO_3) al medio de cultivo favoreció el desarrollo de las plántulas cultivadas en recipientes sin ventilación, reflejándose esto en una mayor calidad de las plantas formadas (mejor color, mayor altura, mayor número de hojas). El AgNO_3 es un agente bloqueador del receptor de etileno, donde el ión plata (Ag^+) desplaza al cobre de su sitio como cofactor del receptor sin afectar la capacidad de unión de la hormona. De esta manera, el etileno puede unirse al receptor pero éste no puede transducir la señal, impidiendo la activación de todas las respuestas al etileno en la planta. Así, no obstante que la planta pudiera encontrarse en una atmósfera saturada con etileno, la presencia de AgNO_3 impediría que la planta pudiese detectar su presencia. En el caso del chile Habanero, el hecho de que el contacto de las plántulas con el inhibidor del receptor de etileno revierta

los efectos adversos sobre el crecimiento y el desarrollo favorece la hipótesis de que el etileno podría ser el causante directo de estas anomalías.

Segundo, la adición de cloruro de cobalto (CoCl_2), un inhibidor de la última enzima en la ruta biosintética del etileno (la ACC oxidasa) no favoreció el desarrollo de las plántulas en los RSV, observándose la aparición de clorosis y abscisión en las plántulas. Este efecto podría contradecir la propuesta de que el etileno es el causante de los problemas de desarrollo *in vitro* pues al bloquear su síntesis debería esperarse la ausencia de síntomas adversos. No obstante, debe mencionarse que etileno si pudo detectarse en este tipo de recipientes de cultivo, lo que podría sugerir que el inhibidor no funcionó eficientemente bajo las condiciones experimentales empleadas, o que en el modelo de estudio que se empleó puede existir una ruta de síntesis diferente.

Por otro lado, se aplicó una metodología para la detección de la expresión génica diferencial, el despliegue diferencial de ARNs, el RNA-DD (por sus siglas en inglés, "RNA Differential Display"). Ésta ha sido la técnica más utilizada en los años recientes, ofreciendo la posibilidad de encontrar diferencias sutiles de la inducción, en la represión o aún de pequeños cambios en los patrones de expresión génica. No obstante, en el presente proyecto se pudo constatar la necesidad de conocer el genoma de las especies para poder aplicar mejor las metodologías moleculares. A pesar de ello, se logró identificar genes que participan en diferentes aspectos del metabolismo y genes que aún cuando son desconocidos, su relación con el proceso de crecimiento *in vitro* ofrece información importante cuya contribución podrá ser relevante para el entendimiento molecular de estos procesos, una vez que se conozca la función de las proteínas que codifican.

CAPÍTULO V

Conclusiones

Los resultados experimentales obtenidos en este trabajo constituyen evidencias que permiten sugerir que la hipótesis propuesta fue válida, pues las modificaciones registradas en los patrones de expresión génica observados entre los tratamientos estudiados, pueden ser atribuidas a las condiciones de cultivo de los brotes, específicamente a la acumulación de etileno. Esto se basa en que la presencia del etileno contenido en el recipiente de cultivo sin ventilación tuvo una influencia marcada en el crecimiento y el desarrollo de los brotes de chile Habanero *in vitro*.

Adicionalmente, los patrones de bandas obtenidos son indicadores de la presencia de transcritos correspondientes a genes expresados diferencialmente, muy probablemente por el efecto de los tratamientos. No obstante, la comparación de las secuencias en bases de datos señala un hecho relevante en este tipo de estudios, aún cuando las técnicas moleculares empleadas para la detección de transcritos expresados diferencialmente son robustas, el conocimiento de la secuencia de los genomas es una necesidad para poder entender la función de los transcritos acumulados diferencialmente, pues aún cuando se pueda detectar genes inducidos o reprimidos, se requiere su identificación para entender cuáles pueden ser los procesos bioquímicos afectados por los tratamientos.

Por otro lado, a pesar de que se desconoce la identidad de algunos transcritos, su detección solo bajo condiciones de altas concentraciones de etileno y la coincidencia entre su expresión y la aparición de síntomas adversos del desarrollo constituyen los primeros elementos de su caracterización funcional, lo cual constituye un aporte significativo al conocimiento científico sobre los efectos de los factores que influyen en la eficiencia del crecimiento de las plantas en condiciones controladas de laboratorio.

Estos resultados constituyen una importante contribución al entendimiento del papel del etileno durante el cultivo *in vitro* de esta especie y de su efecto sobre el desarrollo de las plantas, lo cual se manifiesta a través de los síntomas fisiológicos que la planta presenta.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal, S. and Chandra, N. (1983). Differentiation of multiple shoot buds and plantlets in cultured embryos of *Capsicum annuum* L. var. Mathania. *Current Sci.* 52:645-46.
- Arroyo, R. and Revilla, M. A. (1991). *In vitro* plant regeneration from cotyledon and hypocotyl segments in two bell pepper cultivars. *Plant Cell Report.* 10:414-416.
- Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B., Dineshkumar S. P. (1997). Signaling in Plant-Microbe Interaction. *Science.* 276: 726-733.
- Balbás, P. (2002). De la Biología Molecular a la Biotecnología. Ed. Trillas, México, D.F.
- Benson, E. (2000). Special Symposium: *In vitro* plant recalcitrance, *In vitro* plant recalcitrance: An introduction. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 36:141–148.
- Beyer, E. M. (1976). A potent inhibitor of ethylene action in plants. *Plant Physiology.* 58:268-271.
- Beyer, E. M. (1979). Effect of Silver Ion, Carbon Dioxide, and Oxygen on Ethylene Action and Metabolism. *Plant Physiol.* 63, 169-173.
- Binzel, M. L., Sankhla, N., Joshi, S. and Sankhla, D. (1996)a. Introduction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Rep.* 15:535-540.
- Bleecker, A. B and Kende H. (2000). Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:1-18.
- Bleecker, A. B. & Schaller, G. E. (1996). The Mechanism of Ethylene Perception. *Plant Physiol.* 111, 653–660.
- Buddendorf-Joosten, J. M. C and Woltering, E. J. (1994). Components of the gaseous environment and their affects on plant growth and development in vitro. *Plant Growth Regulation*, v.15, p.1-16.
- Buyukalaca, S and F. Mavituna (1996). Somatic embryogenesis and plant regenerations of pepper in liquid media. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 46:227-235.

- Canto-Flick, A. (2005). Caracterización Morfológica de una colección de 18 accesiones de Chile Habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) establecida en el CICY. Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica de Yucatán.
- Chi, G. L. and E-C. Pua. 1989. Ethylene inhibitors enhanced de novo shoot regeneration from cotyledons of *Brassica campestris* ssp. *chinensis* (*Chinese cabbage*) *in vitro*. *Plant. Sci.* 64: 243-250.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single Step Method of RNA isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate Phenol-Chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y. and Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69: 2110-2114.
- Davies, P. J. (1995). *Plant hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers).
- Deikman, J. (1997). Molecular mechanisms of ethylene regulation of gene expression. *Physiol. Plant.* 100:561-566.
- Delta® Differential Display Kit de la casa comercial CLONTECH.
- Diallinas, G. and Kanellis, A. K. (1994). A phenylalanine ammonia-lyase gene from melon fruit: cDNA cloning, sequence and expression in response to development and wounding. *Plant Mol. Biol.* 26:473-479.
- Enyedi, A. J., Yalpani, N., Silverman, P. and Raskin I. (1992). Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests. *Cell* 70:879-886
- "Eteno" Microsoft® Encarta® 2006 Microsoft Corporation, 2005.
- Gómez-Uc, E. (2006). Clonación de genes expresados durante la inducción de sistemas de defensa en callos de *Cocos nucifera* L. tratados con quitosano. Tesis de Licenciatura, Instituto Tecnológico de Mérida. p.p. 83, Mérida, Yucatán, México.

- Grignon, C. (1999). Recent advances on proteins of plant terminal membranes. *Biochimie* 81:577-596.
- Hartmann, H. T. and Kester, D. E. (2001). Propagación de plantas, Principios y Prácticas. Compañía Editorial Continental, Octava reimpresión, México.
- He Z-H., Cheeseman I., He D., Kohorn B. D., (1999). A cluster of five cell wall-associated receptor kinases, Wak1-5, are expressed in specific organs of *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 39:1189-1999.
- Husain, S., Jain, A. and Kothari, S. L. (1999). Phenylacetic acid improves bud elongation and *in vitro* plant regeneration efficiency in *Capsicum annuum*. *Plant Cell Rep.* 19:64-68.
- Jankiewicz, L. S. (2003). Reguladores del crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas, Vol.1 (Propiedades y acción) UACH. Edición Mundi-Prensa. México, D.F. pp. 15-16 y 257-294.
- Johnson, P. and Ecker J., (1998). The ethylene gas signal transduction pathway: A molecular perspective. *Annual Review Genetic*.
- Kim, C. S., Kwak, J. M., Nam, H. G., Kim, K. and Cho, B. H. (1994). Isolation and characterization of two cDNAs that are rapidly induced during the wound response of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* 13: 340-343.
- Laborde, C. y Pozo, Q., (1982). Presente y pasado del chile en México. SARH-INIA. México, D.F. 79 pp.
- Leon, J., Rojo, E., and Sanchez-Serrano, J.J. (2001). Wound signaling in plants. *Journal Exp. Bot.* 52, 1-9.
- Liang, P. and A. B. Pardee, (1992). Differential display of eukaryotic mRNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257:967-971.
- Liang, P., Averboukh L. and Pardeee A. B. (1993). Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Res.* 21: 3269-3275
- Liang, P., and Pardee, A. B. (1997). Differential display-a general protocolo. In: *Methods in Molecular Biology: Differential display Methods and protocols*, pp 3-11, P. Liang and Pardee A.B. (eds), Humana Press, Totowa, NJ.

- Liang, P and Stein. J. (2002). Differential display technology: a general guide. *CMLS. Cell. Mol. Life. Sci.* 59: 1235-1240
- Lin J., Brader G. and Palva E. T., (2004). The WRKY 70 transcription factor: a node of convergente for jasmonate mediated and salicilate mediated signal in plant defense. *The plant cell* 16:319-331.
- Lincoln, J. E., Cordes S., Read E. and Fischer R. L. (1987). Regulation of gene expression ethylene during *Lycopersicon esculentum* (tomato) fruit development. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 84, 2793-2797.
- Lincoln, J. E., Campbell, A. D., Oetiker, J., Rottmann, W. H., Oeller, P. W., Shen, N. F. and Theologis, A., (1993). *Le-Acs4*, a fruit ripening and wound-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of tomato (*Lycopersicon esculentum*): expression in *Escherichia coli*, structural characterization, expression characteristics, and phylogenetic analysis. *Journal of Biological Chemistry* 268, 19422-19430.
- Liu, J., Stevens, C., Khan, V. A., Lu, J. Y., Wilson, C. L., Adeyeye, O., Kabwe, M. K., Pusey, P. L., Chalutz, E., Sultana, T. and Droby, S. (1993). Application of ultraviolet-C light on storage rots and ripening of tomatoes. *J. Food Protect.* 56:868-872.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Nakata, K. (1984). Production of mutant plants displaying trits which have herbicide resistance, disease resistance, resistance to stress conditions and improved quality factors and biotechnology. *J. Pestic. Sci.* 9: 355-364.
- Ochoa-Alejo, N. and Ireta-Moreno, L. (1990). Cultivar differences in shoot-forming capacity of hypocotyl tissues of chili pepper (*Capsicum annuum* L.) cultured *in vitro*. *Sci. Hort.* 42:21-28.
- O'Donnell, P.J., Calvert, C., Atzorn, R., Wasternack, C., Leyser, H.M.O. and Bowles, D.J. (1996). Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science* 274:1914-1917.

- Pérez-Molphe-Balch, E. M., Ramírez-Malagón, R., Núñez-Palenius, H. G., Ochoa-Alejo, N. (1999). Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes, pp. 9-55.
- Pickersgill, B. (1989). "Genetic resources of *Capsicum* for tropical regions", in Tomato and Pepper production in the tropics, Tainan, Taiwan. Asian Vegetable Research and Development Center, pp. 2-8.
- Pieterse, C. M. J., *et al.*, (2001). Cross-talk between plant defence signaling pathways: boost or burden?. *AgBiotechNet* Vol. 3: 1-8.
- Pozo-Campodónico, O., and Montes- Hernández S. and Redondo-Juárez, E. (1991). "chile (*Capsicum* spp.)", en R. Ortega, G. Palomino, F. Castillo, V. Gonzáles y M. Livera (eds.). Avances en el estudio de los recursos filogenéticos de México. Sociedad Mexicana de fitogenética A.C., México, pp. 217-238.
- Pozueta-Romero, J., Klein, M., Houlné, G., Schantz, M-L., Meyer, B. and Schantz, R. (1995). Characterization of a family of genes encoding a fruit-specific wound-stimulated protein of bell pepper (*Capsicum annuum*): identification of a new family of transposable elements. *Plant Molecular Biology* 28:1011-1025.
- Purnhauser, L., Medgyesy M. and Czeko P. J. (1987). Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. tissue culture using the ethylene inhibitor AgNO₃. *Plant Cell Rep.* 6:1-4.
- Reid, M. S. (1990). The functioning of hormones in plant growth and development: In *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*. P. J. Davies (ed). Kluwer Academia Publishers. Netherlands. pp: 257-279.
- Robledo-Paz, A. (2004). Regeneración *in vitro* de plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) mediante cultivo de cotiledones e hipocotilos. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 27 (2):121-126.
- Rodríguez, F. I., Esch, J. J., Hall, A. E., Binder, B. M., Schaller, G. E. and Bleecker, A. B. (1999). A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Science* 283: 996–998.
- Ryang, S. H, Chung, S. Y., Lee, S. H., Chan, J. S., Kim, H. Y., and Cho, T. J. (2002). Isolation of pathogen-induced Chinese cabbage by

- sustractive hybridization employing selective adaptor ligation. *Biochemical and biophysical research communication* 299: 352-359.
- Salisbury, F. B. and Ross, C. W. (1994). *Fisiología Vegetal*. V. González Velázquez (trad). Grupo Editorial Iberoamérica. México, D.F. pp. 759.
- Sambrook, J. y Russell, D. (2001). *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Santana-Buzzy *et al.*, (2005). Regeneration of Habanero Peper (*Capsicum chinense* Jacq.) Via Organogenesis. *HortScience* 40 (6): 1829-1831.
- Santana-Buzzy *et al.*, (2006). Improvement of *In vitro* Culturing of Habanero Pepper by inhibition of Ethylene Effects. *HortScience* 41 (2): 405-409.
- Satterlee, J. S. and Sussman, M. R. (1998). Unusual membrane-associated protein kinases in higher plants. *J. Membr. Biol.* 164:205-213.
- Schaller, G. E. (2000). Histidine kinases and the role of two-component systems in plants. *Adv. Bot. Res.* 32: 109-148.
- Schaller, G. E. and Bleecker, A. B. (1995). Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the Arabidopsis *ETR1* gene. *Science* 270: 1809-1811.
- Showalter, A. M. (1993). Structure and function of plant cell wall proteins. *The Plant Cell* 5: 9-23.
- Soberón, J. R., Quiroga, E. N., Sampietro, A. R. and Vattuone, M. A. (2007). Etileno. Hipertextos del área de la Biología. Univesidad Nacional del Nordeste. República Argentina.
- Soria-Fregoso, M. J. (2002). Paquete Tecnológico para la producción de Chile Habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Instituto Tecnológico Agropecuario No. 2 "Ing. José Alberto Navarrete Ruiz", Conkal, Yucatán. 1ª Edición.
- Szasz, A., Nervo, G. and Fari, M. (1995). Screening for *in vitro* shoot-forming capacity of seedling explants in bell pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes and efficient plant regeneration using thidiazuron. *Plant Cell Report* 14: 666-669.

- Thomashow, M. *et al.*, (2001). Role of the Arabidopsis CBF transcriptional activators in cold acclimation. *Physiologia Plantarum* 112: 171-175.
- Tún-Dzul, José de la Cruz (2001). Chile Habanero. Características y Tecnología de producción. SAGARPA. INIFAP produce Yucatán. Página 74.
- Vain, P. *et al.*, (1989). Role of ethylene in Embryogenic Callu Initiation and Regeneration in *Zea mays* L. *J. Plant Physiol.* Vol. 135 pp. 537-540.
- Vollenweider, P. and Günthardt-Goerg, M. S. (2005). Diagnosis of abiotic and biotic stress factors using the visible symptoms in foliage. *Environmental Pollution* Volume 137, Issue 3, Pages 455-465.
- Walker, J. C. (1994) Structure and function of the receptor-like protein kinase of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 26:1599-1609
- Zagorska, N., Atanassov, A., Boyadjiev, P. and Djilianov, D. (1995). *In vitro* production of haploid plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 11: 400-408.
- Zegzouti, H. *et al.*, (1997). ER5, a tomato cDNA encoding an ethylene-responsive LEA-like protein: characterization and expression in response to drought, ABA and wounding. *Plant Molecular Biology* 35:847-854.
- Zhang, J. S., Xie, C., Shen, Y. G. *et al.*, (2001). A two-component gene (*NTHK1*) encoding a putative ethylene receptor homolog is both developmentally and stress regulated in tobacco, *Theor. Appl. Genet.*, 102: 815-824.

ANEXOS

ANEXO 1. Medio MS (Murashige and Skoog, 1962)

Compuesto	Formula	mg·L ⁻¹
Macroelementos		
Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	1650
Nitrato de potasio	KNO ₃	1900
Cloruro de calcio dihidratado	CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
Sulfato de magnesio heptahidratado	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
Fosfato de potasio	KH ₂ PO ₄	170
Sal disódica de etilendiaminotetracetato	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.3
Sulfato ferroso heptahidratado	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8
Microelementos		
Sulfato de manganeso monohidratado	MnSO ₄ ·H ₂ O	16.9
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	6.2
Yoduro de potasio	KI	0.83
Molibdato de sodio dihidratado	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
Cloruro de cobalto hexahidratado	CuCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
Sulfato cúprico pentahidratado	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
Sulfato de zinc heptahidratado	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
Suplementos		
Tiamina		0.10
Piridoxina		0.5
Ácido nicotínico		0.5
Glicina		2.0
Mioinositol		100
Sacarosa		30000

ANEXO 2. Protocolo de tratamiento con DNasa I (AMBIÓN™)

- 1.- Agregar a la pastilla ya resuspendida 0.1 volumen del amortiguador 10X de la DNasa I y 1 μ L de la enzima DNasa I (2 unidades).
- 2.- Mezclar suavemente e incubar a 37 °C por 20-30 min.
- 3.- Posteriormente agregar 0.1 volumen del reactivo de inactivación de la DNasa.
- 4.- Mezclar en incubar el tubo 2 min a temperatura ambiente.
- 5.- Centrifugar por 1-2 min a 13,000 rpm a 4 °C.

ANEXO 3. Medios de cultivo para bacterias (Sambrook and Russell, 2001)

LB líquido (1000 mL de medio): 20 g de medio LB en polvo, mezclar perfectamente y esterilizar en autoclave.

LB/Amp (1000 mL de medio): 20 g de LB en polvo, 15 g de agar, esterilizar en autoclave y cuando la temperatura del medio sea de 40 °C agregar ampicilina hasta una concentración final de 100 μ g/mL.

Para LB (1000 mL de medio) sino se cuenta con el reactivo: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl. Ajustar el pH a 7 con NaOH y esterilizar en autoclave.

Medio PSI broth (1000 mL de medio): 5 g de Extracto de levadura, 20 g de Triptona y 5 g de Sulfato de magnesio, esterilizar en autoclave.

Medio TFB I (200 mL de medio): 0.588 g acetato de potasio (30 mM), 2.42 g cloruro de rubidio (100mM; pH 5.8), 0.294 g cloruro de calcio (10 mM), 2 g cloruro de magnesio (50 mM) y 30 mL glicerol (15% v/v). Esterilizar en autoclave.

NOTA: Ajustar el pH a 5.8 con acido acético diluido.

Medio TFB II (100 mL de medio): 0.21 g MOPS (10 mM pH 6.5), 1.1 g cloruro de calcio (75 mM), 0.121 g cloruro de rubidio (10 mM) y 15 mL glicerol (15% v/v). Esterilizar en autoclave.

ANEXO 4. Preparación de amortiguadores (Sambrook and Russell, 2001)

Preparación del amortiguador TAE 50X: 242 g de tris, 57.1 mL de ácido acético glacial, 100 mL de EDTA 0.5 M pH 8, aforar a 1000 mL.

Preparación del amortiguador TAE 1X: Tomar 20 mL del amortiguador TAE y aforar a 1000 mL.

Preparación del amortiguador TBE 5X: 54 g de tris, 27.5 g de ácido bórico y 20 mL de EDTA 0.5 M pH 8, aforar a 1000 mL.

Preparación del amortiguador TBE 1X: Tomar 200 mL amortiguador TBE 5X y aforar a 1000 mL.

Preparación de EDTA (0.5 M pH 8): 186.1 gr de EDTA.2H₂O en 800 mL de agua, ajustar el pH con perlas de NaOH, aforar a 1000 mL.

Preparación de amortiguador de carga de ADN: 500 μ L de Glicerol, 500 μ L de agua grado biología molecular, pizca de azul de bromofenol, aforar a 1.5 mL.

Preparación de amortiguador de carga de ARN: 500 μ L de Glicerol, 500 μ L de agua grado biología molecular, 3 μ L de EDTA 0.5 M pH 8, pizca de azul de bromofenol y bromuro de etidios para una concentración final de $1\mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$ y aforar a 1.5 mL.

Preparación del amortiguador de formamida (manual del kit de despliegue diferencial de la casa comercial CLONTECH): 95% de formamida, 0.2% de azul de bromofenol y 0.2% de Xileno cianol.

Preparación del amortiguador TE 1X (pH 7.6): 10 mM de Tris-Cl y 1 mM de EDTA.

ANEXO 5. Preparación de la premezcla para reacciones de PCR "supermix"

"supermix" (manual del amortiguador de PCR de la ADN Taq polimerasa, N. catalogo 18067-017):

100 μ L de amortiguador de PCR 10X, 20 μ L de dNTP's 10 mM, 30 μ L de MgCl₂ 50 mM, 5 μ L de enzima ADN Taq polimerasa (Invitrogen) y 745 μ L de agua grado biología molecular (Sigma-Aldrich).

ANEXO 6. Preparación de gel nativo de agarosa

Se utiliza por cada 100 mL de amortiguador TAE 1X 1 g de agarosa, la agarosa grado Biología molecular es pesada en un papel y puesta en un frasco de 250 mL.

Se agrega el amortiguador TAE 1X, medido con una probeta graduada y se mezcla perfectamente la agarosa, posteriormente se pesa el frasco.

La mezcla es calentada por un minuto en un horno de microondas para fundir los grumos y el frasco es pesado de nuevo, si el peso no es el mismo que el que se obtuvo antes de calentar se le coloca agua destilada hasta obtener el peso inicial para conservar la concentración del amortiguador.

Posteriormente se le agrega bromuro de etidio para una concentración final de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. La mezcla se coloca en el molde de la bandeja de electroforesis, el cual debe estar bien nivelado. Se le coloca el peine para la formación de los pozos y se deja gelificar por aproximadamente 20 min.

Ya gelificado, se transfiere el molde a la cámara de electroforesis, la cual es entonces llenada con suficiente amortiguador TAE 1X para cubrir ligeramente el gel y se retira el peine.

Con esto, el gel está listo para ser cargado con la muestra que se desea analizar. Antes de cargar las muestras, dibujar un esquema para poder identificar las muestras posteriormente. Fraccionar a 90 Volts.

NOTA: Cuando la muestra a analizar es ARN, todos los reactivos y la cámara misma serán tratados para la eliminación de RNasas y evitar con esto la degradación de la muestra. Esto se logra lavando la cámara, las cajas que contendrán las puntas y el frasco que contendrá al amortiguador, con hidróxido de sodio y posteriormente con agua con DEPC.

ANEXO 7. Preparación de gel desnaturizante de poliacrilamida

Para la preparación de 70 mL de gel desnaturizante de acrilamida-bisacrilamida al 6% se realiza lo siguiente: Se lavan perfectamente los cristales y se dejan secar.

Una vez secos los cristales se les colocó respectivamente el Bind silane de la casa comercial Promega (5 μ L de bind + 1 mL de agua destilada) que funciona como pegamento para el gel y al otro se le coloca 1 mL de Sigmacote (Sigma-Aldrich) que funciona como el repelente para el gel, y se dejan secar por 20 min.

Transcurrido los 20 min de secado se arman los cristales para cargar con el gel de acrilamida-bisacrilamida.

Se disuelven 29.4 g de urea en 14 mL amortiguador TBE 5X y 20 mL de agua destilada, ya que la urea este perfectamente disuelta, se le adiciona 10.5 mL de acrilamida-bisacrilamida al 40% y se afora hasta 70 mL con H₂O y se le adiciona los catalizadores los cuales son 200 μ L de TEMED (Invitrogen) y 400 μ L de persulfato de amonio al 10% para posteriormente cargar en la cámara ya armados.

ANEXO 8. Tinción del gel con plata (manual Promega)

Solución al 10% de ácido acético: 200 mL de ácido acético en 1800 mL de agua destilada.

Solución de plata: 2 g de plata y 3 mL de formaldehído al 37% en 2000 mL de agua destilada.

Solución de revelado: 60 g de carbonato de sodio (Na₂CO₃) en 2000 mL de agua destilada. Enfriar a -4 °C. Antes de usar, adicione 3 mL de formaldehído al 37% y 400 μ L de tiosulfato de sodio (10 mg·mL⁻¹).

ANEXO 9. Preparación de células competentes usando cloruro de rubidio (variación de la técnica publicada en Cohen, 1972)

- 1.- Inocular 1 mL de bacteria *E. coli* DH-5 α crecidas toda la noche en medio PSI broth a 37 °C con agitación en 100 mL del mismo medio con las mismas condiciones de incubación y monitorear a una DO= 550 nm hasta que este alcance los una A: 0.48 (aprox. en 3 hrs).
- 2.- En dos tubos estériles de polipropileno colocar a cada uno 50 mL de las células que ya llegaron a los 0.48 e incubar por 15 min en hielo.
- 3.- Recuperar las células centrifugando 5 min a 5000 rpm a 4 °C.
- 4.- Eliminar el medio por decantación y adicionar al pélet de células 20 mL de TFB I, por cada uno de los tubos para resuspenderlas y posteriormente incubar en hielo por 15 min.
- 5.- Centrifugar nuevamente 5 min a 5000 rpm a 4 °C.
- 6.- Decantar el sobrenadante y resuspender el pélet de células en 2 mL de TFB II para cada uno de los tubos, dejar en hielo e inmediatamente después alicuotar de 50 μ L en tubos eppendorf, congelar en Nitrógeno líquido y almacenar a -80 °C.

ANEXO 10. Transformación por choque térmico (modificación del método citado en Sambrook and Russell, 2001)

- 1.- Descongelar a las células competentes (bacteria *E. coli* DH-5 α) en hielo.
- 2.-Añadir 1 μ L de la reacción de ligación a 50 μ L de células competentes.
- 3.-Incubar en hielo durante 40 min.
- 4.-Incubar a 42 °C durante 2-3 min.
- 5.-Transferir a hielo e incubar por 10 min.
- 6.- Agregar 900 μ L de medio LB e incubar por 3 horas a 37 °C.
- 7.-Antes que concluya la hora de incubación se preparan las placas de cultivo, esto añadiendo 20 μ L de X-gal y esparciendolo perfectamente.
- 8.- Concluida la incubación se plaquea la 100 μ L de muestra y se incuban a 37 °C de 12 a 16 horas.
- 9.- Las colonias blancas son picadas y crecidas en 3 mL de medio LB líquido toda la noche a 37 °C para posteriormente realizar la extracción del ADN plasmídico.

ANEXO 11. Minipreparación de ADN plasmídico de *Escherichia coli* mediante absorción en sílica. (Modificación al método de Jeffrey D. Brown. Molecular and Cellular Biology Program of the University of Washington and Fred Hutchinson Cancer Research, Howard Medical Institute, and Department of Pharmacology, University of Washington School of Medicine, Box 357750, Seattle, WA 98195 USA)

- 1.- Centrifugar de 1.5- 3 mL de un cultivo saturado de bacterias, por 10 seg en una microfuga, aspirar el sobrenadante.
- 2.- Adicionar 200 μ L de solución de resuspensión (Tris, pH 8.0, 50 mM; EDTA 10 mM; RNase a 100 μ g /mL). Resuspender la pastilla con vórtex.
- 3.- Adicionar 200 μ L de solución de lisis (NaOH 200 mM, SDS 1%) e invertir el tubo 5 veces, asegurándose que el lisado se ha aclarado.
- 4.- Agregar 200 μ L de solución de neutralización (Acetato de Potasio 3 M, calibrar a pH 5.5 con ácido acético), invirtiendo el tubo varias veces.
- 5.- Centrifugar la muestra en microfuga a máxima velocidad por 5 min, transferir el SN a un tubo nuevo conteniendo 200 μ L de la suspensión de sílica. Invertir varias veces para mezclar perfectamente.
- 6.- Centrifugar la muestra a máxima velocidad por 15-20 seg y remover el sobrenadante con pipeta.
- 7.- Adicionar 0.5 mL de solución de lavado a la pastilla de sílica (NaCl 50 mM; Tris-Cl 10 mM, pH 7.5; EDTA 2.5 mM; 50% de etanol) y resuspender la pastilla con vortex. Centrifugar la muestra a máxima velocidad por 15 seg.
- 8.- Aspirar el sobrenadante y centrifugar brevemente para bajar el líquido de las paredes del tubo. Aspirar todo el líquido del fondo del tubo con pipeta. Secar la pastilla por 2 min a 55 °C.
- 9.- Resuspender la pastilla de sílica en 35 μ L de agua y calentar a 55 °C por 2 min.
- 10.- Centrifugar las muestras por 60 seg a máxima velocidad. Tomar el tubo de tal manera que la superficie de la sílica quede en posición horizontal y remover cuidadosamente 30 μ L del sobrenadante. Transferir a tubos limpios, evitando aspirar partículas finas de sílica.

NOTA: El ADN preparado de esta manera está lo suficientemente puro para las reacciones más comunes empleadas en biología molecular, incluyendo secuenciación, pero es obligatorio no tomar nada de las partículas de sílica. Este proceso es barato, rápido y no requiere de extracciones orgánicas, del uso de reactivos tóxicos o precipitaciones con etanol.

