

Efecto de la infección del vector *pEuMV-YP:ΔAV1:f3'h* en Crisantemo sobre la expresión del gen *f3'h* y la acumulación de antocianinas.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA FLORICULTURA

PRESENTA

FRANCISCO ALBERTO CHÍ SÁNCHEZ



GUADALAJARA, JALISCO, FEBRERO 2016.

LIBERACIÓN DEL SÍNODO



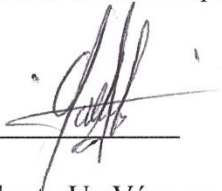
Guadalajara, Jalisco a 19 de febrero de 2016.

Dr. Ernesto Tapia Campos
Coordinador Académico de la Maestría
en Ciencias de la Floricultura
Guadalajara, Jalisco


Los que suscriben integrantes del jurado de examen de grado del estudiante Francisco Alberto Chí Sánchez, una vez leída y revisada la Tesis titulada "Efecto de la infección del vector pEuMV-YP:ΔAV1:f3'h en Crisantemo sobre la expresión del gen f3'h y la acumulación de antocianinas" aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el alumno para aspirar al grado de Maestro en Ciencias de la Floricultura durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente a los 19 días del mes de febrero del año 2016.

Presidente
Dra. Neith Pacheco López.



Vocal
Dr. Alberto Uc Vázquez.



Vocal
Dra. Ana Luisa Ramos Díaz.



Secretario
Dra. Julia del Socorro Cano Sosa.

Vocal
Dr. Hernán Villanueva Alonzo.



Guadalajara, Jalisco, México, Febrero de 2016

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de materiales y métodos experimentales, los resultados y discusión de este punto proviene en las actividades de experimentación realizadas durante el periodo que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las unidades y laboratorios del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenecen patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán, en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente declaración.

Francisco Alberto Chí Sánchez

Agradecimientos

Al fondo SEP-CONACYT ciencia básica, por el apoyo otorgado, a través del proyecto “Estudios Moleculares y Bioquímicos para la modificación de la rutas de biosíntesis de las antocianinas en crisantemo *D. grandiflora*”, con número de clave: 2856, cuyos fondos fueron utilizados para financiar parte de esta tesis de Maestría.

Al CONACYT por la beca otorgada con número 371166 para la realización de este trabajo y al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Unidad Sureste, por la beca complementaria.

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Unidad Sureste, por las facilidades brindadas para el desarrollo de la parte experimental de la presente.

A la Dra. Ana Luisa Ramos Díaz por la dirección y coordinación de la presente tesis, así como al Dr. Alberto Uc Vázquez, Co-Director y a la asesoría de la Dra. Neith Pacheco López.

Al Dr. Hernán Villanueva y al Dr. Oscar Moreno por el apoyo técnico y proporcionar el vector de transformación.

Al Dr. Oscar Moreno y al centro de investigación científica de Yucatán por permitir el uso de sus instalaciones para realizar el bombardeo de las plantas de crisantemo.

A la Dra. Guadalupe López por su generosa donación del material vegetal de inicio.

A los miembros de mi comité sinodal y a los encargados de la revisión de la tesis, por sus comentarios que enriquecieron el escrito: Dra. Ana Luisa Ramos Díaz, Dr. Alberto Uc Vázquez, Dr. Hernán Villanueva Alonzo, Dra. Neith Pacheco López, Dra. Julia Cano Sosa, Dra. Guadalupe López Puc.

Dedicatoria

A Dios.

A mis padres José Gualberto y María Olivia por enseñarme a ver la vida con pasión, por la tolerancia, confianza, paciencia y apoyarme en todo momento de mi vida.

A mi Madrina Yasmin Urgell, por ser mi segunda mama, por sus consejos, por su apoyo y la motivación que me ha dado.

A mis hermanos Pepe y Tito por su confianza y por estar en todo momento con su apoyo y motivación.

A mi novia por tolerar mi forma de ser, su tiempo, su motivación y su confianza.

A mí cuñada Yazmin por su confianza y su apoyo.

Gracias!!

Capítulo I. Contenido

Índice de abreviatura.....	i
Índice de tablas.....	ii
Índice de figuras.....	iii
Resumen.....	vi
Abstract.....	viii
Capítulo II. Marco Teórico.....	11
II.1 Introducción.....	11
II.2 Antecedentes.....	12
II.2.1 Importancia de la floricultura en México.....	12
II.2.2 Descripción del Crisantemo.....	14
II.2.3 Cambios de la coloración de las flores por mejoramiento genético.....	15
II.2.4 Genes involucrados en la coloración de las flores de crisantemo.....	17
II.2.5 Silenciamiento de genes inducidos por virus (VIGS).....	20
II.2.6 Descripción de Euphorbia Mosaic Virus (EuMV).....	23
II.2.7 Aislamiento y caracterización de EuMV-YP.....	23
II.3 Justificación.....	25
II.4 Hipótesis.....	26
II.5 Objetivos.....	26
II.5.1 Objetivo general.....	26
II.5.2 Objetivos específicos.....	26
II.6 Estrategia experimental.....	27
Capítulo III. Cuantificación y detección de antocianinas en botones florales de crisantemo.....	28
III.1 Introducción.....	28
III.2 Materiales y métodos.....	28
III.2.1 Material vegetal.....	28
III.2.2 Preparación de botones florales para la extracción.....	28
III.2.3 Extracción de antocianinas en lígulas liofilizadas.....	28
III.2.4 Análisis por HPLC.....	29
III.2.5 Análisis estadísticos.....	29
III.3 Resultados y discusión.....	31
III.3.1 Curva de calibración.....	31
III.3.2 Establecimiento del método de extracción de cianidina en lígulas liofilizadas.....	32

III.4	Conclusión.....	36
Capítulo IV.	Análisis <i>in silico</i> del gen <i>f3`h</i> de crisantemo.	37
IV.1	Introducción	37
IV.2	Materiales y métodos	37
IV.2.1	Obtención del material vegetal.....	37
IV.2.2	Extracción de ARN	37
IV.2.3	Síntesis de cDNA	38
IV.2.4	Condiciones de amplificación por PCR	38
IV.2.5	Análisis <i>in silico</i> de las secuencia del gen <i>f3`h</i> y Actina	39
IV.3	Resultados y discusión	40
IV.3.1	Obtención del material vegetal.....	40
IV.3.2	Extracción de ARN	42
IV.3.3	Amplificación de los genes <i>f3`h</i> y Actina.....	43
IV.3.4	Análisis <i>in silico</i> de la secuencia del gen <i>f3`h</i>	44
IV.3.5	Análisis <i>in silico</i> de la secuencia del gen de actina.....	46
IV.4	Conclusión.....	49
Capítulo V.	Correlación entre la concentración de antocianinas y la acumulación de transcritos del gen <i>f3`h</i> durante el desarrollo floral en plantas de crisantemo.....	50
V.1	Materiales y Métodos.....	50
V.1.1	Material vegetal.....	50
V.1.2	Cálculo del contenido de antocianinas en base seca	50
V.1.3	Extracción de antocianinas en botones florales.....	51
V.1.4	Análisis de PCR-tiempo real (PCR-tr)	51
V.2	Resultados y discusión	52
V.2.1	Extracción de antocianinas en lígulas liofilizadas y botones florales	52
V.2.2	Optimización de condiciones de amplificación por PCR para determinar la expresión del gen <i>Actina</i> y <i>f3`h</i>	54
V.3	Conclusión.....	60
Capítulo VI.	Infección de plantas de crisantemo mediante pEuMV-YP: Δ AV1: <i>f3`h</i>	61
VI.1	Introducción	61
VI.2	Materiales y métodos	61
VI.2.1	Obtención del vector	61

VI.2.2	Obtención del material vegetal.....	62
VI.2.3	Inoculación por bombardeo.....	63
VI.2.4	Extracción de ADN en hojas de crisantemo.....	63
VI.2.5	Detección del ADN viral mediante PCR.....	64
VI.2.6	PCR tiempo real (PCR-tr)	64
VI.2.7	Detección de la expresión del gen <i>f3' h</i> en botones florales de plantas inoculadas mediante PCR-tr.....	65
VI.3	Extracción de Cianidina, cuantificación y análisis mediante HPLC en botones florales de crisantemo de plantas inoculadas	65
VI.4	Análisis estadísticos	65
VI.5	Resultados y discusión	66
VI.5.1	Bombardeo de crisantemo con construcciones VIGS	66
VI.5.2	Detección de la infección por métodos moleculares PCR.....	67
VI.5.3	Secuenciación.....	71
VI.5.4	Diagnóstico por PCR tiempo real (PCR-tr) para EuMV-YP.....	74
VI.5.5	Detección de la expresión del gen <i>f3' h</i> en botones florales de plantas inoculadas mediante PCR-tr.....	76
VI.5.6	Análisis estadístico de la expresión del gen <i>f3' h</i>	77
VI.5.7	Cuantificación de Cianidina en plantas inoculadas con VIG's	79
VI.6	Conclusión.....	82
Capítulo VII.	Conclusión general	83
Capítulo VIII.	Perspectivas	84
Capítulo IX.	Bibliografía.....	85

Índice de abreviaturas

- A.C:** Alargamiento celular
AC: Acetona
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADNc: ADN complementario
ANS: Antocianidina sintetasa
ARN: Ácido ribonucleico
B.S: Base seca
C4H: Cinamato-4-hidroxilasa
CHI: Chalcona isomerasa
CHS: Chalcona sintetasa
D.C: Duplicación celular
DFR: Dihidroflavonol 4-reductasa
DPI: Días posterior a la inoculación
EDF: Etapa de desarrollo floral
EuMV-YP: Euphorbia mosaic virus- Yucatan Peninsula
F3'5H: Flavonoide-3'-5'-hidroxilasa
F3'H: Flavonoide-3'-hidroxilasa
F3H: Flavonoide-3-hidroxilasa
FGT: Flavonoide glucosil transferasa
HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia (*high performance liquid chromatography*)
I.C: Identidad celular
MA: Maduración
MA: Metanol-Agua
MAA: Metanol-Agua-Acido fórmico
MF: Metanol-Ácido fórmico
PAL: Fenilalanina amonio liasa
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PCR-tr: Reacción en cadena de la polimerasa-Tiempo real
PDS: Fitoeno desaturasa
PPO: Enzima Polifenol Oxidasa
SE: Senescencia
TMV: Tobacco mosaic virus
TRV: Tobacco rattle virus
VIGS: Silenciamiento génico inducido por virus (*Virus-induced gene silencing*)

Índice de tablas

TABLA I.1. VALOR DE LA PRODUCCIÓN NACIONAL DE CRISANTEMO DURANTE EL 2013 (SIAP-SAGARPA, 2014).	15
TABLA I.2. CAMBIO DE LA COLORACIÓN DE FLORES MEDIANTE EL SILENCIAMIENTO DE GENES.	16
TABLA I.3. VECTORES VIGS DESARROLLADOS A PARTIR DE VIRUS Y HOSPEDEROS DE GENES..	22
TABLA II.1 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA CADA FACTOR EN LA EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS EN LÍGULAS LIOFILIZADAS.	30
TABLA III.1. OLIGOS UTILIZADOS PARA LAS REACCIONES DE PCR Y PCR-TR.	38
TABLA III.2 PORCENTAJE DE SIMILITUD CON SECUENCIAS REPORTADAS DEL GEN F3´H EN CRISANTEMO.	44
TABLA III.3. PORCENTAJE DE SIMILITUD CON SECUENCIAS REPORTADAS PARA EL GEN DE ACTINA EN COMPARACIÓN CON KT892062.	47
TABLA IV.1. PRUEBAS DE RANGOS MÚLTIPLES PARA LA EXPRESIÓN DEL GEN F3´H POR ESTADO DE DESARROLLO DEL BOTÓN FLORAL.	58
TABLA V.1. VECTORES CONSTRUIDOS A PARTIR DE EUMV-YP.....	63
TABLA V.2. PORCENTAJE DE SIMILITUD QUE COMPARTE LA SECUENCIA OBTENIDA EN ESTE TRABAJO CON SECUENCIAS REPORTADAS EN LA BASE DE DATOS DEL NCBI.	71
TABLA V.3. PRUEBAS DE RANGOS MÚLTIPLES PARA LA EXPRESIÓN DEL GEN ACTINA POR EDF70	

Índice de figuras

FIGURA I.1 EXPORTACIÓN E IMPORTACIÓN DE LA PRODUCCIÓN MUNDIAL DE PLANTAS ORNAMENTALES (DATOS OBTENIDOS DE LA UN-COMTRADE, 2015).....	13
FIGURA I.2 PRINCIPALES CULTIVOS ORNAMENTALES EN MÉXICO (DATOS OBTENIDOS DEL SIAP-SAGARPA, 2014).....	13
FIGURA I.3 ESTRUCTURA MORFOLÓGICA DE LA FLOR DE CRISANTEMO (MODIFICADO DE SHCHENNIKOVA <i>ET AL.</i> 2004; TEIXEIRA 2014).....	14
FIGURA I.4 ESTRUCTURA COMÚN DE LAS ANTOCIANINAS Y LAS SUSTITUCIONES MÁS COMUNES (MODIFICADO DE ANANGA <i>ET AL.</i> , 2013).....	17
FIGURA I.5 ETAPA 1 DE LA BIOSÍNTESIS DE ANTOCIANINAS, FORMACIÓN DE 4-COUMROILCOA.....	18
FIGURA I.6 ETAPA 2 DE LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE ANTOCIANINAS, FORMACIÓN DE NARINGENINA.....	18
FIGURA I.7 BIOSÍNTESIS DE ANTOCIANINAS.....	19
FIGURA II.1 CROMATOGRAMA OBTENIDO EN EL ANÁLISIS DE HPLC DE LOS ESTÁNDARES DE CLORURO DE DELFINIDINA, CLORURO DE CIANIDINA Y CLORURO DE PELARGONIDINA.....	31
FIGURA II.2 CURVA DE CALIBRACIÓN DE LOS ESTÁNDARES DE DELFINIDINA (SUPERIOR), CIANIDINA (MEDIO) Y PELARGONIDINA (INFERIOR) EN SEIS PUNTOS CUANTIFICADOS (0, 20, 40,120, 160 Y 200 2 MG/ML).	32
FIGURA II.3 GRAFICAS DE INTERACCIÓN E INTERVALO DE DIFERENTES TRATAMIENTOS PARA LA EXTRACCIÓN DE CIANIDINA EN 100 MG DE LÍGULAS LIOFILIZADOS. A) INTERACCIÓN ENTRE LA ACTIVACIÓN-SOLVENTES; B) INTERACCIÓN ENTRE HIDRÓLISIS-SOLVENTES Y C) INTERACCIÓN ENTRE LA ACTIVACIÓN-HIDROLISIS. DÓNDE: AA: ACTIVACIÓN; DA: DESACTIVACIÓN; AC: ACETONA; MF: METANOL-ACIDO FÓRMICO; MA: METANOL-AGUA; MAA: METANOL-AGUA-ACIDO FÓRMICO; MA: METANOL-AGUA; MAA: METANOL-AGUA-ACIDO FÓRMICO; H: HIDRÓLISIS; SH: SIN HIDRÓLISIS.	34
FIGURA II.4 GRAFICAS DE INTERACCIÓN ENTRE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS UTILIZADOS PARA LA EXTRACCIÓN DE CIANIDINA EN 100 MG DE LÍGULAS LIOFILIZADOS. AA: ACTIVACIÓN; DA: DESACTIVACION; AC: ACETONA; MF: METANOL-ACIDO FÓRMICO; MA: METANOL-AGUA; MAA: METANOL-AGUA-ACIDO FÓRMICO; MA: METANOL-AGUA; MAA: METANOL-AGUA-ACIDO FÓRMICO. H: HIDRÓLISIS; SH: SIN HIDRÓLISIS.	35
FIGURA III.1 ESQUEMA DE PROPAGACIÓN DE EXPLANTES DE CRISANTEMO.....	40
FIGURA III.2 PROCESO DE ACLIMATIZACIÓN DE PLANTAS DE CRISANTEMO A CONDICIONES EX VITRO.....	41
FIGURA III.3 OBTENCIÓN DE BOTONES FLORALES DE CRISANTEMO MEDIANTE LA REDUCCIÓN LUMÍNICA.	42
FIGURA III.4 PRODUCTO DE LA EXTRACCIÓN DE ARN EN UN GEL DE AGAROSA AL 1% CON 5 µL DE BROMURO DE ETIDIO. EXTRACCIÓN DE ARN EN LAS DIFERENTES ETAPAS DE DESARROLLO FLORAL: IDENTIDAD CELULAR (A), DUPLICACIÓN CELULAR (B), ALARGAMIENTO CELULAR (C.), MADURACIÓN (D) SENESCENCIA (E).	43

FIGURA III.5 PRODUCTOS OBTENIDOS DE LA AMPLIFICACIÓN POR PCR CON OLIGOS PARA ACTINA (LÍNEA 2) Y F3'H (LÍNEA 3) SEPARADOS EN UN GEL DE AGAROSA AL 1% TENIDO CON BROMURO DE ETIDIO, CORRIDAS JUNTO CON EL MARCADOR DE PESO MOLECULAR (LÍNEA 1).	43
FIGURA III.6 ALINEACIÓN DEL GEN F3'H CON SECUENCIAS ORTÓLOGAS REPORTADAS EN LA BASE DE DATOS NCBI.	45
FIGURA III.7 ANÁLISIS FILOGENÉTICO CONSTRUIDO A PARTIR DE 33 SECUENCIAS REPORTADAS EN NCBI Y LA SECUENCIA DE LA SECUENCIA KT892061.	46
FIGURA III.8 SECUENCIA PARCIAL DEL GEN ACTINA (KT892062) Y SU ALINEACIÓN CON OTRAS SECUENCIAS REPORTADAS EN LA NCBI.	48
FIGURA III.9 ANÁLISIS FILOGENÉTICO CONSTRUIDO A PARTIR DE 10 SECUENCIAS REPORTADAS EN NCBI Y LA SECUENCIA PARCIAL DEL GEN <i>ACTINA</i> (DGACT) EN BOTONES FLORALES DE CRISANTEMO.	49
FIGURA IV.1 ETAPAS DE DESARROLLO FLORAL DE CRISANTEMO. IDENTIDAD CELULAR (I.C.), DUPLICACIÓN CELULAR (D.C.), ALARGAMIENTO CELULAR (A.C.), MADURACIÓN (MA.) Y SENESCENCIA (SE.)	52
FIGURA IV.2 CROMATOGRAMAS OBTENIDOS DE LAS CINCO ETAPAS DE DESARROLLO FLORAL. IDENTIDAD CELULAR (A), DUPLICACIÓN CELULAR (B), ALARGAMIENTO CELULAR (C), MADURACIÓN (D) Y SENESCENCIA (E) CURVA DE CALIBRACIÓN DE LOS ESTÁNDARES DE CLORURO DE DELFINIDINA, CLORURO DE CIANIDINA Y CLORURO DE PELARGONIDINA (F).	53
FIGURA IV.3. CONTENIDO DE CIANIDINA EN BOTONES FLORALES (■) Y LÍGULAS (□) DURANTE LAS DIFERENTES ETAPAS DE DESARROLLO FLORAL. EL * REPRESENTA LOS RESULTADOS ESTADÍSTICAMENTE DIFERENTES CON UNA $P \leq 0.005$	54
FIGURA IV.4. EVALUACIÓN DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE $MgCl_2$ (0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4 Y 4.5) SOBRE LA AMPLIFICACIÓN DE F3'H, DONDE TN: TESTIGO NEGATIVO; MM: MARCADOR DE MASA MOLECULAR; 2*: TESTIGO POSITIVO.....	55
FIGURA IV.5 CURVA DE DESNATURALIZACIÓN DE LOS TRANSCRIPTOS DE LOS GENES F3'H (A) Y ACTINA (B) EN LAS DIFERENTES ETAPAS DE DESARROLLO FLORAL.	56
FIGURA IV.6 DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE CDNA UTILIZADO COMO MOLDE PARA LOS ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE F3'H. A) CUANTIFICACIÓN RELATIVA Y B) CICLOS CUANTIFICADOS (CQ).....	57
FIGURA IV.7 GRAFICA DE MEDIA EN LA CUAL SE MUESTRAN LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>F3'H</i> EN LAS DIFERENTES ETAPAS DE DESARROLLO FLORAL (EDF). EN EL EJE DE LAS X LAS EDF: IDENTIDAD CELULAR (I.C), DUPLICACIÓN CELULAR (D.C.), ALARGAMIENTO CELULAR (A.C), MADURACIÓN (MA.) Y SENESCENCIA (SE).....	58
FIGURA IV.8 GRAFICO DEL MODELO AJUSTADO OBTENIDO DURANTE LA CORRELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE CIANIDINA Y LA EXPRESIÓN DEL GEN F3'H, EN CINCO ETAPAS DE DESARROLLO FLORAL EN PLANTAS DE CRISANTEMO.....	59
FIGURA V.1. PLÁSMIDOS EMPLEADOS PARA LA INOCULACIÓN. (A Y B) HEMIDÍMEROS DE EUMV-YP, EN COLOR ROJO SE SEÑALAN LAS REGIONES COMUNES (CR), EN COLOR GRIS EL GENOMA VIRAL Y EN COLOR NEGRO EL PLÁSMIDO PBLUESCRIPT SK +.	62
FIGURA V.2. PROCESO DE INOCULACIÓN CON LOS DIFERENTES VECTORES EN PLANTAS DE CRISANTEMO. EQUIPO PARA LA INOCULACIÓN (A), PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA LA INOCULACIÓN (B Y C), SISTEMA DE INOCULACIÓN (D), PLANTA DE	

CRISANTEMO INOCULADA (E): HOJA BOMBARDEA (E1) Y HOJA NO BOMBARDEADA (E2), INCUBACIÓN DE LAS PLANTAS BOMBARDEADAS (F).	66
FIGURA V.3. GEL DE AGAROSA AL 1%, PARTE SUPERIOR ADN DE HOJAS BOMBARDEADAS Y LA PARTE INFERIOR ADN DE HOJAS VECINAS CON CINCO PLANTAS INOCULADAS. A- MG- QUELATASA (PEUMVYP:ΔAV1:CHLI). B.- VIRUS SILVESTRE (PEUMVYP). C.- VECTOR VACIO (EUMV-YP:ΔAV1). D.- VECTOR EUMV-YP:ΔAV1-F3`H. E.- TESTIGO NEGATIVO.....	68
FIGURA V.4. PRODUCTO DE LA AMPLIFICACIÓN DEL PCR EN UN GEL DE AGAROSA AL 1% DE LAS MUESTRAS DE ADN DE LAS PLANTAS INOCULADAS. EN EL GEL SE PUEDE OBSERVAR LAS FECHAS QUE SEÑALA A LA BANDA ENTRE LA 600 Y 550 PB, EL CUAL CORRESPONDE AL GEN DEL COMPONENTE A.....	69
FIGURA V.5. PARTE SUPERIOR DE LA IMAGEN PRODUCTO DE LA AMPLIFICACIÓN POR PCR, EN LA CUAL SE AISLARON TRES BANDAS (EN RECUADRO). PARTE INFERIOR DE LA IMAGEN SE OBSERVA EL PRODUCTO LAS RE-AMPLIFICACIÓN DE LAS BANDAS AISLADAS EN UN GEL DE AGAROSA AL 1%.	70
FIGURA V.6. ALINEAMIENTO DE LA SECUENCIA PARCIAL DEL GEN QUE CODIFICA PARA EL COMPONENTE A DEL VIRUS EUMV-YP EN SECUENCIAS REPORTADAS.....	72
FIGURA V.7. PLANTAS DE CRISANTEMO INOCULADAS CON EL VECTOR PEUMVYP:ΔAV1:CHII PARA SILENCIAR EL GEN QUE CODIFICA A MAGNESIO QUELATASA DURANTE LOS 8, 12, 18, 22, 28 Y 33 DÍAS POSTERIORES A LA INOCULACIÓN (DPI).....	73
FIGURA V.8. PRODUCTO DE LA AMPLIFICACIÓN DEL PCR-TR EN UN GEL DE AGAROSA AL 1% DE PLANTAS INOCULADAS CON LOS DIFERENTES CONSTRUCCIONES: A- MG- QUELATASA (PEUMVYP:ΔAV1:CHLI). B.- VIRUS SILVESTRE (PEUMVYP). C.- VECTOR VACIO (EUMV-YP:ΔAV1). D.- VECTOR EUMV-YP:ΔAV1-F3`H.....	74
FIGURA V.9. GRÁFICAS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN EUMV-YP DIRIGIDO AL GEN AC1 A PARTIR DE DIFERENTES MUESTRAS DE ADN EN PLANTAS INOCULADAS CON LAS DIFERENTES CONSTRUCCIONES MEDIANTE PCR-TR. CUANTIFICACIÓN RELATIVA (A), CICLOS CUANTIFICADOS “CQ” (B) Y MELTING CURVE (C). EN ROJO AMPLIFICACIÓN DEL GEN AC1 A PARTIR DEL TESTIGO POSITIVO.....	75
FIGURA V.10. PRODUCTO DE LA EXTRACCIÓN DE ARN EN BOTONES FLORALES EN LA ETAPA DE ALARGAMIENTO CELULAR “C” EN PLANTAS INOCULADAS CON LOS DIFERENTES VECTORES CONSTRUIDOS: 1 Y 2: VECTOR MG-QUELATASA (PEUMVYP:ΔAV1:CHLI), 3: VECTOR VIRUS SILVESTRE (PEUMVYP), 4: VECTOR VACIO (EUMV-YP:ΔAV1), 5: VECTOR VIG`S F3`H (EUMV-YP:ΔAV1:F3`H) Y 6: PLANTA SILVESTRE (PS) EN UN GEL DE AGAROSA AL 1% TEÑIDO CON BROMURO DE ETIDIO.	76
FIGURA V.11. CUANTIFICACIÓN RELATIVA DE LOS NIVELES DE TRANSCRIPTOS EN LA EXPRESIÓN DEL GEN F3`H /ACTINA MEDIANTE PCR-TR EN LA ETAPA DE ALARGAMIENTO CELULAR “C”. VA Y VB: VECTOR MG-QUELATASA (PEUMVYP:ΔAV1:CHLI), VC: VECTOR VIRUS SILVESTRE (PEUMVYP), VD: VECTOR VACIO (EUMV-YP:ΔAV1), VE: VECTOR VIG`S F3`H (EUMV-YP:ΔAV1:F3`H) Y PS: PLANTA SILVESTRE.	77
FIGURA V.12. GRAFICA DE MEDIA Y GRAFICA DE DISPERSIÓN EN LA CUAL SE MUESTRAN LA EXPRESIÓN DEL GEN F3`H EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS (VECTORES). EN EL EJE DE LAS X LOS TRATAMIENTOS: VA Y VB: VECTOR MG-QUELATASA (PEUMVYP:ΔAV1:CHLI). VC: VECTOR VIRUS SILVESTRE (PEUMVYP). VD: VECTOR VACIO (EUMV-YP:ΔAV1). VE: VECTOR VIG`S F3`H (EUMV-YP:ΔAV1:F3`H) Y PS: PLANTA SILVESTRE.	78

FIGURA V.13. CROMATOGRAMAS OBTENIDOS EN EL ANÁLISIS EN PLANTAS INOCULADAS A Y B: VECTOR MG-QUELATASA (PEUMVYP:ΔAV1:CHLI), C: VECTOR VIRUS SILVESTRE (PEUMVYP), D: VECTOR VACIO (EUMV-YP:ΔAV1), E: VECTOR VIG'S F3'H (EUMV-YP:ΔAV1:F3'H), F: PLANTA SILVESTRE Y CROMATOGRAMA DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DEL ESTÁNDAR CLORURO DE CIANIDINA (CC).	80
FIGURA V.14. CONCENTRACIÓN DE CIANIDINA DURANTE LA ETAPA ALARGAMIENTO CELULAR (A.C.), EN BOTONES FLORALES DE CRISANTEMO VAR. MICROMARGARA EN PLANTAS INOCULADAS MEDIANTE HPLC. EN EL EJE DE LA Y INDICA LA CONCENTRACIÓN DE ANTOCIANINAS Y EL EJE DE LA X INDICA LOS VECTORES UTILIZADAS PARA LA INOCULACIÓN.....	81
FIGURA V.15. GRAFICA DE MEDIAS DE LA CONCENTRACIÓN DE CIANIDINA DURANTE LA ETAPA DE ALARGAMIENTO CELULAR EN BOTONES FLORALES EN PLANTAS INOCULADAS. EN EL EJE DE LAS X PLANTAS INOCULADAS CON LOS DIFERENTES VECTORES.....	81

Resumen

El Crisantemo es una de las plantas ornamentales más importantes en México, con un valor de producción de 1,050,941 mdp en el 2013 (SIAP-SAGARPA, 2014). Una de las características que influye en la preferencia de los consumidores es la coloración de los pétalos, la cual depende de la acumulación de pigmentos como las antocianinas. En diferentes trabajos se ha demostrado que la modificación genética de la ruta de antocianinas, producen cambios en el patrón de coloración de los pétalos y con ellos genera nuevos fenotipos florales. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la infección del vector EuMV-YP:ΔAV1:*f3'h* en la expresión del gen *f3'h* y la acumulación de antocianinas en plantas de crisantemo (*D. grandiflorum* Tzvelev) var. Micromargara. Se propagaron y cultivaron plantas de crisantemo var. Micromargara las cuales fueron inducidas a floración, determinando cinco etapas de desarrollo floral (EDF): Identidad celular (I.C), Duplicación celular (D.C), Alargamiento celular (A.C), Maduración (MA) y Senescencia (SE). Cada una de las EDF fue analizada mediante HPLC para determinar y cuantificar la concentración antocianinas, utilizando estándares comerciales de Cloruro de Cianidina, Cloruro de Pelargonidina y Cloruro de Delfinidina en 100 mg en base seca de botón floral. Se estableció un diseño experimental 4x2x2 con los factores: a.-Solventes (Acetona “AC”, Metanol:Acido fórmico “MF” (90:10 v/v), Metanol:Agua “MA” (70:30 v/v) y Metanol-Agua-Acido fórmico “MAA” (70:28:2 v/v/v); b.- Desactivación de la enzima Polifenol Oxidasa (Activación y Desactivación) y c.- Hidrólisis (hidrólisis y sin hidrólisis). De acuerdo al análisis estadístico se observa un efecto significativo en la activación-solvente, solvente-hidrólisis y la interacción entre activación-solvente-hidrólisis, sin embargo la desactivación de la enzima PPO presenta un mayor efecto en el solvente MAA y la hidrólisis de las muestras, concluyendo que el tratamiento utilizado para la extracción de antocianinas corresponde al solvente MAA, la desactivación de la enzima PPO a 100°C por 10 s y la hidrólisis en 100 mg B.S. de muestra. Durante el análisis de HPLC se detectó la presencia de Cianidina en tres EDF en una concentración de 16.79, 6.55 y 3.92 mg/mL utilizando A.C., MA y SE respectivamente en 100 mg en base seca. Las cinco EDF determinadas fueron sometidas a un análisis de expresión del gen *f3'h* involucrado en la acumulación de Cianidina y un gen de referencia *Actina* por PCR y PCR tiempo real (PCR-tr). Los productos amplificados fueron secuenciados y analizados en la base de datos de la NCBI para la comparación, alineación y la elaboración de un árbol filogenéticos. Se amplificó un fragmento de 326 y 602 pb para el gen *f3'h* (KT892061) y *Actina* (KT892062) respectivamente, con un 98% y 88% de similitud con secuencias reportadas. El análisis de la expresión del gen *f3'h* mediante PCR-tr en las cinco EDF, se obtuvo la mayor expresión durante el A.C. con 318.25 RQ en comparación con I.C, D.C, MA y SE, obteniendo una expresión 40.25, 52.02, 45.66 y 4.59 RQ del gen *f3'h* respectivamente, mostrando diferencias significativas con un 95% de confianza. El análisis *in silico* realizado a la secuencia obtenida del gen *f3'h*, agrupó la secuencia con secuencias de la familia de las Asteraceae presentando, una similitud entre 80 y 98 % con otras

especies del mismo grupo. De acuerdo a la correlación de Pearson, la concentración de Cianidina está influenciada por la expresión del gen *f3'h* durante el desarrollo floral en plantas de crisantemo var. Micromargara, por lo cual, los niveles de los transcritos del gen *f3'h* serían regulados positivamente durante el desarrollo floral, con un coeficiente de correlación de 0.89 (r). Para evaluar el efecto de la infección del vector EuMV-YP: Δ AV1:*f3'h*, se inocularon 20 plantas de crisantemo con los vectores: EuMV-YP: Δ AV1, EuMV-YP: Δ AV1:*ChI*, EuMV-YP: Δ AV1 y EuMV-YP: Δ AV1:*f3'h* con cinco plantas por tratamiento y cinco plantas no inoculadas como testigo negativo. Para confirmar la infección de los diferentes vectores se realizó PCR y PCR-tr con primer específicos dirigidos al componente AC. Ambos análisis dieron resultados negativos en la infección. Muestras positivas fueron secuenciadas con un 99 % similitud con *Pepper Golden Mosaic Virus strain Tamaulipas*. El análisis estadístico realizado para la expresión del gen *f3'h* y la concentración de Cianidina en plantas inoculadas no presentaron diferencias significativas entre los diferentes niveles de expresión de los transcritos del gen *f3'h* y el contenido de Cianidina con los diferentes vectores durante el A.C. en botones florales comparados con plantas no inoculadas.

Abstract

Chrysanthemum is one of the most important ornamental plants in Mexico, with a production value of 1,050,941 pesos in 2013 (SIAP-SAGARPA, 2014). One characteristic that influences the consumer preference is the colour of petals, which depends on the accumulation of pigments such as anthocyanins. Different studies have shown that the genetic modification of the anthocyanins pathway, produces changes in the color pattern of the petals and thereby generates new floral phenotypes. The objective of this study was to evaluate the effect of infection of the vector EuMV-YP: $\Delta AV1:f3'h$ in gene expression $f3'h$ and anthocyanin accumulation in chrysanthemum (*D. grandiflorum* Tzvelev) var. Micromargara plants. Plants of chrysanthemum var. Micromargara were propagated and grown and were induced to flowering, identifying five stages of flower development (EDF): Cell Identity (C.I.), Cell duplication (D.C.), Cell elongation (A.C.) Maturation (MA) and Senescence (SE). Each one of the EDF were analyzed by HPLC to determine and quantify the anthocyanins concentration using commercial standards chloride cyanidin, pelargonidin and chloride delphinidin chloride in 100 mg dry base flower bud. 4x2x2 experimental design was established with the factors A.- Solvent (Acetone "AC", Methanol:formic acid "MF" (90:10 v/v), Methanol:water "MA" (70:30 v/v) and methanol-water-formic acid "MAA" (70:28:2 v/v/v); B.- Deactivation of the enzyme polyphenol oxidase "PPO" (activation and deactivation) and C.- Hydrolysis (hydrolysis and without hydrolysis). According to the statistical analysis a significant effect on, activation-solvent, solvent-hydrolysis and interaction between activation-solvent-hydrolysis were observed, however the deactivation of the PPO enzyme has a greater effect on MAA solvent and hydrolysis of the samples, concluding that the treatment used to extract anthocyanins corresponds to solvent MAA, disabling the PPO enzyme at 100 ° C for 10 s and hydrolysis in 100 mg sample. During HPLC analysis the presence of cyanidin three EDF was detected at a concentration of 16.79, 6.55 and 3.92 mg/mL in AC, MA and SE respectively in 100 mg of dry basis. The five determined EDF were submitted to an analysis of expression of $f3'h$ gene involved in the accumulation of cyanidin and a reference gene Actin for PCR and PCR- real time (PCR-rt). The amplified products were sequenced and analyzed in the database of the NCBI for comparison, alignment and development of a phylogenetic tree. A fragment of 326 and 602 bp was amplified for the $f3'h$ gene (KT892061) and actin (KT892062) respectively with 98% and 88% similarity to sequences reported. The analysis of gene expression $f3'h$ by PCR-rt in five EDF showed that the highest expression was obtained for A.C. 318.25 RQ compared with I.C., D.C., MA, SE, obtaining an expression of $f3'h$ gene 40.25, 52.02, 45.66 and 4.59 RQ respectively, showing significant differences with 95% confidence intervals. The in silico analysis of the $f3'h$ gene sequence obtained was grouped within the family of Asteraceae presenting a similarity between 80 and 98% with other species of the group. According to Pearson correlation Cyanidin concentration is influenced by the $f3'h$ gene expression during flower development in plants of chrysanthemum var. Micromargara, therefore, the transcript levels of $f3'h$ gene would be

positively regulated during flower development, with a correlation coefficient of 0.89 (r). To evaluate the effect of the infection vector EuMV-YP: Δ AV1:*f3'h*, twenty chrysanthemum plants were inoculated with the vectors: EuMV-YP: Δ AV1, EuMV-YP: Δ AV1: ChI, -YP EuMV: Δ AV1 and EuMV-YP: Δ AV1:*f3'h* with five plants per treatment and five plants were not inoculated and used as negative control. To confirm the infection of different vectors PCR and PCR-tr with specific primer directed to the AC component were performed. Both tests were negative for infection. Positive samples were sequenced with 99% similarity with *Pepper golden mosaic virus strain Tamaulipas*. The statistical analysis for gene expression *f3'h* and Cyanidin concentration in inoculated plants did not differ significantly between the different levels of expression of transcripts *f3'h* and Cyanidin content with different gene vectors for the AC flower buds in comparison with non-inoculated plants.

Capítulo II. Marco Teórico

II.1 Introducción

La floricultura es una industria billonaria, que incluye la producción, distribución y procesamiento de las plantas de corte y de maceta. Esta industria está basada en dos ejes trascendentales, que son la producción y la demanda del mercado. En cuanto a la demanda, se puede considerar al mercado de la floricultura fluctuante, basado en la novedad del producto. Es la industria agrícola que no solo tiene como objetivo la calidad del producto, sino que además es de preocuparse de la generación de nuevas variedades de plantas de mayor demanda en el mercado actual.

Los productores buscan ofertar nuevas variedades de plantas ornamentales las cuales varían en la intensidad del aroma, prolongación de la vida en anaquel y en la forma y color de los pétalos de las flores (Casanova *et al.*, 2005; Maleka *et al.*, 2013; Chandler & Sanchez 2012; Yamagishi 2013; Zhao & Tao 2015). Esta rápida e intensa búsqueda de nuevas variedades, se hacen que métodos de mejoramiento genético por cruza son demasiado tardado el proceso para un mercado competitivo como la floricultura. Es por ello que se han utilizado métodos biotecnológicos como cultivo de haploides, mutación por irradiación o por exposición a múgatenos (Lema-rumi y Zalewska, 2005; Chandler y Sanchez, 2012; Kumaret *et al.*, 2012; Bahadur *et al.*, 2015), entre otros métodos limitados por la carga genética de la misma planta.

La ingeniería genética es considerada una herramienta valiosa para la generación de nuevas variedades, permitiendo obtener plantas a partir del análisis de los genes contenidos en ella o en otras especies vegetales, modificando rutas metabólicas en la misma. En los últimos años se ha desarrollado una estrategia que aprovecha la capacidad de ciertos virus como método de transformación para el silenciamiento de genes específicos; a esta estrategia se le conoce como silenciamiento de genes inducido por virus (VIGS, del inglés *Virus-induced gene silencing*). VIGS ha sido una herramienta importante para el silenciamiento de los genes PeUFGT3, PeMADS5 y PeMADS6 en *Phalaenopsis* var. Sunset Fire y Sogo Yukidian 'V3' (Hsieh *et al.*, 2013), ChII y NPR1 en plantas de *Nicotiana benthamiana* y *Capsicum annum* (Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013); PDS y INF1 en plantas de *N. benthamiana* (Lee *et al.*, 2013); PDS, CLA, ANS, ANR en plantas de algodón (*Gossypium barbadense*) (Pang *et al.*, 2013); CH y PDS en plantas de petunia (*Petunia hybrida*) (Broderick and Jones, 2014); pMADS3 y FBP6 en petunia (*Petunia hybrida*) (Noor *et al.*, 2014); PDS en *N. benthamiana*, *Arabidopsis ecotipo Col-0*, *Fragaria* × *ananassa* cv. 'Benihoppe', *Rosa sp.* cv. 'Magic Meidiland' y *Dendranthema x grandiflorum* (Ramat.) Kitam. cultivar 'Fall color' (Tian *et al.*, 2014); PDS y ϵ -lcy en *N. benthamiana* (Shi *et al.*, 2014) y PDS en plantas de *Phaseolus vulgaris* (Pflieger *et al.*, 2014).

Se desarrolló un vector derivado del Euphorbia Mosaic Virus–Yucatán Península (EuMV-YP), como una herramienta para la transformación genética de plantas, este vector ha sido probado para silenciar el gen *NPR1* y *ChlI* en plantas de *Capsicum annuum* y *Nicotiana benthamiana*, sin embargo no se logró el silenciamiento en plantas de *C. annuum* solo en *N. benthamiana* (Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013). Lo que muestra que el uso de los vectores no es universal si no limitado a un rango de plantas.

El gen *ChlI* es responsable de la biosíntesis de clorofila, por lo que en las plantas silenciadas con este gen, presenta una disminución de la producción de clorofila, por lo que permite observar cambios en el fenotipo de la planta a simple vista (regiones blanqueadas). En este sentido, el gen *f3'h*, que codifica a una enzima con actividad Dihidroflavonol 4-reductasa (DFR) y Antocianidina sintasa (ANS) podría ser utilizada para evaluar este tipo de biotecnologías de silenciamiento, ya que la enzima F3'H está involucrada en la hidroxilación del carbono 3' del anillo B de la naringenina y del dihidrocaempferol, los cuales son precursores de la formación del pigmento Cianidina cuya acumulación se relaciona con la coloración que va de rosa a magenta en los pétalos.

En el presente trabajo se propuso evaluar el efecto de la infección del vector *pEuMV-YP:ΔAVI:f3h* en la acumulación de cianidina en flores de crisantemo (*D. grandiflorum*) var. Micromargara. Iniciando con el aislamiento, secuenciación y análisis *in silico* de la secuencia del gen resultante; así como la determinación de los cambios de expresión del gen *f3'h* durante el desarrollo floral mediante PCR tiempo real (PCR-tr), y la correlación con el contenido de antocianinas en botones florales. Esta misma correlación fue evaluada en plantas infectadas con el vector *pEuMV-YP:ΔAVI:f3h*.

II.2 Antecedentes

II.2.1 Importancia de la floricultura en México

La floricultura se refiere al cultivo de flores y plantas ornamentales para distintos fines, en escala mundial esta industria tiene un valor de más de 60.8 millones de Euros (Newman, 2011; Maleka *et al.*, 2013). Según las estadísticas de COMTRADE de las Naciones Unidas, el comercio mundial de las cuatro principales plantas ornamentales más comercializadas (rosas, crisantemo, clavel y orquídeas), en el 2014 se obtuvo una exportación de \$4,837'316,994.00 MDD a nivel mundial de (Fig. I.1). En México los productos ornamentales han tenido un gran impacto a las exportaciones y la producción nacional, SIAP-SAGARPA en el 2013, estimó el valor de la floricultura en 5,646 millones de pesos equivalente al 82% del valor total de la producción de frijol en el 2011, siendo los Estados de mayor producción de flores de corte en el país: Estado de México, Morelos, Puebla, Distrito federal, Baja California, Jalisco y otros en menor proporción con una superficie de 18 mil 629 hectáreas destinada al cultivo de flor y plantas en maceta siendo las principales (SIAP-SAGARPA, 2014).

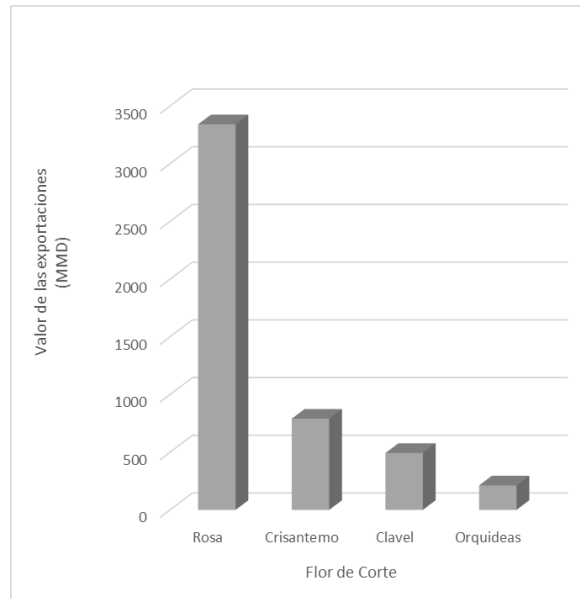


Figura II.1 Valores de las exportaciones de la producción a nivel mundial de plantas ornamentales (Datos obtenidos de la UN-COMTRADE, 2015).

En el 2014, el crisantemo ocupó el segundo lugar de producción cosechada (Fig. I.2), en México es considerado como uno de los cultivos ornamentales más importantes en el mundo, como flor de corte y plantas en maceta, con gran importancia económica en la industria de la floricultura debido a la forma y coloración de sus inflorescencia, (Song *et al.*, 2012; Teixeira da Silva *et al.*, 2013; Teixeira da Silva y Kulus, 2014).

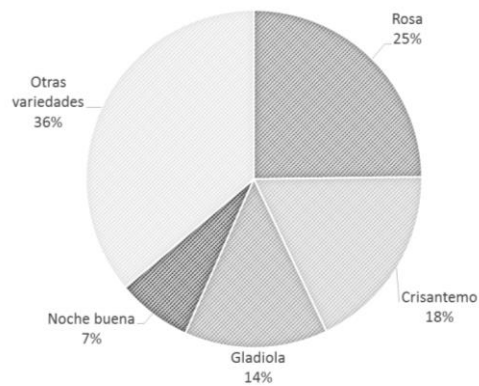


Figura II.2 Principales cultivos ornamentales cosechados en México (Datos obtenidos del SIAP-SAGARPA, 2014).

II.2.2 Descripción del Crisantemo

Dendranthema x grandiflorum (Ramat.) Kitam. [syn. *D. grandiflora* Tzvelev., *D. morifolium* Ramat., y *Chrysanthemum morifolium* (Ramat) Kitamura], pertenece a la familia Asteraceae (Wilson, 2003; Moura *et al.*, 2014), son plantas perennes, con tallos ramificados y pubescentes, rara vez más de 1 m de altura. Sus hojas son ovales, irregularmente cortadas y flores reunidas en capítulos apicales o axilares, con discos y lígulas amarillas centrales de varios colores, dependiendo de la variedad (Fig. I.3).

En general las formas híbridas tienen secciones dobladas, largas lígulas y menudo curiosamente curvado. Los colores, aunque basada en tonos blanco, amarillo, púrpura y rojo, se pueden presentar en tonos innumerables (Moura *et al.*, 2014). Los más importantes tipos de flores de crisantemo comercial incluyen a las *incurvada* (puntas de los pétalos curvados hacia el interior), *anémona* (florete central alargada y de color), *pompones* (flores liguladas tubular cortas; no presenta flores concéntrica), *sencillos* y *semi doble* (tipo margarita con 1-5 verticilos de flores liguladas; floretes visibles), *decorativas* (flores liguladas exterior más largos que los de los centros; floretes disco ocultos), *spiders* (flores liguladas largos, enganchado, y caída), *Fuji* (en forma de araña con los floretes más cortos y menos caída de rayos), *canillas quills* (flores liguladas tubular, no caídos), *spoons* (con la punta del florete aplanados como una cuchara) (Dole y Wilkins, 2004; Anderson, 2007; Moura *et al.*, 2014; NCS, 2015).

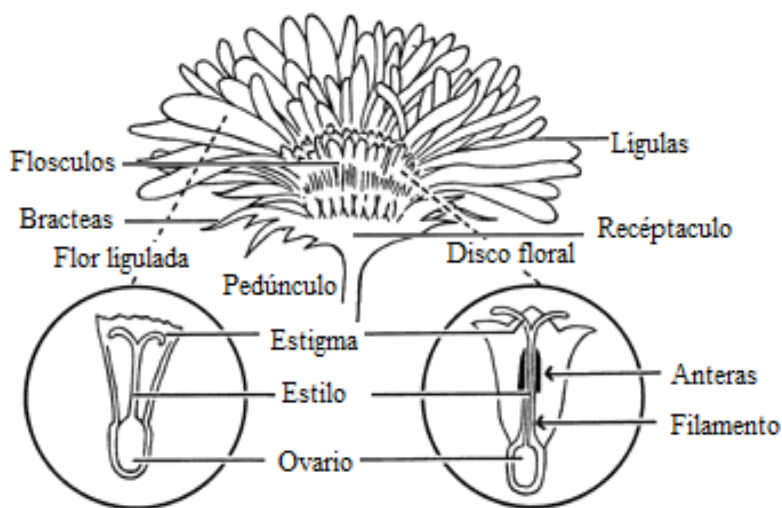


Figura II.3 Estructura morfológica de la flor de crisantemo (modificado de Shchennikova *et al.*, 2004; Teixeira 2014).

En México en el 2013, la producción de crisantemo como flor de corte y maceta fue de 10, 396,539.97 Toneladas, con un valor de \$1'050,941.39 miles de pesos (Tabla 1). Siendo el estado de México con la mayor producción de flores de corte de crisantemo con un 92.29 %

y 67.29 % de plantas en maceta, generando el 89.30% del valor de la producción a nivel nacional (SIAP-SAGARPA, 2014). A pesar de la importancia económica que representa la venta de crisantemo para la economía mexicana, ha habido una reducción del valor de exportación del 25% en los últimos años, esta reducción podría agravarse debido a la fluctuación del comercio de las plantas ornamentales que es basado en la novedad, es por ello que los principales países productores de crisantemo generan nuevas variedades.

Tabla II.1. Valor de la producción nacional de crisantemo durante el 2013 (SIAP-SAGARPA, 2014).

Cultivo	Producción (Ton)	Valor Producción (Miles de Pesos)	Valor de la producción (%)
Gruesa	9,529,819.97	\$1,042,590.53	99.21
Planta	866,720.00	\$8,350.84	0.79
Producción total	10,396,539.97	\$1,050,941.37	

Muchas variedades de crisantemos se han desarrollado mediante cruza y a través de mutaciones inducidas, lo que ha resultado en una gran variedad de colores de la flor, incluyendo blanco, rosado, magenta, rojo, naranja y amarillo. Sin embargo, las plantas de crisantemo carecen del gen *F3'5'H*, gen que codifica a la enzima F3'5'H que hidroxila en el anillo B del dihidrocaempferol y de la dihidroquercetina en las posiciones 3' y 5', formándose la dihidroquercetina misma que está involucrada en la ruta de biosíntesis del pigmento delphinidina. La acumulación de este pigmento se ha asociado en la mayoría de las flores de color púrpura, violeta y azul (Noda *et al.*, 2013).

II.2.3 Cambios de la coloración de las flores por mejoramiento genético

El uso de la biotecnología es una actividad humana cuyos inicios se remontan a los orígenes de la agricultura y la ganadería, es un conjunto de técnicas en la cual se utilizan organismos vivos y sus partes para producir bienes y servicios útiles para la solución de problemas de la sociedad (Solleiro and Briseño, 2003). Diversos métodos biotecnológicos se han utilizado para la generación de nuevas variedades, como la generación de plantas haploides (Anderson and Ascher, 2003), transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens* (Song *et al.*, 2012), silenciamiento de genes inducidos por virus (Hsieh *et al.*, 2010; Broderick y Jones, 2014), mutaciones inducidas por iones (Lema-rumi y Zalewska 2005; Hase *et al.*, 2010); sin embargo estos métodos están limitados por la carga genética de las especies.

Una rama biotecnológica que se ha desarrollado para eliminar la limitación genética es la ingeniería genética, que ha permitido las alteraciones de rasgos o características florales

específicas individuales en variedades de plantas, como la modificación de la forma, fragancia, duración de la vida de florero, la morfología de la planta y color (Casanova *et al.*, 2005; Chandler y Sanchez, 2012; Brugliera *et al.*, 2013; Chandler, 2013; Noda *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014c).

La ingeniería genética ha sido ampliamente aplicada por los investigadores para la generación de plantas modificadas en la coloración de sus flores y de este modo satisfacer las demandas en el mercado (Chandler and Sanchez, 2012); por ejemplo se ha logrado la generación de plantas de clavel con flores con tonos azulaceos, esta coloración no se obtiene mediante la cruce entre plantas silvestres de esta especie. En la tabla I.2, se presenta una lista de especies que han sido transformadas genéticamente para modificar la coloración de los pétalos.

Tabla II.2. Cambio de la coloración de flores mediante el silenciamiento de genes.

Especie	Cambio de la coloración	Referencia
Clavel (<i>Dianthus caryophyllus</i>)	Rojo a blanco	(Zuker <i>et al.</i> , 2002)
Rosa (<i>Rosa x hybrid</i>)	Rojo a rosado claro	(Katsumoto <i>et al.</i> , 2007)
Ciclamen (<i>Cyclamen persicum</i>)	Morado a rojo/rosado	(Boase <i>et al.</i> , 2010)
Gentiana (<i>Gentiana triflora</i>)	Azul a blanco	(Nakatsuka <i>et al.</i> , 2010)
Phalaenopsis (<i>Phalaenopsis sp</i>)	Rosado a rosado claro	(Chen <i>et al.</i> , 2011)
Torenia (<i>Torenia x hybrida</i>)	Azul/violeta a rosado	(Suzuki <i>et al.</i> , 2000; Nakamura <i>et al.</i> , 2010)
Torenia (<i>Torenia fournieri</i>)	Violeta a blanco/violeta en diferentes tonalidades	(Aida <i>et al.</i> , 2000)
Lily (<i>Tricyrtis spp.</i>)	Roja a blanco	Kamiishi <i>et al.</i> 2011
Crisantemo (<i>Dendranthema x grandiflorum</i> (Ramat.) Kitam.)	Rojo a morado/azul	(He <i>et al.</i> , 2013; Noda <i>et al.</i> , 2013)
Petunia (<i>Petunia hybrida</i>)	Morado/rojo a blanco, rosado claro.	(Hase <i>et al.</i> , 2010; Broderick y Jones, 2014)
Lotus (<i>Lotus japonicus</i>)	Amarillo claro a anaranjado	(Suzuki <i>et al.</i> , 2007)
Tabaco (<i>Tabacum sp</i>)	Rosado a rojo/rosado claro	(Nakatsuka <i>et al.</i> , 2005)
Catarantus (<i>Catharanthus roseus</i>)	Rojo a patrones blancos con rojo	(Sung <i>et al.</i> , 2014)

II.2.4 Genes involucrados en la coloración de las flores de crisantemo

La coloración de las flores que es percibida por los seres humanos se deben a la presencia de compuestos que se conoce como “pigmentos” (Tanaka *et al.*, 2013), los cuales se acumulan en las vacuolas de las células de las plantas (Nishihara *et al.*, 2013). En general, hay tres tipos de pigmentos que contribuyen a la coloración de las flores: betalainas, carotenoides y flavonoides (Tanaka *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 2009; Hughes *et al.*, 2013; Tanaka *et al.*, 2013). Los flavonoides a los que se les atribuye la coloración de la flor en la mayoría de las angiospermas se conocen como antocianinas, la acumulación de las antocianinas en los pétalos de las flores está relacionado con una gama de colores que abarcan desde el rojo hasta el azul (Zhao and Tao, 2015).

Las antocianinas estructuralmente están formadas de 2-fenil-benzopirilio con sustituciones de glucósidos y acilglicosidos. La estructura básica de antocianinas consisten en un anillo (C-6 - anillo A y C-3 anillo C) que lleva un segundo anillo aromático (C-6 - anillo B) en la posición 2 (Fig. I.4). Las diversas antocianinas difieren en número y posición de la grupos hidroxilo y / o éter de metilo unidos a los carbonos 3, 5, 6, 7, 3', 4' posiciones y/o 5'. A pesar del hecho de que 31 antocianinas monómeras diferentes han sido identificadas, 90% de las de origen natural antocianinas se basan en sólo seis estructuras (30% en cianidina, 22% en delfinidina, 18% en pelargonidina y 20% en peonidina, malvidina y petunidina), (Nakamura *et al.*, 2010; Falcone Ferreyra *et al.*, 2012; Ananga *et al.*, 2013; Tanaka *et al.*, 2013).

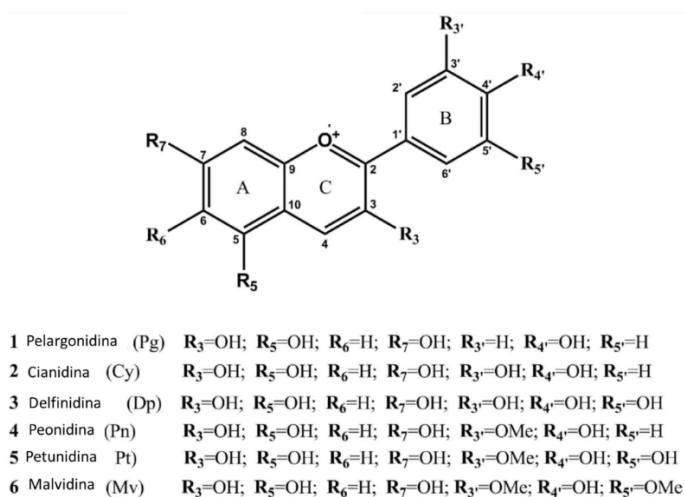


Figura II.4 Estructura común de las antocianinas y las sustituciones más comunes (Modificado de Ananga *et al.*, 2013)

En cuanto al número y tipo de sustituciones en la estructura de las antocianinas, un incremento en la hidroxilación se produce desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas. Las antocianinas poseen diferentes funciones en la planta como son la atracción de polinizadores para la posterior dispersión de semillas y la protección de la planta contra los efectos de la radiación ultravioleta y contra la contaminación viral y microbiana (Sung *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2013; Tanaka *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014b; Zhao y Tao, 2015).

La síntesis de los diferentes pigmentos tipo antocianina en las flores, requiere de la actividad de una serie de enzimas que participan en la vía de biosíntesis de las antocianinas, la cual se divide en tres etapas. La primera etapa, inicia con la conversión de la fenilalanina a cumarato-CoA catalizado por las enzimas: fenilalanina amonio liasa (PAL), cinamato-4-hidroxilasa (C4H) y 4-cumarato: CoA ligasa (4CL), que es un paso común en la vía de síntesis de muchos metabolitos secundarios (Fig. I.5).

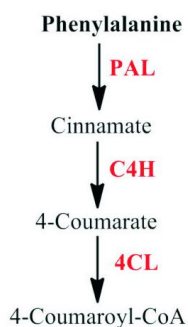


Figura II.5 Etapa 1 de la biosíntesis de antocianinas, formación de 4-coumroil-CoA

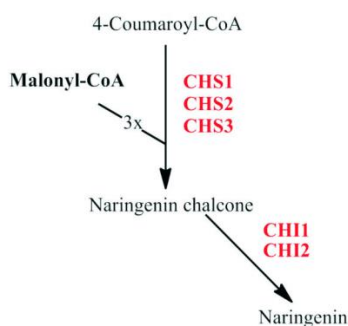


Figura II.6 Etapa 2 de la ruta de biosíntesis de antocianinas, formación de naringenina.

La segunda etapa involucra la formación de la naringinina, para lo cual se condensan una molécula de cumarato-CoA y tres moléculas de malonil-CoA, la reacción es catalizada por la enzimas chalcona sintasa (CHS), produciendo a 4,2',4',6'-Tetrahidroxychalcona (naringinerina chalcona), la formación de naringinina es catalizada por la enzima chalcona isomerasa (CHI, Fig. I.6). La última etapa es a partir de naringinina, el cual es un punto de

divergencia, que dirigen la formación a tres moléculas: Dihidroquercetina, Dihidrokaemferol y Dihidromiricetina. La enzima flavanona-3-hidroxilasa (F3H), cataliza la hidroxilación del carbono 3 del anillo C de naringinina se forma Dihidrokaemferol; si la enzima flavonoide 3' hidroxilasa (F3'H), cataliza la hidroxilación del carbono 3' del anillo B de Dihidrokaemferol formara a Dihidroquercetina, si en la molécula de dihidrokaemferol es catalizada por la enzima flavonoide 3', 5' hidroxilasa (F3'5'H) en el carbono 3'y 5' del anillo B originando a Dihidromiricetina. La tercera etapa es la formación de antocianinas, en la cual Dihidroquercetina, Dihidrokaemferol y Dihidromiricetina es catalizada por dihidroflavonol 4-reductasa (DFR) y antocianidina sintasa (ANS) produciendo Cianidina, Pelargonidina y Delphinidina respectivamente (Fig. I.7) (Zhao and Tao, 2015).

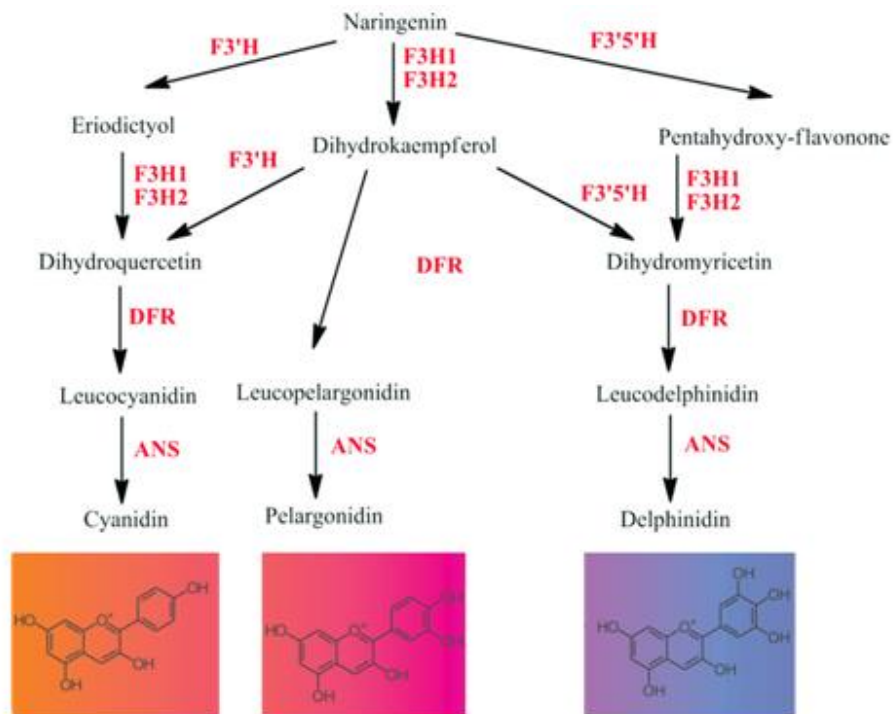


Figura II.7 Biosíntesis de antocianinas

Las plantas de crisantemo expresan el gen que codifica a la enzima flavonoide 3'-hidroxilasa (F3'H) y por lo tanto se acumula cianidina en sus inflorescencias que aparecen de color rosa/rojo (Brugliera *et al.*, 2013). Sin embargo, la ausencia de la producción y acumulación de delfinidina, se debe a que en su genoma del crisantemo no está presente el gen que codifica a la enzima flavonoide 3',5'-hidroxilasa (F3',5'H), por lo que estas plantas carecen de las tonalidades púrpura, violeta o azules en flores (Noda *et al.*, 2013). En estudios previos con crisantemo, el gen *f3',5'h*, extraído en la planta petunia, fue introducido a planta crisantemo por transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens*, obteniendo flores de color rojo a naranja brillante y amarillo cuando los brotes se convirtieron en flores completamente abiertas (Seo *et al.*, 2007), sin lograr la obtención de flores de colores purpúreos. Este tipo de investigaciones ha tenido gran impacto a nivel

comercial y científico, ya que en los últimos años se han registrado cientos de patentes que protegen métodos para la transformación genética de las plantas, por lo que es de gran interés proponer nuevos métodos de modificar genéticamente, ya sea para sobreexpresar o silenciar genes en plantas para inducir cambios en la coloración de las flores.

II.2.5 Silenciamiento de genes inducidos por virus (VIGS)

El silenciamiento de un gen mediante VIGS es un mecanismo de regulación negativa de la expresión génica (Chaves-Bedoya and Ortiz-Rojas, 2011), es llevado a cabo mediante el empleo de virus recombinantes, capaces de inducir la degradación de los transcritos de la planta de manera selectiva (Robertson, 2004). Debido a su relativa flexibilidad, los virus de plantas han emergido como herramientas poderosas para estudios funcionales y son crecientemente explotados para este propósito. Varios virus de ARN o ADN con diferentes rangos de hospederos han sido desarrollados como vectores VIGS, principalmente en el hospedero permisible *Nicotiana benthamiana* (Robertson, 2004). La primera evidencia acerca de la capacidad de virus fitopatogenos para inducir silenciamiento de genes (VIGS) surgió al observar que plantas transgénicas conteniendo un gen potyviral se recuperaron de la infección del mismo potyvirus y los nuevos brotes permanecieron aparentemente resistentes al mismo virus, pero fueron susceptibles a otros (Lindbo *et al.*, 1993) .

Se puede mencionar que el silenciamiento de genes es un sofisticado sistema de defensa mediante el cual las plantas disparan, en respuesta a infecciones localizadas de virus fitopatogenos, un mecanismo de degradación de ARN viral (Jovel and Ramirez, 2002). Para que se lleve a cabo este proceso, en un nivel de silenciamiento significativo se requiere insertar en el genoma del virus un fragmento del gen de interés con un tamaño entre 90 pares de base (pb) y hasta una longitud de 800 pb, (Peele *et al.*, 2001), esta secuencia podrá ser introducida reemplazando la región que codifica para la proteína de la cápside (CP) en los geminivirus (Kjemtrup *et al.*, 1998).

Sin embargo, la longitud mínima para activar el silenciamiento es de 25 a 33 nucleótidos, con un 100% de identidad para silenciar transgenes y genes endógenos de la planta (Thomas *et al.*, 2001). Se cree que la eficiencia de los VIGS se basa principalmente en la capacidad de los virus para invadir al hospedante y replicarse a un nivel suficiente en el tejido blanco (Faivre-rampant *et al.*, 2004), además de factores externos como son el fotoperíodo, la edad de la planta, la humedad relativa, la temperatura y la intensidad de la luz (Kotakis *et al.*, 2010).

Algunas investigaciones sobre el movimiento y la supresión del *Tobacco Rattle Virus* (TRV) dentro de *N. benthamiana*, demostraron que el sistema de silenciamiento de VIGS reduce significativamente la acumulación de transcritos blanco, pero que esta eficiencia es aumentada si se incorpora en el vector otras proteínas complementarias como el gen que codifica a la proteína TRV-2b, la cual incrementa la eficiencia de infección y

silenciamiento por VIGS (Valentine *et al.*, 2004). El TRV ha sido utilizado para la construcción de un vector para el silenciamiento de genes en raíces en un amplio rango de especies, especialmente en genes involucrados en la división celular, diferenciación y resistencia del hospedero durante la invasión por nemátodos. Se sabe que el vector TRV es eficiente para invadir exitosamente las raíces y los tejidos meristemáticos y ha sido usado como un vector para la expresión de genes dentro de las raíces de las plantas (MacFarlane y Popovich, 2000; Velásquez *et al.*, 2009).

Desafortunadamente hay complicaciones para la aplicación de VIGS porque involucra el uso de patógenos vegetales genéticamente modificados y deben ser manejados con estricto control. Sin embargo, hay varias ventajas de VIGS sobre otras tecnologías de silenciamiento génico que involucran plantas transgénicas con repeticiones inversas de gen. Primero, las construcciones pueden ser ensambladas por clonación directa en el virus y no involucra el ensamble de repeticiones invertidas que pueden ser inestables durante la propagación en bacterias. Segundo, el procedimiento es rápido, ya que las construcciones de vectores virales pueden ensamblarse en pocos días y desarrollarse en una o dos semanas y tercero su condición natural del vector VIGS (Chaves-Bedoya and Ortiz-Rojas, 2011). El silenciamiento mediante VIGS se ha utilizado como un método eficaz y de forma rutinaria en plantas de *Nicotiana benthamiana* para evaluar las funciones de genes por diversas vías de señalización, especialmente para la resistencia a enfermedades (Brigneti *et al.*, 2004). Siendo algunos de los virus que se utilizan para estudios de silenciamiento de genes mediante VIGS (Tabla I-3).

Tabla II.3. Vectores VIGS desarrollados a partir de virus y hospederos de genes.

Virus	Hospedante (especie vegetal)	Gen silenciado	Referencia
Tobacco rattle virus (TRV)	<i>Striga hermonthica</i>	PDS	(Zhang <i>et al.</i> , 2014b)
	<i>Gossypium barbadense</i>	PDS, CLA, ANS, ANR	(Pang <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Nicotiana benthamiana</i>	PDS, ChIH y HSP101	(Ramegowda <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Nicotiana benthamiana</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i> <i>Rosa sp.</i> <i>D. grandiflorum</i>	PDS	(Tian <i>et al.</i> , 2014)
	<i>Nicotiana benthamiana</i>	PDS Y INF1	(Lee <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Nicotiana benthamiana</i>	PDS, ε-lcy	(Shi <i>et al.</i> , 2014)
	<i>Petunia</i> × <i>hybrida</i>	PDS, CHS	(Broderick and Jones, 2014)
	Bamboo mosaic virus (BaMV)	<i>Nicotiana benthamiana</i> <i>Brachypodium</i> <i>distachyon</i>	PDS, Sul
Barley stripe mosaic virus (BSMV)	<i>Triticum aestivum</i> L.	Era1, Sal1, Cyp707A	(Manmathan <i>et al.</i> , 2013)
Cymbidium mosaic virus (CymMV)	<i>Doritaenopsis sp</i> <i>Phalaenopsis sp.</i>	PeUFGT3,Pe MADS5 y PeMADS6	(Hsieh <i>et al.</i> , 2013)
Tomato Yellow Leaf Curl China Virus (TYLCCNV)	<i>Nicotiana tabacum</i> <i>Solanum lycopersicum</i> <i>Petunia hybrida</i>	CHS, PCNA y sulphur (Su)	Huang <i>et al.</i> 2009
Tomato Golden Mosaic Virus (TGMV)	<i>Nicotiana benthamiana</i>	ChII	(Tuttle <i>et al.</i> , 2012)
Cotton Leaf Crumple Virus (CLCrV)	<i>Gossypium hirsutum</i>	ChII	Tuttle <i>et al.</i> , 2008; Tuttle <i>et al.</i> , 2012)
Bean Pod Mottle Virus (BPMV)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	PDS	Pflieger <i>et al.</i> , 2014
Euphorbia Mosaic Virus- Yucatán Península (EuMV-YP)	<i>Nicotiana benthamiana</i> y <i>Capsicum annum</i>	ChII y NPR1	(Villanueva-Alonzo <i>et al.</i> , 2013)

II.2.6 Descripción de Euphorbia Mosaic Virus (EuMV).

El EuMV, pertenece a la familia Geminiviridae, el cual ha sido asociado con plantas de *Euphorbia heterophylla* sintomáticas en toda la región tropical y el continente Americano (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007; Gregorio-Jorge *et al.*, 2010; Zambrano *et al.*, 2012; Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013). La sintomatología característica observada en plantas infectadas por EuMV son: hinchamiento en las hojas, mosaicos amarillos, deformaciones de los frutos y una disminución del crecimiento de la planta (Fig. I.8). La expresión de esta sintomatología en plantas de pimiento (*Capsicum annuum*), estramonio (*Datura stramonium*) y *Nicotiana benthamiana* en Jalisco, permitió a partir de las mismas la obtención de un aislado denominado EuMV-Jal (Gregorio-Jorge *et al.*, 2010).

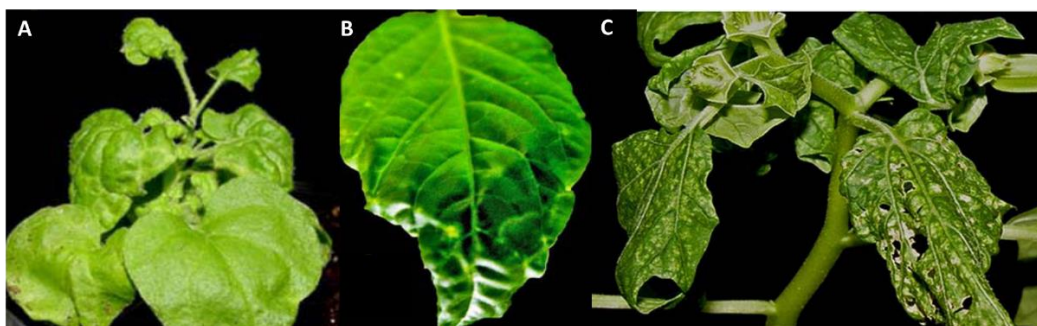


Figura II.8 Síntomas inducidos por EuMV-Jal: A: *N. benthamiana*; B: *C. annuum* y C: *D. stramonium* (Gregorio-Jorge *et al.*, 2010).

II.2.7 Aislamiento y caracterización de EuMV-YP

En el 2007, se logró aislar una cepa de EuMV, proveniente de plantas sintomáticas de *Euphorbia heterophylla* en la Península de Yucatán, el cual fue denominado EuMV-YP; se realizó la caracterización molecular del genoma completo, comparándola con la secuencia típica de un begomovirus bipartido, es decir que está compuesto en dos componentes A y B. El componente A tiene un tamaño de 2,613 nt, mientras que el componente B es de 2,602 nt. Los dos componentes virales comparten una región común (CR) de 165 nt con un 86% de identidad (Fig. I.9 B) (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007).

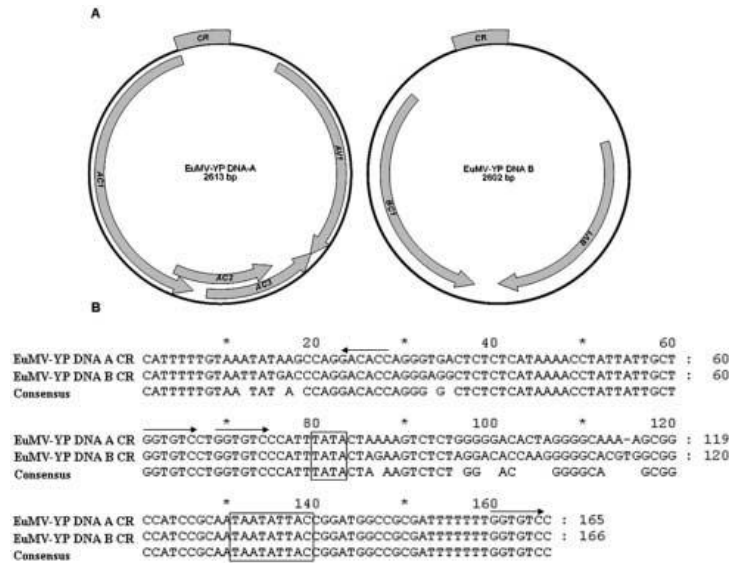


Figura II.9 Diagrama de la organización del genoma del EuMV-YP. A) Mapa circular de la organización del genoma del EuMV-YP mostrando los componentes A y B. B) alineamiento de la región común (CR) del ADN-A y ADN-B del EuMV-YP (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007).

Se ha evaluado el rango de plantas hospedantes en cuatro familias, con 11 especies representativas de Euphorbiaceae, Fabaceae, Solanaceae, Brassicaceae. Los hospederos experimentales identificados fueron: frijol, estramonio, pimienta, Tomate, ricino, chile Habanero, *Nicotiana benthamiana* y tabaco (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007; Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013). La infección fue confirmada mediante PCR de hojas jóvenes, la sintomatología fue observada después de 7-12 días después de la infección. Los resultados mostraron que 100% de plantas de *N. benthamiana*, *N. tabacum* y *Ricinus communis*, dieron positivo, mientras que el 80% de las plantas de chile habanero fueron infectadas (Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013). En contraste plantas de *Arabidopsis thaliana* y *Jatropha curcas* inoculadas con EuMV-YP no presentaron síntomas de la infección, sin embargo, se detectó el ADN viral en las hojas sistémicas por PCR tiempo real.

II.3 Justificación

Las nuevas coloraciones de las flores obtenidas en plantas transformadas es una innovación de gran impacto en el comercio de la industria de la floricultura, que es un claro reflejo de la importancia de la novedad en este mercado. Actualmente se registran nuevas variedades de crisantemo cada año, con gran aceptación en el mercado internacional, lo cual se ha logrado gracias al uso de sistemas de transformación eficientes. Sin embargo, estos sistemas son sensibles a protección intelectual lo que limita su uso para generar nuevas variedades para su explotación comercial.

Los sistemas de transformación mediante VIGS han sido utilizados para transformar genéticamente las plantas con éxito (Tuttle *et al.*, 2012; Pang *et al.*, 2013; Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013; Shi *et al.*, 2014), por lo que muchas investigaciones dirigen sus esfuerzos para generar nuevos vectores de transformación basados en este sistema. Actualmente se cuenta con EuMV-YP aislado en la Península de Yucatán, cuya secuencia puede ser modificada para su uso como sistema de transformación genética de plantas.

El presente trabajo se plantea la posibilidad de modificar la coloración de las flores de crisantemo (*D. grandiflorum*) var. Micromargara, mediante el sistema VIGS para silenciar el gen *flavonoide 3'-hidroxylasa (f3'h)* en la acumulación de cianidina a partir de un vector construido de EuMV-YP,

II.4 Hipótesis

Si el sistema VIGS ha sido utilizado en especies vegetales para silenciar genes, entonces al infectar plantas de crisantemo con el vector *pEuMV-YP:ΔAV1:f3'h*, modificaría la acumulación de los transcritos del gen *f3'h* y la composición de antocianinas acumuladas en sus lígulas.

II.5 Objetivos

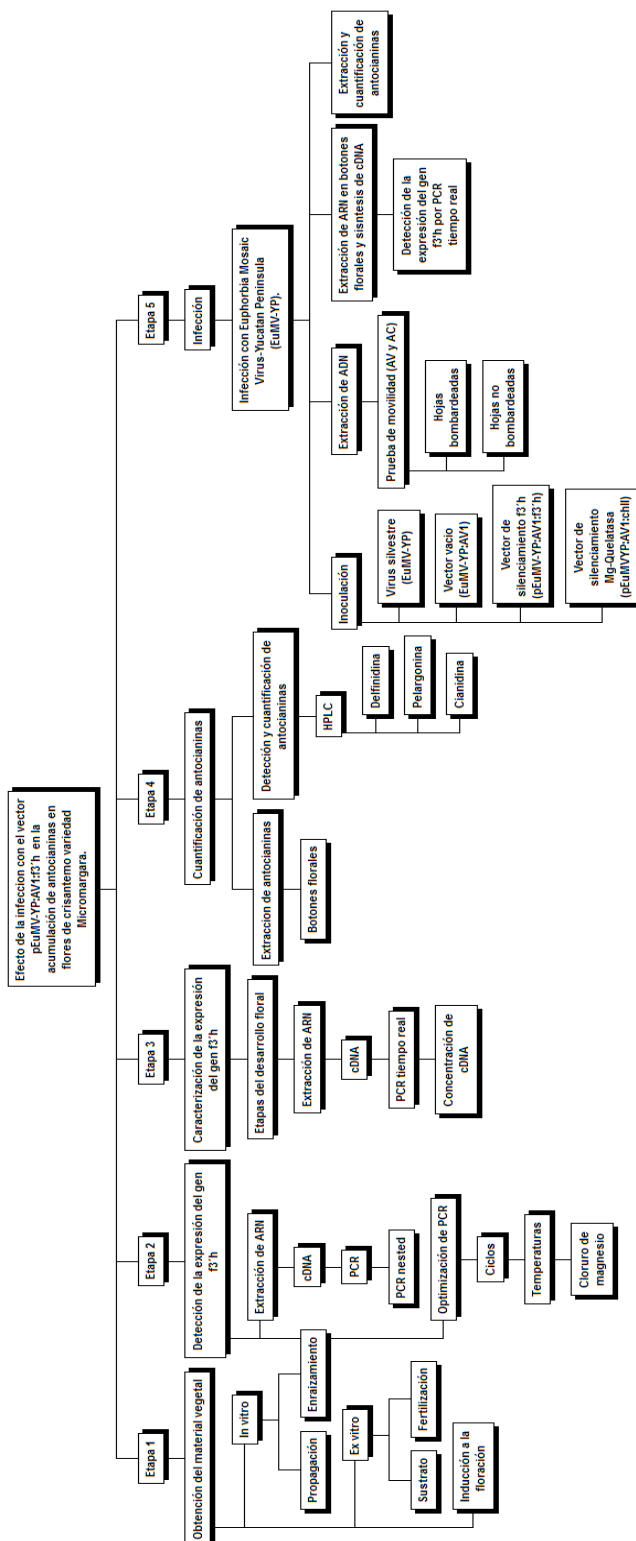
II.5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la infección con el vector *EuMV-YP:ΔAV1:f3'h* en la acumulación de los transcritos del gen *f3'h* y la composición de antocianinas en plantas de crisantemo (*D. grandiflorum*) var. Micromargara.

II.5.2 Objetivos específicos

- Caracterizar la expresión del gen *f3'h* durante el desarrollo de los botones florales de crisantemo var. Micromargara.
- Correlacionar la concentración de antocianinas con la expresión del gen *f3'h* durante el desarrollo de los botones florales de crisantemo var. Micromargara.
- Evaluar el efecto de la introducción del vector *pEuMV-YP:ΔAV1:f3'h* en la expresión del *f3'h* y la composición de antocianinas en plantas de crisantemo var. Micromargara.

II.6 Estrategia experimental



Capítulo III. Cuantificación y detección de antocianinas en botones florales de crisantemo.

III.1 Introducción.

Las antocianinas son un tipo de flavonoides relacionados con la coloración roja, púrpuras, rosadas, amarillas y blancas en las lígulas de crisantemo (Gantait and Pal, 2010), sin embargo, las plantas de crisantemo carecen de la coloración morado, violeta o azules debido a la ausencia de la acumulación de delphinidina (He *et al.*, 2013; Noda *et al.*, 2013). Estudios realizados para la detección y cuantificación de antocianinas durante el desarrollo del botón floral en plantas de crisantemo (*D. grandiflora*), peona (*Paeonia suffruticosa*) y pensamiento (*Viola × wittrockiana*), pudieron identificar pelargonidina, cianidina y delphinidina, respectivamente, la acumulación de dichos compuestos aumenta durante el desarrollo del botón floral hasta su maduración y disminuyen durante la senescencia (He *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014; Hong *et al.*, 2015). Sin embargo, dependiendo del grado de glucosilación se podrían encontrar diferentes derivados de la cianidina que dificultaría los análisis en los que se desea determinar la actividad de la enzima f3'h. En el presente capítulo se describe el método de extracción y análisis que permitió la cuantificación confiable y repetible de la cianidina, por lo cual se evaluaron diferentes mezclas de disolventes, tratamientos de desactivación de la enzima Polifenol Oxidasa (PPO), así como hidrólisis para la liberación de las glucosilaciones.

III.2 Materiales y métodos

III.2.1 Material vegetal

Se obtuvieron flores de Crisantemo (*D. grandiflora*) variedad Micromargara a partir de plantas cultivadas en casa sombra, fertilizadas cada dos días con Bayfolan-Forte, bajo una intensidad lumínica de 5300 lux. La floración fue inducida por una reducción de la intensidad lumínica.

III.2.2 Preparación de botones florales para la extracción

Los botones florales fueron congelados en N₂ líquido, el agua fue retirada por liofilización durante 24 h a -54 °C y una presión constante de 0.120 Mbar. Las lígulas de varios botones fueron pulverizadas y mezcladas para tener una muestra homogénea la cual fue dividida entre los tratamientos.

III.2.3 Extracción de antocianinas en lígulas liofilizadas

Se utilizaron 100 mg B.S. (Base ceca) de lígulas pulverizadas y colocadas en un tubo de microcentrífuga, adicionando 1 ml de la mezcla de disolvente a evaluar: AC (acetona); MF (Metanol: Acido fórmico; 90:10 v/v); MA (metanol: agua; 70:30 v/v); MAA (metanol-agua-acido fórmico 70:28:2 v/v) o agua (testigo negativo). Las muestras fueron agitadas e incubadas a temperatura ambiente (AA) o a 100 °C durante 10 s (DA). Posteriormente, las muestras fueron incubadas a 4 °C por 24 horas, centrifugadas a 10,000 g por 10 m. El

sobrenadante fue filtrado con una membrana de nilón de 0.22 μm (Millipore). A las muestras hidrolizadas se les añadió 400 μL de HCl (3 M) e incubo a 100 $^{\circ}\text{C}$ durante 90 min. Para determinar los tratamientos se estableció un diseño experimental como se describe en la sección II.2.5.

III.2.4 Análisis por HPLC

Las muestras de antocianinas fueron analizadas mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC por sus siglas en inglés) realizadas en el Waters Acquity H Clase UPLC equipado con una bomba cuaternaria (QSM), detector de PDA (UPL), módulo de HPLC (CHM) y administrador sampler (SDI). La adquisición de datos y el control remoto del sistema fueron realizados en la estación de trabajo Empower de Waters Corporation. La separación cromatográfica, se llevó a cabo usando una columna C18 Phenomenex® Kinetex 100A de acero inoxidable analítica (150 mm x 4,60 mm, 5 μm) y el sistema de cartucho Phenomenex® C18. La fase móvil utilizada fue un sistema isocrático de 35% de la fase A y 65% de fase B. La fase A consistió de ácido fórmico 5% en agua y B fue ácido fórmico: agua: metanol (1: 4: 5 v/v). La velocidad de flujo de la fase móvil fue de 0.5 mL/min y el volumen de inyección de 10 μL . La longitud de onda utilizada para la determinación cuantitativa fue de λ 520 nm. Se utilizaron los estándares de antocianinas: Cloruro de Pelargonidina (52926, Sigma-Aldrich), Cloruro de Delfinidina (14389, Sigma-Aldrich) y Cloruro de Cianidina (79457, Sigma-Aldrich), diluidos en metanol grado HPLC. La curva de calibración se realizó con seis puntos: 0, 20, 40, 120, 160 y 200 ppm, inyectando por triplicado cada una de las concentraciones. Los resultados se expresaron en mg/ml de Cianidina, delfinidina y Pelargonidina en 100 mg en B.S.

III.2.5 Análisis estadísticos

Se realizó un diseño factorial 4x2x2 (tabla II.1), el cual consistió X_1 : Solventes, X_2 : Inhibición de la enzima Polifenol Oxidasa (PPO) y X_3 : Hidrólisis. Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) para establecer si existen diferencias significativas, entre las medias de los valores resultantes de los análisis de extracción de antocianinas y la prueba de comparación de medias (Tukey $P \leq 0.05$) para todas las variables registradas, mediante el programa estadístico Statgraphics Centurión XVI versión 16.1.11

Tabla III.1 Diseño experimental para cada factor en la extracción de antocianinas en lígulas liofilizadas.

Numero de tratamientos	Factores				Variable Real	
	Variables codificados			Solventes	Inhibición de la enzima Polifenol Oxidasa (PPO)	Hidrólisis
X ₁	X ₂	X ₃				
1	-1	-1	-1	Acetona "AC".	Desactivación (DA)	Sin hidrólisis "SH"
2	-0.333	-1	-1	Metanol-Acido fórmico "MF".	Desactivación (DA)	Sin hidrólisis "SH"
3	0.333	-1	-1	Metanol-Agua "MA"	Desactivación (DA)	Sin hidrólisis "SH"
4	1	-1	-1	Metanol-Agua-Acido fórmico "MAA"	Desactivación (DA)	Sin hidrólisis "SH"
5	-1	1	-1	Acetona "AC".	Activación (AA)	Sin hidrólisis "SH"
6	-0.333	1	-1	Metanol-Acido fórmico "MF".	Activación (AA)	Sin hidrólisis "SH"
7	0.333	1	-1	Metanol-Agua "MA"	Activación (AA)	Sin hidrólisis "SH"
8	1	1	-1	Metanol-Agua-Acido fórmico "MAA"	Activación (AA)	Sin hidrólisis "SH"
9	-1	-1	1	Acetona "AC".	Desactivación (DA)	Hidrólisis "H"
10	-0.333	-1	1	Metanol-Acido fórmico "MF".	Desactivación (DA)	Hidrólisis "H"
11	0.333	-1	1	Metanol-Agua "MA"	Desactivación (DA)	Hidrólisis "H"
12	1	-1	1	Metanol-Agua-Acido fórmico "MAA"	Desactivación (DA)	Hidrólisis "H"
13	-1	1	1	Acetona "AC".	Activación (AA)	Hidrólisis "H"
14	-0.333	1	1	Metanol-Acido fórmico "MF".	Activación (AA)	Hidrólisis "H"
15	0.333	1	1	Metanol-Agua "MA"	Activación (AA)	Hidrólisis "H"
16	1	1	1	Metanol-Agua-Acido fórmico "MAA"	Activación (AA)	Hidrólisis "H"

III.3 Resultados y discusión

III.3.1 Curva de calibración

Para determinar el contenido de las antocianinas (delfinidina, cianidina y pelargonidina) en las plantas de crisantemo, se caracterizaron los cromatogramas correspondientes a los estándares de cloruro de pelargonidina (52926, Sigma-Aldrich), cloruro de delfinidina (14389, Sigma-Aldrich) y cloruro de cianidina (79457, Sigma-Aldrich), bajo las condiciones mencionadas en la sección de metodología. La delfinidina tuvo un tiempo de retención promedio de 4.98 (± 0.11), la cianidina de 6.99 (± 0.11) y la pelargonidina de 12.43 (± 4.37), como se observa en el cromatograma (Fig. II.1). Los resultados fueron similares a los reportados por otros autores, en los que a pesar de que el tiempo de retención varía por el equipo y la velocidad del flujo, se mantiene el orden de aparición delfinidina, cianidina y pelargonidina (An *et al.*, 2015; Cao *et al.*, 2015). Se realizó una curva de calibración para relacionar el área de cada pico con las concentraciones de los estándares analizados.

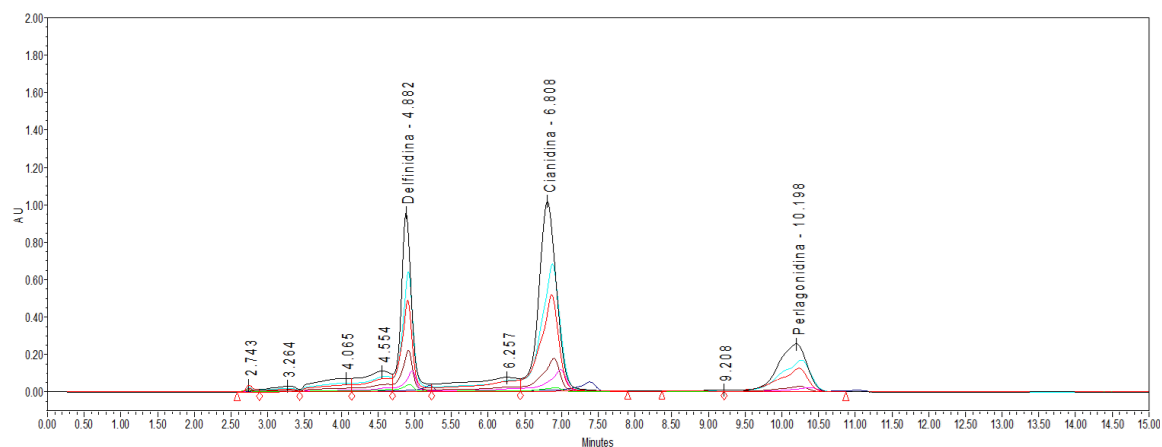


Figura III.1 Cromatograma obtenido en el análisis de HPLC de los estándares de cloruro de delfinidina, cloruro de cianidina y cloruro de pelargonidina.

La curva fue realizada para el estándar de delfinidina, cianidina y pelargonidina, obteniendo una r^2 de 0.993, 0.982 y 0.990 respectivamente; esta curva se repitió cada vez que se requirió calcular la cantidad presente de las antocianinas en una determinada muestra, para dar confiabilidad a los resultados (Fig. II. 2).

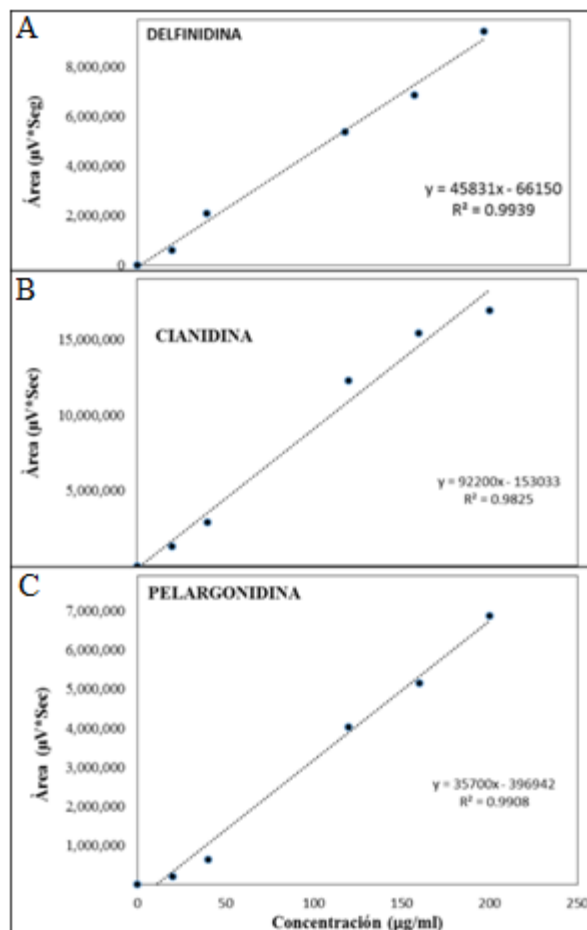


Figura III.2 Curva de calibración de los estándares de cloruro de delfinidina (A), cloruro de cianidina (B) y cloruro de pelargonidina (C) en seis puntos cuantificados (0, 20, 40, 120, 160 y 200 µg/ml).

III.3.2 Establecimiento del método de extracción de cianidina en lígulas liofilizadas

Para la determinación del efecto de los diferentes solventes, hidrólisis de enlaces glucósidos y la desactivación de la enzima PPO en la extracción de cianidina en lígulas liofilizadas, se planteó un diseño experimental 4x2x2 con la variable de respuesta de la concentración de cianidina expresada en mg/ml en 100 mg B.S. de lígulas liofilizados. De acuerdo al análisis estadístico realizado, la mezcla de solvente y la hidrólisis tienen un efecto significativo sobre la cantidad de cianidina cuantificadas por HPLC, en contraste, la desactivación de la enzima PPO no afecta la cantidad de cianidina extraídas. De acuerdo al análisis de ANOVA del análisis del diseño factorial, que permitió determinar la interacción entre los factores, en

donde se observó que el p -valor <0.05 para la interacción entre los disolventes y la activación; ente los disolventes y la hidrolisis y la combinación de los tres factores.

El resultado de la interacción de los factores sobre la concentración de cianidina puede observarse en las gráficas de efectos principales (Fig. II.3), en donde el efecto de la interacción entre activación-solvente (Fig. II.3 A) presenta variación del factor solvente en respuesta a la activación y no hay solapamiento de los intervalos, lo que sugiere que hay un efecto significativo en la interacción de estos dos factores, en la Fig. II.3B, tampoco se observan solapamientos, por lo que podemos concluir que el tipo de solvente utilizado para la extracción de cianidina afecta significativamente la cantidad obtenida, sin embargo, el análisis de la interacción de la desactivación de la PPO y la hidrolisis no tiene un efecto significativo (Fig. II.3C).

La desactivación de la enzima (PPO) por el procesamiento a alta temperatura durante períodos cortos puede impedir la oxidación catalizada por PPO, Sin embargo, la resistencia al calor de PPO depende de la especie y cultivar de la planta de la que se extrae (Jaiswal *et al.*, 2010), en este estudio realizado en la desactivación de la enzima (PPO) se obtuvo una mayor concentración de antocianinas al interactuar con el tratamiento de la hidrólisis y el solvente MAA. Concluyendo que el solvente MAA obtuvo un mayor efecto en la extracción de cianidina cuando se realiza la hidrólisis y la desactivación de la enzima PPO a 100°C por 10 s, en 100 mg de lígulas liofilizadas (Fig. II.3), con un nivel de confianza del 95% y un p -valor <0.05 .

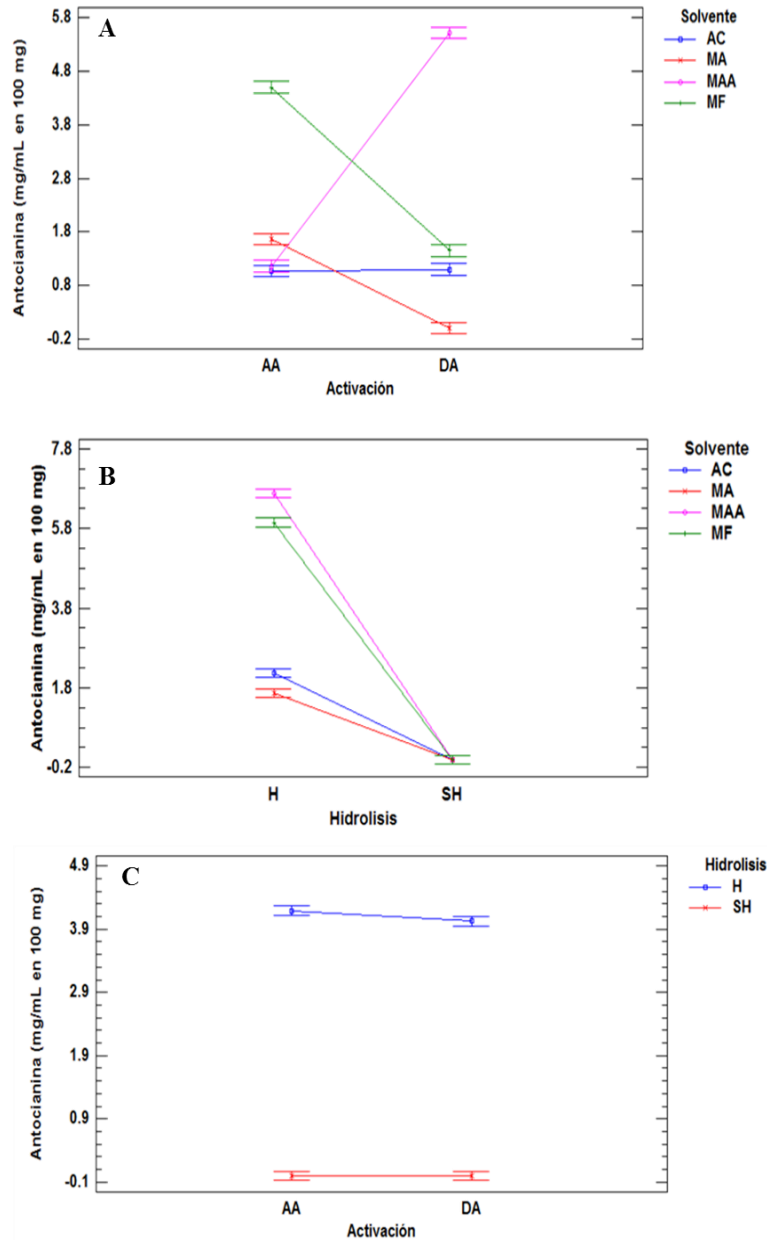


Figura III.3 Graficas de interacción e intervalo de diferentes tratamientos para la extracción de Cianidina en 100 mg de lígulas liofilizados. A) Interacción entre la activación-solventes; B) Interacción entre hidrólisis-solventes e C) Interacción entre la activación-hidrólisis. Dónde: AA: Activación; DA: Desactivación; AC: Acetona; MF: Metanol-Acido fórmico; MA: Metanol-Agua; MAA: Metanol-Agua-Acido fórmico; MA: Metanol-Agua; MAA: Metanol-Agua-Acido fórmico; H: Hidrólisis; SH: Sin Hidrólisis.

De acuerdo a las gráficas de medias de LSD obtenidas en el análisis estadístico se puede observar que no existe una diferencias estadísticamente significativa en el tratamiento de la activación a diferencias de las medias obtenidas en los tratamientos del tipo de solvente e hidrólisis, en la cual se observa que si hay diferencias estadísticamente (Fig. II 4).

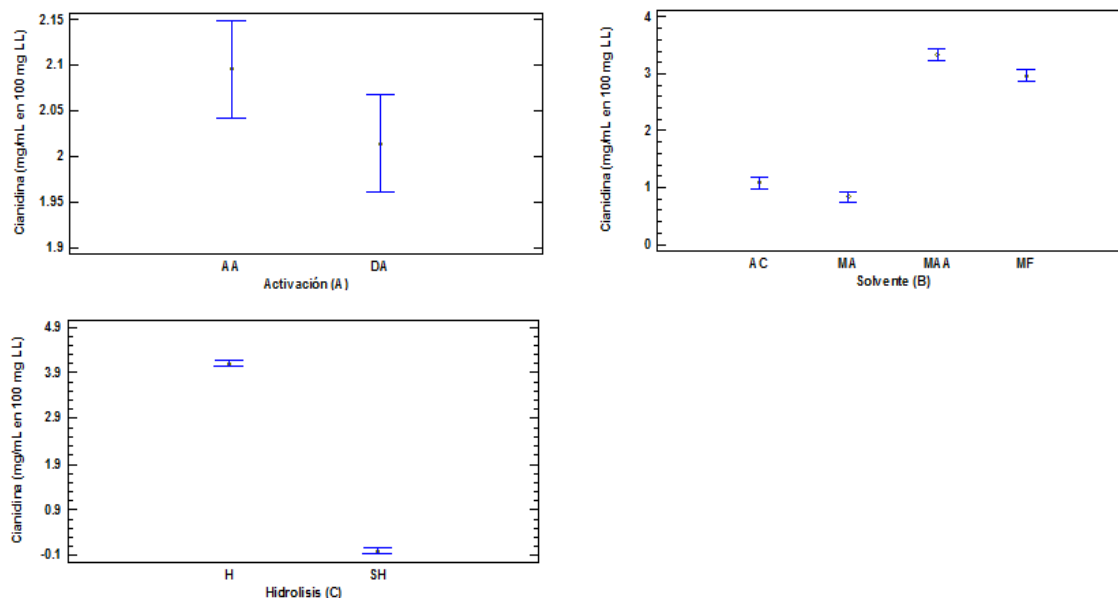


Figura III.4 Gráficas de medias de los diferentes tratamientos utilizados para la extracción de Cianidina en 100 mg de lígulas liofilizados. AA: Activación; DA: Desactivación (A); AC: Acetona; MF: Metanol-Acido fórmico; MA: Metanol-Agua; MAA: Metanol-Agua-Acido fórmico; MA: Metanol-Agua; MAA: Metanol-Agua-Acido fórmico (B). H: hidrólisis; SH: Sin hidrólisis (C).

Estudios realizados por Park *et al.*, 2015 en la cuantificación de antocianinas y carotenoides, en flores en diferentes cultivares de Crisantemo mediante HPLC y espectrometría de masa con ionización por electrospray, obtuvieron tres compuestos tipo antocianinas: cyanidin 3-glucoside (C3g) y cyanidin 3-(3"-malonoyl) glucoside (C3mg) y carotenoides: lutein, zeaxanthin, β -cryptoxanthin, 13-cis- β -carotene, α -carotene, trans- β -carotene y 9-cis- β -carotene. Sugiriendo que en variedades que contiene grandes cantidades de antocianinas muestran una amplia gama de colores rojos y púrpuras en sus pétalos. Otras variedades de crisantemo de colores amarillos o verdes produjeron mayor contenido de carotenoides, sin embargo, en plantas con pétalos verdes se reportó un alto nivel de antocianinas y un nivel medio de los carotenoides. En este trabajo se detectaron otros compuestos (no identificados) durante el análisis de HPLC, de acuerdo al estándar de cloruro de Cianidina se identificó a Cianidina en extracciones realizadas en botones florales, sin embargo, en el cromatograma se observó la presencia de compuestos no identificados, los cuales pueden ser precursores de antocianinas o carotenoides que en conjunto les proporcionan el color característico.

Chen y colaboradores (2013) realizaron la cuantificación y detección simultáneas de antocianinas y otros flavonoides en pétalos de lotus (*Nelumbo nucifera*) mediante HPLC-DAD.-ESI-MSⁿ, detectaron cinco compuestos tipo antocianinas (Dp-3-Glu, Cy-3-Glu Pt-3-Glu Pn-3-Glu y Mv-3-Glu) y 25 de flavonoides de seis grupos: Miricetin, Quercetin,

Kamferol, Isorhamnetin, Diosmetin y siringetin, separando los compuestos analizadas mediante el uso de diferentes solventes durante el análisis. En este trabajo se obtuvieron compuestos (no identificados) a los minutos 3.002, 3.531, 3.957, 4.354, 4.716, 6.047, 8.255, 8.991, 11.640 y 11.426. La cianidina fue detectada en el minuto 9.302, los compuestos no identificados se encuentran claramente separados entre sí, por lo que el método de extracción utilizado puede servir para la detección e identificación de otros compuestos relacionados con el color mediante un análisis de espectrometría de masas para confirmar su identidad.

III.4 Conclusión

El métodos que permitió la extracción con la mayor concentración de antocianinas en botones florales y lígulas liofilizadas de crisantemo, fue el método que combinó la extracción con el solvente Metanol-Agua-Acido fórmico (70:28:2 v/v/v), la desactivación de la enzima PPO a 100°C por 10 s y la hidrólisis en 100 mg B.S. de muestra.

Capítulo IV. Análisis *in silico* del gen *f3'h* de crisantemo.

IV.1 Introducción

La coloración que se presenta en flores de plantas de crisantemo está relacionada a la expresión de los genes que codifican a las enzimas F3H y F3'H, cuya activación produce la síntesis de pelargonidina y cianidina, respectivamente (Brugliera *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2015b). Sin embargo, la enzima F3'5'H no ha sido reportado en el genoma de crisantemo, ya que carece de esta enzima (Brugliera *et al.*, 2013).

IV.2 Materiales y métodos

IV.2.1 Obtención del material vegetal.

Plántulas de Crisantemo var. Micromargara fueron cultivadas *in vitro* en medio MS (M5519, Sigma) y propagadas de acuerdo al protocolo establecido por López-Puc (Datos no publicados). La propagación de las plantas fue realizado, utilizando secciones de entre nudos y sembrados en medio fresco de MS, cuando las plantas alcanzaron una longitud de 5 cm se transfirieron a medio MS suplementado con BAP (4.4 µM) para estimular el enraizamiento.

Después de las 7 semanas de edad las plántulas fueron retiradas del medio de cultivo MS, las raíces fueron lavadas con agua corriente para retirar los residuos del medio de cultivo y se transfirieron a contenedores de poliestireno R540 (Reyma) transparentes que contenía sustrato fibra de coco:peat-moss:tierra roja en una proporción 1:1:0.5 (v/v/v). Cada plántula fue cubierta con otro vaso transparente, la cual fue retirada a las tres semanas posteriores a la siembra en el sustrato. Después de la aclimatación, las plantas enraizadas fueron sembradas en macetas individuales con el sustrato de fibra de coco, peat-moss y tierra roja en una proporción 1:1:0.5 (v/v/v) y fertilizadas cada dos días con Bayfolan- Forte y mantenidas en casa sombra. La floración fue inducida mediante la reducción de la intensidad lumínica a 5,299.18 lux por un periodo de 25 días, los botones florales se seleccionaron en diferentes etapas de desarrollo para la extracción de ARN.

IV.2.2 Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó mediante la metodología del TRIzol modificado, para ello los botones florales fueron congelados en Nitrógeno líquido, pulverizados y homogenizados en 1 ml de TRIzol (invitrogen) con 1 µL β-mercaptoetanol. Después de agitar vigorosamente las muestras fueron incubadas sobre hielo por 10 min y centrifugadas a 12,000 rpm por 12 min, el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y se adicionó 300 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamilico (24:25:1), la mezcla fue homogenizada por inversión e incubó en hielo por 5 min. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 12 min, el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo. Al cual se le adicionó 600 µL de isopropanol y se incubó a -20 °C por 1 hora. Al finalizar la incubación, se centrifugó nuevamente a 12,000 rpm por 12 min eliminando el sobrenadante y al precipitado se le

agrego 600 μL de alcohol al 70% y se centrifugó nuevamente, descartando el sobrenadante, repitiéndose este pasó por dos veces. Al finalizar los lavados con etanol se dejó secar la pastilla por 20 minutos y se adicionó 40 μL de agua ultra pura libre de nucleasas.

La integridad del ARN extraído se verifico mediante electroforesis, en un gel de agarosa al 1% compuesto de TAE (Tris, Ácido acético y EDTA) 1X y 0.05 mg/mL de Bromuro de Etidio, para la cual se agregó 5 μL de la muestra de ARN total. Las muestras fueron corridas a 85 volts por 45 minutos. Posteriormente las bandas fueron visualizadas en un fotodocumentador UVP con cámara integrada UVP (UV-High-Perfomance, UV transluminator). La calidad de la extracción del ARN se comprobó mediante la espectrofotometría a una relación de 1.8 a 2 en una absorbancia de $A_{260} \text{ nm}/A_{280} \text{ nm}$ (Taylor *et al.*, 2010; Biassoni y Raso, 2014).

IV.2.3 Síntesis de cDNA

El ARN extraído fue utilizado para sintetizar el ADN complementario (cDNA), mediante un ensayo de transcripción reversa (RT). Para lo cual se utilizo se utilizó 10 μg de ARN total tratado con Turbo-DNasa (Ambion) por 37 °C por 25 min. Para desactivar la DNasa se adicionó 2.5 mM de EDTA, incubando por 10 min a 65°C con inversiones cada 3 min. Posteriormente se agrego 2 volúmenes de isopropanol para precipitar por 2 horas y dos lavados con etanol al 70 %, centrifugando la muestra a 1200 rpm por 5 minutos. El cDNA fue sintetizado siguiendo la metodología del kit MMLV (Invitrogen) para las síntesis de cDNA en donde 10 μg de ARN total se mezcló con 1 μL del oligo dT a 10 pM, 1 μL de dNTP a 10mM incubando a 65°C por 5 minutos, posteriormente se agregó 4 μL del búfer 5x y 2 μL de 0.1 M de DTT e incubándolo a 37°C por 2 minutos, se agregó 1 μL de la enzima MMLV e incubando a 37°C por 50 min con inversiones cada 5 minutos, para la desactivación de la enzima MMLV, las muestras fueron incubadas a 70°C por 15 minutos.

IV.2.4 Condiciones de amplificación por PCR

Para amplificar el gen que codifica a la Actina y el gen *f3h*, se establecieron las siguientes condiciones de PCR, se preparó una mezcla de reacción de 25 μL por muestra, el cual comprende Buffer 1x, 0.2 mM de dNTP, MgCl_2 1.5 mM, Enzima Taq platinum polimeraza 1U, oligos: Forward y Revere (Tabla 1) y DMSO. Para la reacción de PCR se utilizo 4 mg de cDNA.

Tabla IV.1. Oligos utilizados para las reacciones de PCR y PCR-tr.

Oligos		
Gen	Forward	Revers
Actina	5'-TGGAGAAAATCTGGCATCACAC-3'	5'-GGAACCTAGTTGTACCAC CAC-3'
f3h	5'-GTATTGCTTAACTTAAGTTCAC-3'	5'-CTGTCGAACATGACGA-3'

La amplificación del gen que codifica a la Actina incluyó una fase inicial de desnaturalización del ADN a 95°C durante 3 min, la segunda fase estuvo conformada por

35 ciclos. Iniciando la desnaturalización del ADN a 94°C durante 1 min, seguida de una fase de alineamiento a 60 °C durante 2 min y una fase de elongación a 72 °C durante 30 seg, por ultimo una extensión a 72°C por 7 min.

Las condiciones de amplificación del gen *f3'h* se inició con la primera fase de desnaturalización del ADN a 95°C durante 3 min, posteriormente la segunda fase conformado por 35 ciclos. Iniciando la desnaturalización del ADN a 94°C durante 1 min, seguida de una fase de alineamiento a 58 °C durante 2 min y una fase de elongación a 72 °C durante 30 seg, por ultimo una fases a 72°C por 7 min.

Los productos amplificados se observaron mediante la electroforesis, en un gel de agarosa al 1% con TAE 1X y 0.05 mg/mL de Bromuro de Etidio, para la cual se agregó 5 µL del producto amplificado. Las muestras fueron corridas a 85 volts por 45 minutos. Posteriormente las bandas fueron visualizadas en un fotodocumentador UVP con cámara integrada UVP (UV-High-Perfomance, UV transiluminator).

Las bandas que corresponde con los tamaños esperados fueron purificados utilizando el kit “PureLink quick gel Extracción” siguiendo la metodología del proveedor, el fragmento de ADN fue recuperado con 40 µL de agua estéril. Las muestras se enviaron para su secuenciación a Macrogen Inc. Corea.

IV.2.5 Análisis *in silico* de las secuencia del gen *f3'h* y Actina

El porcentaje de similitud de las secuencias resultantes fue determinado con el programa Blast disponible en Internet. Posteriormente se descargo de la base de datos de la NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) para la comparación y alineación con secuencias reportadas del gen *f3'h* y Actina. La alineación de las secuencias se realizó mediante el programa BioEdit versión 7.2.5 (Hall, 1999). El árbol filogenético fue construido usando la secuencia de *f3'h* identificado en este trabajo (Dgf3'h KT892061) y 33 secuencias obtenidas de la base de datos: FJ197132.1, KR902747.1, KP347675.1, GQ438849.1, GQ180936.1, HM460344.1, FJ004841.1, FJ004840.1, AY463157.1, AB221082.1, HQ268505.1, FJ753548.1, KP861882.1, FJ753549.1, GQ281059.1, FJ216430.1, FJ216428.1, FJ216426.1, FJ216429.1, DQ218417.1, AF313488.1, AB550253.1, DQ257627.1, KP899545.1, GU249554.1, HQ256697.1, GU249551.1, KF313549.1, GU249552.1, GU249553.1 y GU249550.1, GU249549.1.

IV.3 Resultados y discusión

IV.3.1 Obtención del material vegetal

A partir de plántulas de crisantemo de tres meses de edad y propagadas *in vitro*, se obtuvieron explantes adventicios, las cuales fueron resembradas en medio de cultivo MS y mantenidas por dos semanas bajo las condiciones de fotoperiodo 16/8 hora luz/oscuridad con temperatura de 24 ± 1 . Después de la siembra, posteriormente a este tiempo se dejaron crecer los brotes laterales por 6 semanas, donde se observó la formación de raíces (Fig. III.1). Con este protocolo se logró obtener 400 plántulas de crisantemo con raíz, las cuales pasaron a la siguiente etapa para su aclimatación.

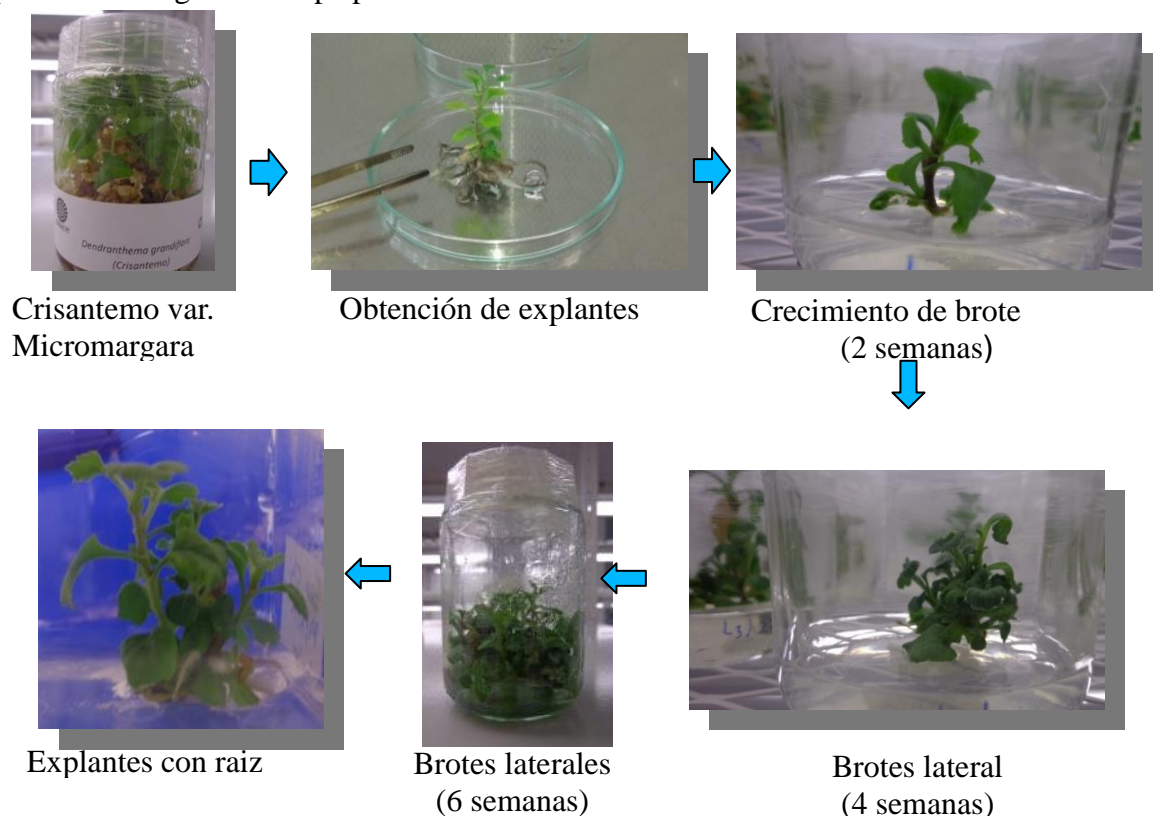


Figura IV.1 Esquema de propagación de explantes de crisantemo.

La fase de aclimatación se llevó a cabo en charolas de plástico que contenía como sustrato fibra de coco:tierra roja (1:1 v/v) estéril. Bajo estas condiciones el 87.5% de las plantas transplantadas generaron raíz. Las charolas que contenían las plantas para su aclimatación fueron cubiertas con el mismo material de la charola y selladas para evitar la pérdida de la humedad del interior y evitar que las plantas se deshidraten. A los cinco días de haber sembrado las plantas se retiraron las tapas gradualmente. Posterior a este tiempo las plantas fueron trasplantadas en contenedores individuales de 8 oz con sustrato de fibra de coco, peat-moss y tierra roja en una proporción 1:1:0.5 (v/v/v); este proceso se esquematizó en la Fig. III.2.

Las plantas fueron fertilizadas cada dos días con 3 ml/L⁻¹ de Bayfolan- Forte. La inducción de la floración se logró reduciendo la intensidad de la luz, utilizando una maya que retiene el 30% de luz, en la Fig. III.3, se observan las plantas con brotes florales.

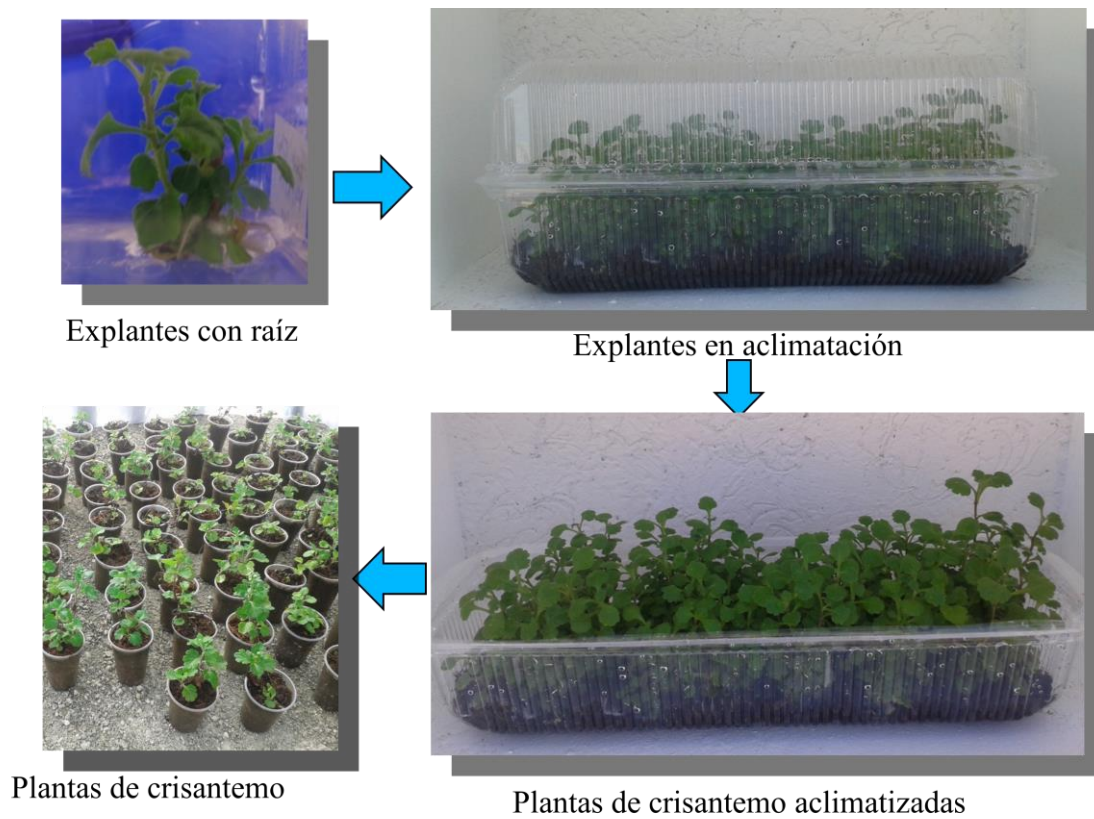


Figura IV.2 Proceso de aclimatización de plantas de crisantemo a condiciones ex vitro



Figura IV.3 Obtención de botones florales de crisantemo mediante la reducción lumínica.

IV.3.2 Extracción de ARN

Con el objetivo de analizar la secuencia de los transcritos de *f3'h* y *actina*, se realizó la extracción de ARN (Protocolo descrito en la sección III.2.2.), en botones florales en diferentes etapas del desarrollo para determinar si durante el desarrollo del botón podrían sintetizarse compuestos que disminuyan la cantidad y calidad del ARN extraído. El ARN obtenido para cada etapa fue de buena calidad, todas las muestras evaluadas mantuvieron una relación de absorbancia de $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ entre 1.8 y 2. La integridad fue verificada en un gel de agarosa al 1%, la imagen digitalizada se presenta en la Fig. III.4, en donde cada línea representa una etapa del desarrollo floral, cada línea contiene 2 bandas representando al ARN 28S y 18S, este experimento se realizó por triplicado de manera independiente, obteniendo el mismo resultado, por lo que podemos concluir que la metodología de extracción de ARN no se afecta con los metabolitos que pudieran producirse durante el desarrollo del botón floral.

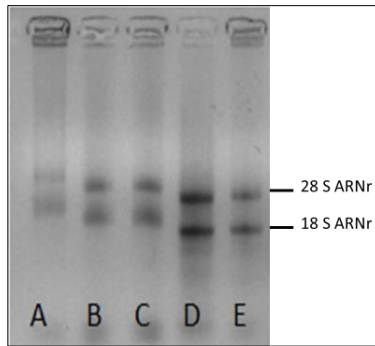


Figura IV.4 Producto de la extracción de ARN total en un gel de agarosa al 1% con 5 μ L de Bromuro de Etidio (0.05 mg/mL). Extracción de ARN en las diferentes etapas de desarrollo floral: Identidad celular (A), Duplicación celular (B), Alargamiento celular (C.), Maduración (D) Senescencia (E).

IV.3.3 Amplificación de los genes *f3'h* y Actina

El cDNA sintetizado a partir de ARN de crisantemo fue utilizado como molde para amplificar el gen de la *f3'h* y actina. En la reacción de PCR con los oligos diseñados para actina se amplificó un fragmento de 602 pb (Fig. III.5) y en la reacción con los oligos para *f3'h* se obtuvo un fragmento de 326 pb. Ambos fragmentos fueron aislados y purificados para su posterior secuenciación. Las secuencias obtenidas fueron sometidas en la base de datos de la NCBI para su registro con número KT892061 y KT892062 respectivamente.

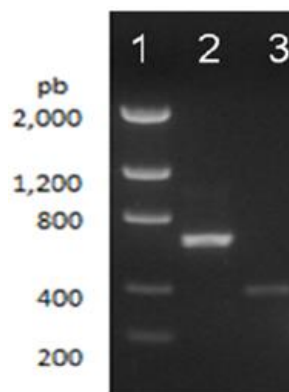


Figura IV.5 Electroforesis en agarosa de productos de PCR teñido con Bromuro de Etidio (0.05 mg/mL). Carril 1. Marcador de peso molecular; Carril 2. Fragmento parcial del gen actina (602 pb) y Carril 3. Fragmento parcial del gen *f3'h* (326 pb).

IV.3.4 Análisis *in silico* de la secuencia del gen f3'h

Las secuencias resultantes fueron comparadas en la base de datos de la NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), los resultados mostraron una alta similitud de la secuencia de f3'h encontrada en el presente trabajo (DgF3 KT892061) con las reportadas anteriormente (tabla III.2); encontrándose un 98% de similitud con la accesión GU249554, lo cual confirma que la secuencia KT892061 corresponde al gen f3'h.

Tabla IV.2 Porcentaje de similitud con secuencias reportadas del gen f3'h en crisantemo.

No. de accesión	Secuencia reportada en la NCBI	Similitud %
GU249554.1	<i>Chrysanthemum x morifolium</i> cultivar Argus-derived gamma ray mutant 5 flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) gene, complete cds	98
GU249553.1	<i>Chrysanthemum x morifolium</i> cultivar Argus-derived gamma ray mutant 4 flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) gene, complete cds	98
GU249550.1	<i>Chrysanthemum x morifolium</i> cultivar Argus-derived gamma ray mutant 1 flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) gene, complete cds	98
GU249549.1	<i>Chrysanthemum x morifolium</i> cultivar Argus flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) gene, complete cds	98
GU249552.1	<i>Chrysanthemum x morifolium</i> cultivar Argus-derived gamma ray mutant 3 flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) gene, complete cds	98
HQ256697.1	<i>Chrysanthemum x morifolium</i> flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) gene, partial cds	98
GU249551.1	<i>Chrysanthemum x morifolium</i> cultivar Argus-derived gamma ray mutant 2 flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) gene, complete cds	98
KF313549.1	<i>Chrysanthemum x morifolium</i> flavonoid 3'-hydroxylase mRNA, complete cds	98

La alineación de las secuencias se observa en la Fig. III.6, se muestra los sitios de cambios de bases nitrogenadas. La secuencia f3'h (KT892061) también fue comparada con 33 secuencias de genes ortólogos reportadas en la NCBI, entre estas, ocho presentan una mayor similitud, como se observa en el cladograma de la Fig. III.7, en donde, dichas secuencias, de la misma especie, se agrupan en un clado. Estudios filogenéticos con el gen f3'h realizado por Seitz *et al.*, 2015 reporta la formación de clados por familias (Asteraceae, Cichorioideae y Carduoideae), resultados similares se encontraron en nuestro análisis, separando a todas las secuencias de la familia Asteraceae en un solo grupo.

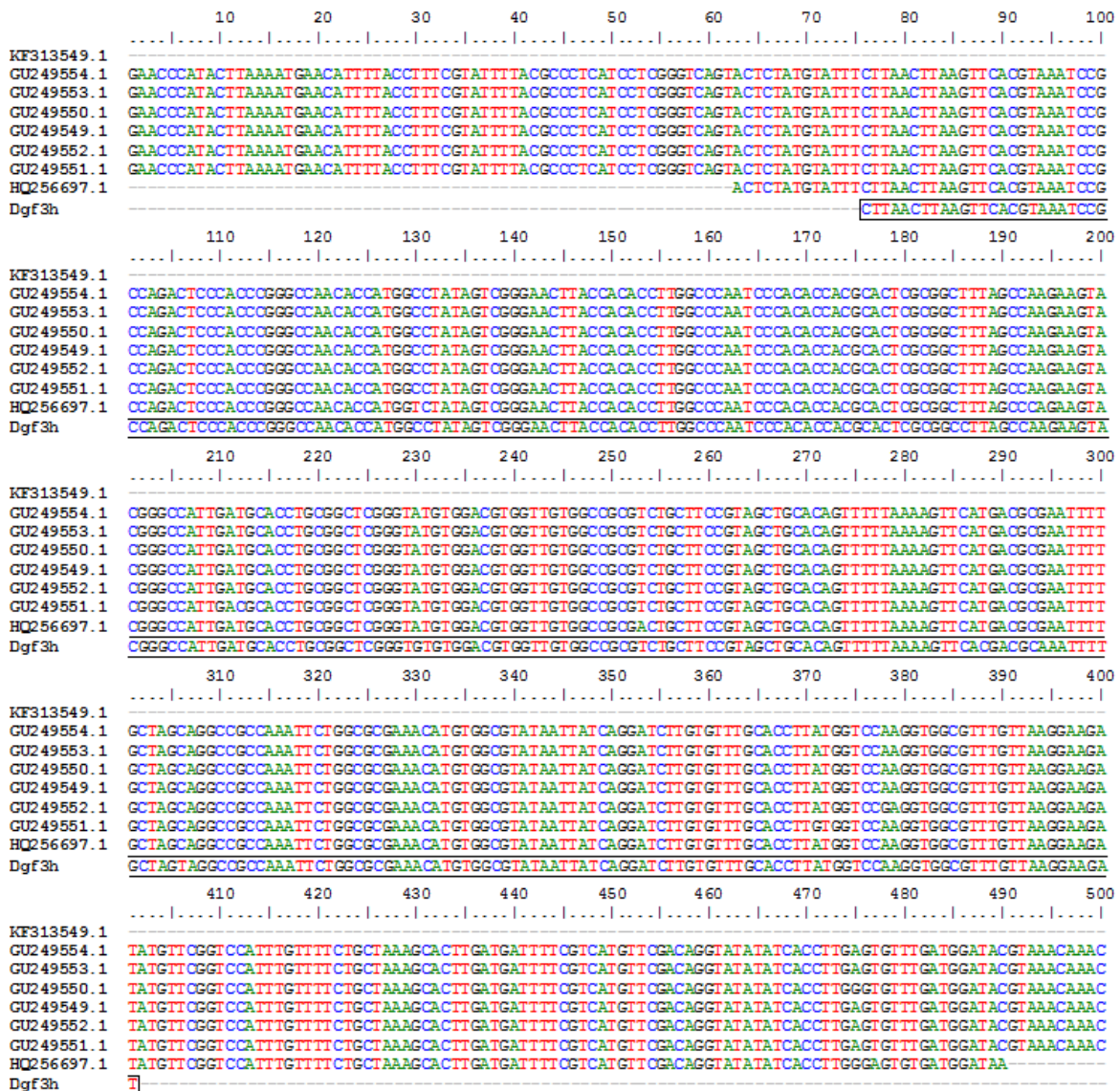


Figura IV.6 Alineación del gen *f3h* con secuencias ortólogas reportadas en la base de datos NCBI.

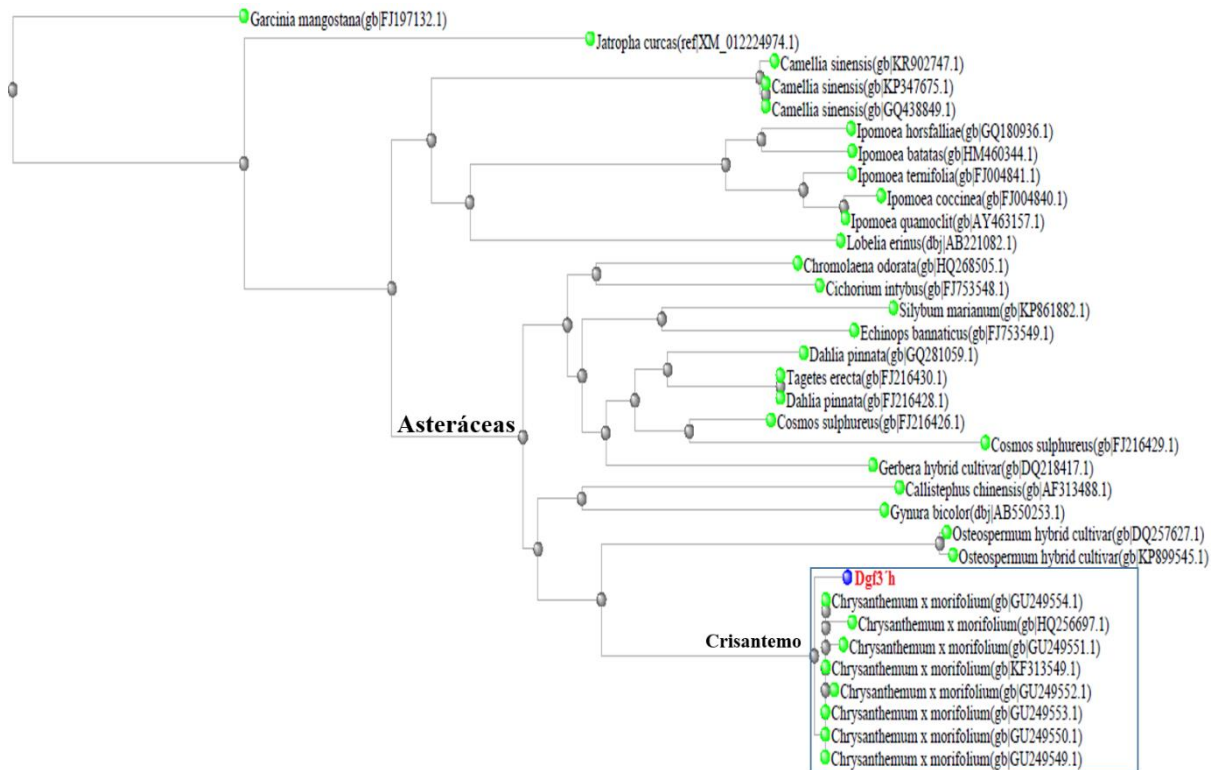


Figura IV.7 Cladograma construido a partir de 33 secuencias reportadas en NCBI y la secuencia de la secuencia KT892061.

IV.3.5 Análisis *in silico* de la secuencia del gen de actina

La secuencia de los cDNA de crisantemo, amplificada con los oligos de actina fueron comparadas con secuencias similares reportadas en la base de datos de la NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), los resultados mostraron una alta similitud de la secuencia de actina encontrada en el presente trabajo (ANKIT1863025 DgActin KT892062) con las reportadas anteriormente (tabla III.3); encontrándose un 86% de similitud con la secuencia EU531837.1, lo cual confirma que la secuencia KT892062 es del gen de actina, esta similitud se puede observar gráficamente en el cradograma obtenido, el cual se muestra en la Fig. III.8. El siguiente paso del análisis fue la obtención del árbol filogenético en el que se compararon 10 secuencias para actina de las especies: *Artemisia annua*, *Pyrus x bretschneideri*, *Fragaria vesca*, *Morus alba*, *Malus x domestica*, *Capsella rubella*, *Camellia sinensis* y *Rosa hybrid* (Fig. III. 9).

Tabla IV.3. Porcentaje de similitud con secuencias reportadas para el gen de Actina en comparación con KT892062.

No. de accesión	Secuencia reportada en la NCBI	Similitud %
EU531837.1	<i>Artemisia annua</i> actin 1 mRNA, partial cds	86
XM_009343147.1	<i>Pyrus x bretschneideri</i> actin-like (LOC103933450), mRNA	85
XM_004302690.2	<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i> actin (LOC101293316), mRNA	85
KJ616403.1	<i>Morus alba</i> actin (ACT) mRNA, complete cds	85
XM_008386905.1	<i>Malus x domestica</i> actin (LOC103447714), mRNA	84
HQ163775.1	<i>Morus alba</i> actin 3 (ACT3) mRNA, partial cds	84
XM_006291241.1	<i>Capsella rubella</i> hypothetical protein (CARUB_v10017439mg) mRNA, complete cds	84
HQ235647.1	<i>Camellia sinensis</i> cultivar Longjing 43 actin mRNA, complete cds	84
KC514920.1	Rosa hybrid cultivar actin-4 (ACT4) mRNA, partial cds	84
AB239794.1	Rosa hybrid cultivar ACT mRNA for actin, partial cds	83

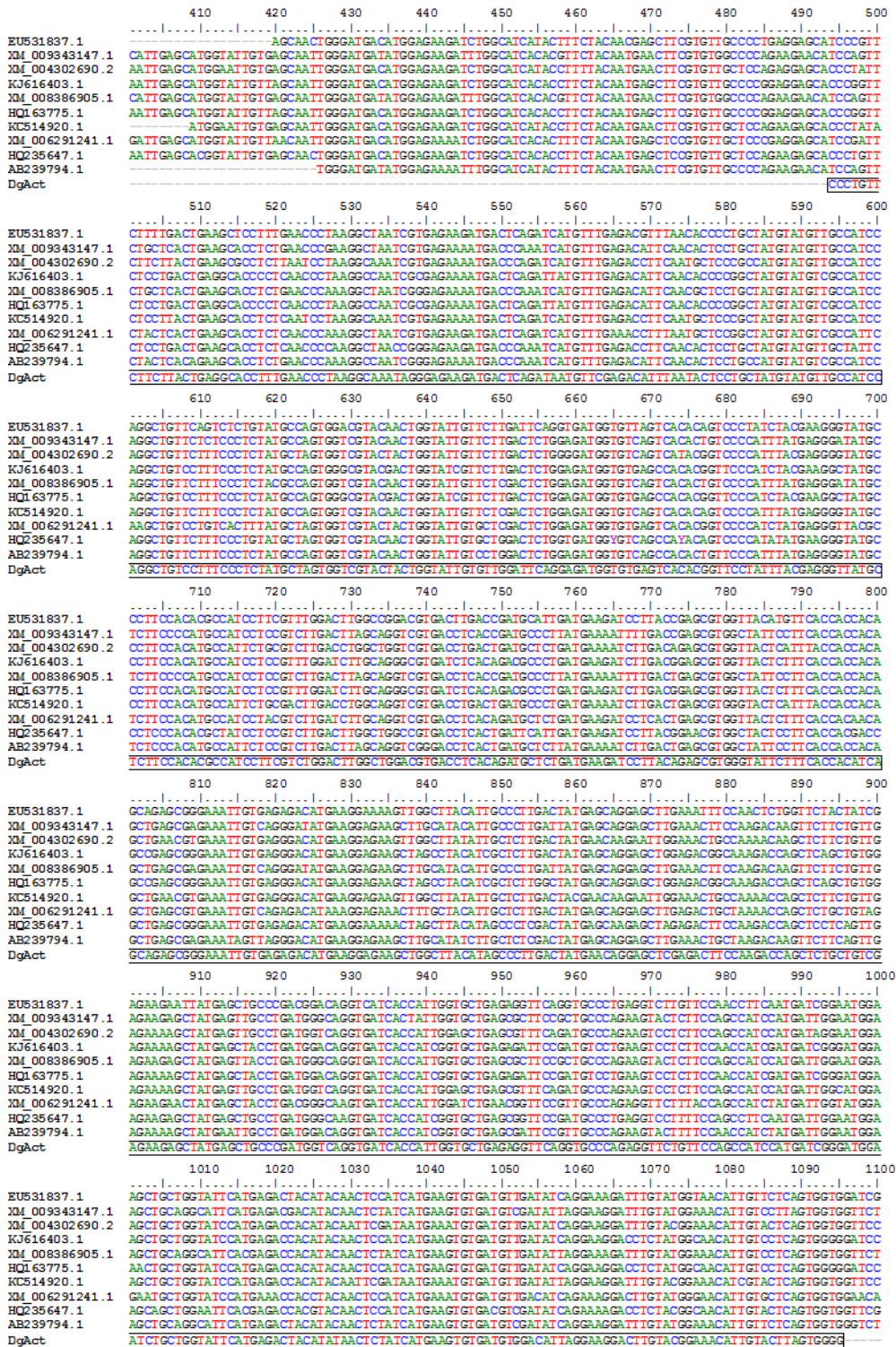


Figura IV.8 Secuencia parcial del gen Actina (KT892062) y su alineación con otras secuencias reportadas en la NCBI.

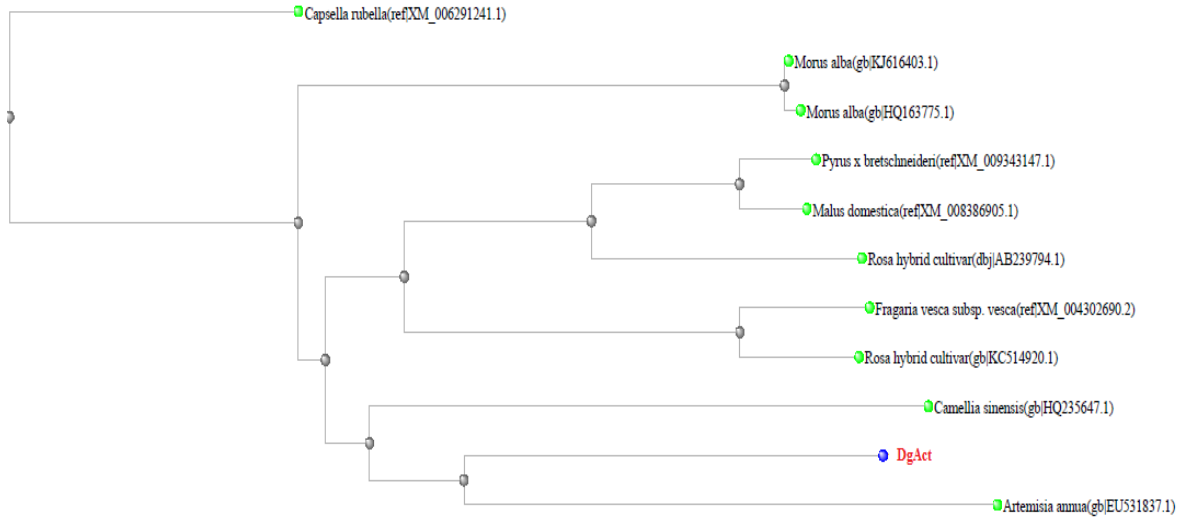


Figura IV.9 Dendrograma construido a partir de 10 secuencias reportadas en NCBI y la secuencia parcial del gen *Actina* (DgAct) en botones florales de crisantemo.

IV.4 Conclusión

- Se amplificó un fragmento parcial del gen f3'h de 326 pb en cinco etapas de desarrollo floral y fragmentó parcial del gen *Actina* mediante PCR punto final.
- La secuencia obtenida del fragmento parcial gen f3'h presentó una similitud del 98% con otras secuencias reportadas de f3'h en crisantemo en la bases de datos de la NCBI.
- El dendrograma construido agrupo el gen f3'h en la familia de las Asteraceae.
- La secuencia obtenida del fragmento parcial gen *Actina* presentó una similitud 86% con la secuencias de *Actina* de *Artemisia annua* reportadas en la bases de datos de la NCBI.

Capítulo V. Correlación entre la concentración de antocianinas y la acumulación de transcritos del gen f3'h durante el desarrollo floral en plantas de crisantemo

Estudios realizados para determinar mediante PCR-tiempo real, el nivel de transcritos del gen f3'h durante el desarrollo del botón floral en plantas de crisantemo (*D. grandiflora*), peona (*Paeonia suffruticosa*) y pensamiento (*Viola × wittrockiana*), se observó un aumento en los niveles de transcritos a medida que el botón floral alcanza su madurez y disminuye durante la senescencia (He *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014a).

La correlación es una medida estadística que se relacionan entre dos variables cuantitativas, dando como resultado una correlación positiva (cuando una variable aumenta, la otra variable tiene a aumentaren forma dependiente) o una correlación negativa (cuando una variable aumenta, la otra disminuye o aumenta de forma independiente). La correlación más utilizada estadísticamente es la correlación de Pearson.

Los resultados de la correlación es de un solo número llamado el coeficiente de correlación y designados por la letra "r". El coeficiente de correlación puede variar desde -1 a 1. Un r = 0 significa que no hay conexión entre las dos medidas y un r = 1 significa que las dos medidas se dirigen a la misma dirección. Un r = -1 significa que las dos medidas se mueven en direcciones opuestas. (Emerson, 2015; Montaigne *et al.* 2014).

Para conocer si existe una correlación significativa entre la concentración de antocianinas y la acumulación de transcritos del gen f3'h, durante el desarrollo floral en plantas de crisantemo, se procedió a analizar los datos mediante el índice de correlación de Pearson con un nivel de confianza del 95% entre las variables registradas.

V.1 Materiales y Métodos

V.1.1 Material vegetal

Se obtuvieron flores de Crisantemo (*D. grandiflora*) variedad Micromargara como se describió en la sección III.2.1, los botones florales se colectaron en diferentes etapas de desarrollo clasificándolas en cinco grupos de acuerdo a la metodología modificada de Kishimoto y Ohmiya (2006). Etapa de desarrollo floral: **I.C.**: Identidad celular (2-3mm de diámetro); **D.C.**: Duplicación celular (8-10 mm); **A.C.**: Alargamiento celular (15-18 mm); **MA.**: Maduración 20-30 y **SE.**: Senescencia (>35 mm), inmediatamente después de la colecta los botones florales fueron congelados en nitrógeno líquido.

V.1.2 Cálculo del contenido de antocianinas en base seca

A los botones florales se les determino el peso en base seca (BS) de cada etapa de desarrollo, para ello los botones fueron pesados y secados a 110°C por 2 h y pesados nuevamente. Después se calculó el porcentaje de peso seco (1), lo que permitirá el cálculo de la cantidad de antocianinas en 100 mg en base seca (2). El cálculo se realizó para cada etapa del desarrollo del botón.

$$\% \text{ peso seco} = \left(\frac{\text{peso seco del boton}}{\text{peso fresco del boton}} \right) \times 100 \quad (1)$$

$$[\text{Antocianinas}] \text{ en } 100 \text{ gr BS} = \left(\frac{\text{Concentracion de antocianinas en } 100 \text{ g de peso fresco} \times 100}{\% \text{ peso seco}} \right) \quad (2)$$

V.1.3 Extracción de antocianinas en botones florales

Se utilizaron botones florales congelados en las diferentes etapas de desarrollo, los cuales fueron, triturados y posteriormente se adiciono 1 ml Metanol-Agua-Acido fórmico (70:28:2 v/v/v). Las muestras fueron incubadas a 100°C por 10 s. Posteriormente las muestras fueron enfriadas a 4°C por 24 horas. Después de centrifugar a 10,000 rpm por 10 min, las muestras fueron filtradas con una membrana de nilón de 0.22 µm-Millipore. El contenido de cianidina fue analizado por HPLC como se describió en la sección II.2.4.

V.1.4 Análisis de PCR-tiempo real (PCR-tr)

A partir de cDNA, obtenido como se describió en la sección III.2.3, se realizo la amplificación de un fragmento del gen *f3'h*, con los oligos F3'hFn (5'CTAGCAGGCCGCAAATTC-3') y F3'hRn (5'GAATTGGCGGCCTGCTA-3'), usando el kit Luminaris HiGreen qPCR Master Mix (Thermo scientific No. K0991) y la Platinum taq DNA polymerasa (Invitrogen, 10966-034). La amplificación y detección de la fluorescencia se realizó en el termociclador (PR0961401747) de Therm Scientific mediante el Software PikoReal 2.2 versión PCR 2.3.2, RT 1.1.12.23. Para comprobar que en cada reacción se realiza la amplificación de un solo fragmento se obtuvo la Melting curve. En cada análisis por PCR-tr se incluyó una reacción para amplificar un fragmento del gen de actina como control, además de seguir los requisitos básicos que le dan validez de la técnica (D'haene *et al.* , 2010; Derveaux *et al.* , 2010; Taylor *et al.* , 2010; Biassoni y Raso, 2014; Svec *et al.* , 2015).

V.2 Resultados y discusión

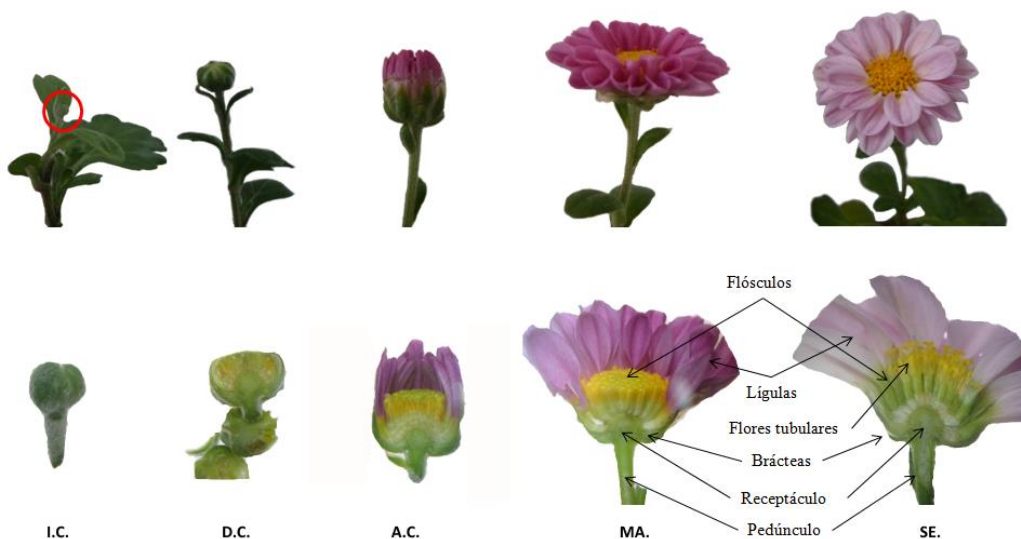


Figura V.1 Etapas de desarrollo floral de crisantemo. Identidad celular (I.C.), Duplicación celular (D.C.), Alargamiento celular (A.C.), Maduración (MA.) y Senescencia (SE.).

V.2.1 Extracción de antocianinas en lígulas liofilizadas y botones florales

Para determinar la concentración de las antocianinas durante las etapas del desarrollo floral, se establecieron cinco etapas del desarrollo, de acuerdo al estado de actividades de las células que componen el botón: Identidad celular (**IC**), Duplicación celular (**DC**), Alargamiento celular (**AC**), Maduración (**MA**) y Senescencia (**SE**) (Fig. IV.1), las cuales pueden ser identificadas a simple vista, en la etapa de IC los órganos no se encuentran completamente definidas, por lo que se analizó la acumulación de las antocianinas en los botones completos y lo detectado en las lígulas solamente. Para realizar la extracción de antocianinas en botones florales, en cada una de las etapas de desarrollo, se formaron dos lotes de botones florales, el primero fueron congelados íntegramente para su posterior maceración y extracción; el segundo lote, los botones fueron abiertos con bisturí y las lígulas fueron retiradas, congeladas y maceradas para la extracción. La extracción de antocianinas se realizó como se detalla en el capítulo 2. La extracción de antocianinas de cada muestra fue analizado por HPLC, para detectar y cuantificar: delfinidina, pelargonidina y cianidina.

En la Fig. IV.2, se muestran los cromatogramas obtenidos para botones florales en diferentes etapas de desarrollo, en la cual no se detectó la presencia de pelargonidina, ni delfinidina, en ninguno de los tratamientos (Fig. IV.2 A-E). Nuestros datos son congruente a lo reportado anteriormente (Ho, 2005), en donde el análisis por HPLC de antocianinas en pétalos de crisantemo solo detectó la presencia de derivados de cianidina. En otros estudios (Brugliera *et al.*, 2013) se analizó el contenido de antocianinas en 75 cultivares de crisantemo, la única antocianina detectada fue la cianidina (cianidina 3-glucosido y cianidina 3-malonilglucosido), incluso en los crisantemos de flores rosas y lilas; como es el

caso de la variedad micromarga utilizada en el presente estudio. Resultados similares se obtuvo en el análisis de HPLC de extractos florales de crisantemo (Roepke *et al.*, 2013).

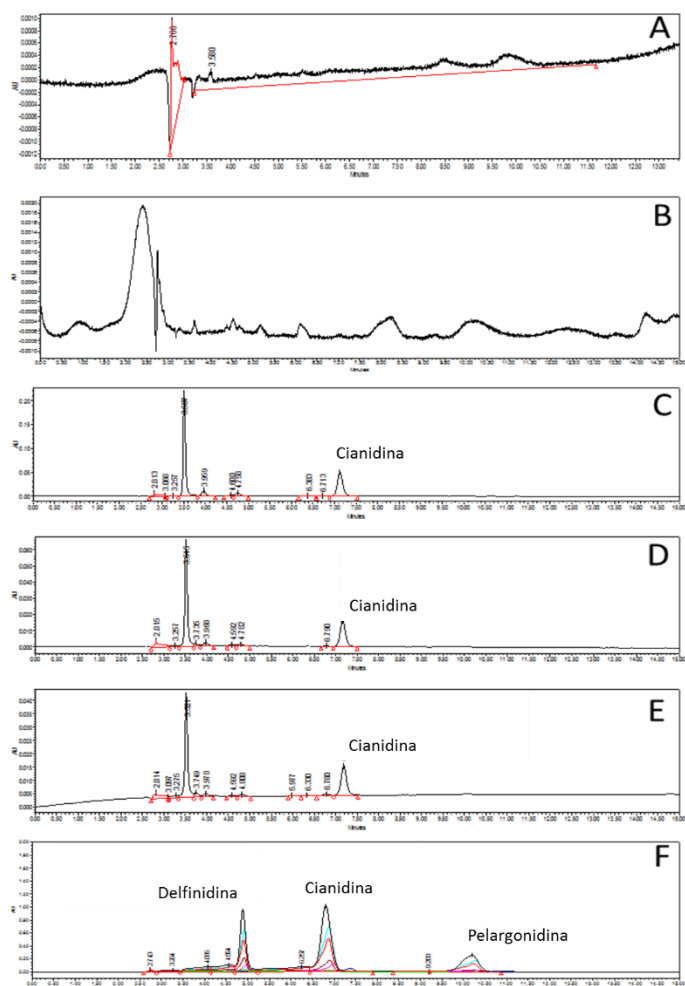


Figura V.2 Cromatogramas obtenidos de las cinco etapas de desarrollo floral. Identidad celular (A), Duplicación celular (B), Alargamiento celular (C), Maduración (D) y Senescencia (E) Curva de calibración de los estándares de Cloruro de Delphinidina, Cloruro de Cianidina y Cloruro de Pelargonidina (F).

En la Fig. IV.3, se observa que no se detecta cianidina en las dos primeras etapas de desarrollo floral, sin embargo en la etapa de alargamiento celular el contenido de cianidina aumenta significativamente y disminuye durante la etapa de maduración y senescencia. Este patrón de acumulación se encuentra tanto en botones florales como en las lígulas, pero siendo significativamente mayor en botes florales, esto pudiera deberse a una producción de cianidina en las flores tubulares y en el receptáculo. Resultados similares fueron reportados por Schmitzer *et al.*, 2009, en los cuales la acumulación de cianidina disminuye a medida que el botón floral llega a la etapa de senescencia mostrando que hay diferencias significativas en todas las etapas de desarrollo. En otros estudios con *Viola × wittrockiana* Gams), gentiana (*Gentiana triflora*) mostraron que la acumulación de cianidina aumenta y cuando la flor llega a la antesis (etapa de maduras) su contenido disminuye (Li *et al.*, 2014; Nakatsuka *et al.*, 2005).

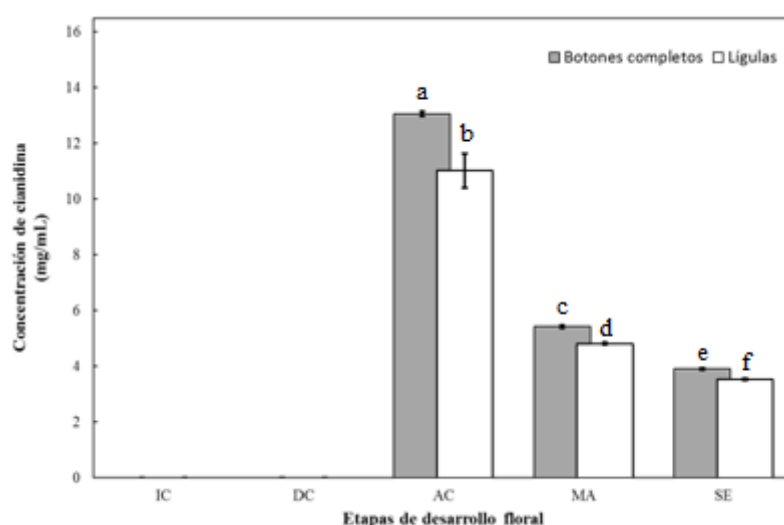


Figura V.3. Contenido de cianidina en botones florales (■) y lígulas (□) durante las diferentes etapas de desarrollo floral. Letras diferentes representa los resultados estadísticamente diferentes con una $P \leq 0.05$.

V.2.2 Optimización de condiciones de amplificación por PCR para determinar la expresión del gen *Actina* y *f3'h*

La acumulación de cianidinas estaba relacionada con la expresión del gen *f3'h* (Zhang *et al.*, 2015), este gen codifica a la enzima *f3'h*, que cataliza la hidroxilación en la posición 3' en el anillo 2-fenil-benzopirilio por lo que se propuso analizar los cambios de la expresión del gen *f3'h* durante el desarrollo del botón.

Como primer paso para el análisis de la expresión del gen es la optimización de la amplificación por PCR tiempo real (PCR-tr). La optimización en el contexto de PCR-tr se refiere a establecer las condiciones de amplificación que reduzcan las deficiencias técnicas que afectan el rendimiento del ensayo y/o la repetibilidad del mismo (Bustin *et al.*, 2009).

El primer parámetro a evaluar fue la concentración de $MgCl_2$, debido a que el Mg^{2+} es considerado uno de los componentes más críticos, ya que afecta la actividad de la ADN polimerasa y debe estar en una concentración equimolar con los desoxiribonucleotidos (dNTP's). La concentración de Mg^{2+} libre, debe estar en un rango entre 1.2 a 1.3 mM (McPherson and Geir, 2009); por lo que se decidió evaluar nueve concentraciones de $MgCl_2$ (0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4 y 4.5 mM) sobre la amplificación de f3'h usando como molde cDNA de botones florales de crisantemo. El resultado de la amplificación se corrió en un gel de agarosa y las bandas fueron visualizadas con BrEt-UV, la imagen digitalizada se presenta en la Fig. IV. 4, en donde la intensidad de la banda es mayor en 1.5 y 2 mM, considerando que un exceso de magnesio produce una amplificación inespecífica de productos de PCR, se decidió utilizar en los subsiguientes ensayos la concentración de 1.5 mM. El ensayo fue repetido en tres ocasiones independientes con los mismos resultados.

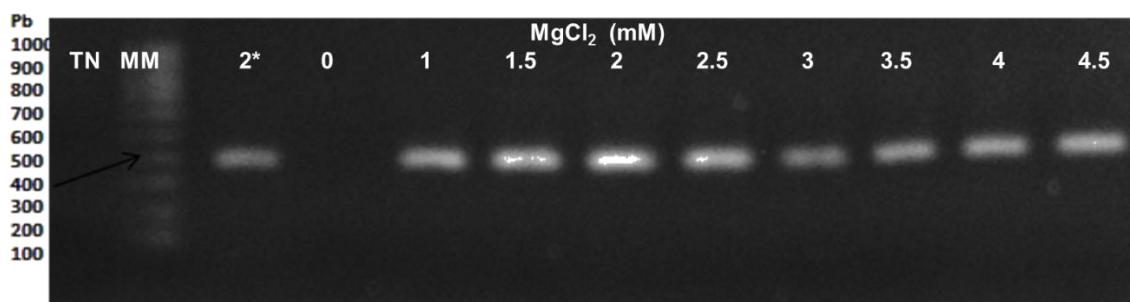


Figura V.4. Evaluación de diferentes concentraciones de $MgCl_2$ (0, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4 y 4.5) sobre la amplificación de f3'h, donde TN: testigo negativo; MM: marcador de masa molecular; 2*: testigo positivo.

Para verificar la especificidad de amplificación de f3'h y actina se analizaron las curvas de desnaturalización por PCR-rt, considerando que cada fragmento amplificado de ADN en PCR-tr tiene una temperatura de alineamiento específica de acuerdo al contenido de G-C y A-T en su secuencia. A la temperatura de desnaturalización las hebras de ADN se separan y el cromóforo presente en la mezcla de reacción del PCR se libera y no emite fluorescencia.

De la gráfica de curva de temperatura obtiene la curva de la derivada inversa que es presentada en la Fig. IV.5 A y B, tanto para la amplificación de los genes f3'h y actina, se aprecia un solo pico en sus respectivas curvas de calibración, comprobando la identidad y especificidad de las amplificaciones (D'haene *et al.*, 2010), este análisis se realizó en cada uno de los experimentos subsiguientes para detectar contaminación que pudieran influir en los resultados; en todos los experimentos realizados se obtuvieron una alta especificidad y un solo pico por reacción de amplificación correspondiente al amplicon deseado.

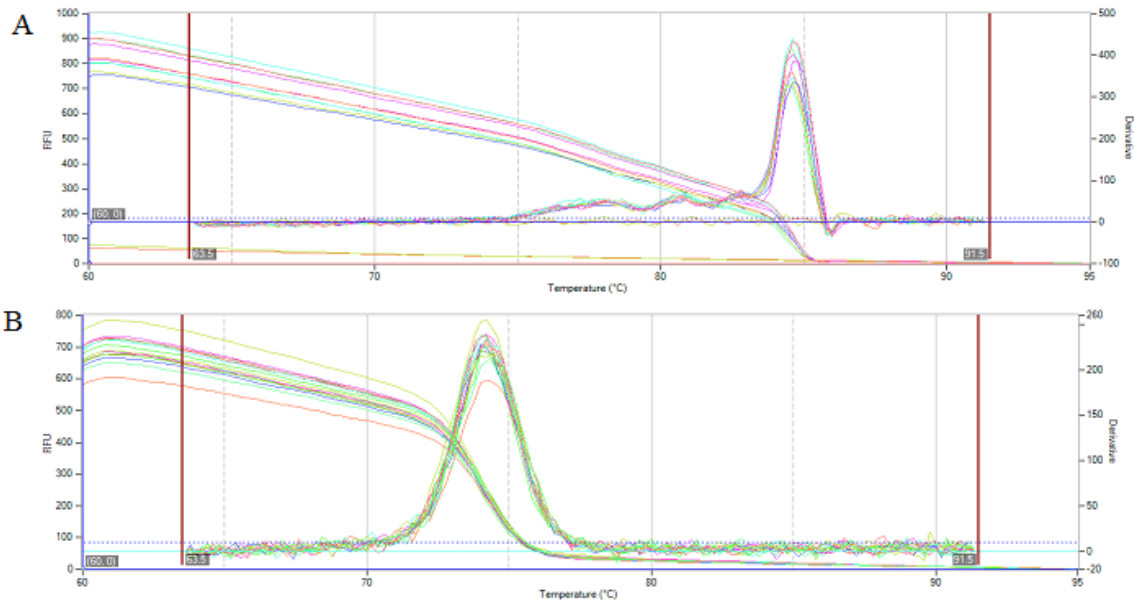


Figura V.5 Curva de desnaturalización de los transcritos de los genes f3'h (A) y actina (B) en las diferentes etapas de desarrollo floral.

Después de comparar la especificidad de la amplificación se estableció la cantidad de cDNA como molde, es importante mencionar que un exceso de cDNA podría enmascarar cambios en la expresión genética, ya que cuando aumente la expresión podría saturar el sistema y/o la reacción y el equipo solo pueda detectar la misma cantidad de fluorescencia base sin cambios. Por el contrario, la cantidad de cDNA insuficiente no permitirá detectar la baja expresión del gen, ya que solo una proporción del cDNA corresponde a la expresión del gen f3'h. Para la determinación de la cantidad de cDNA se evaluaron diferentes concentraciones (0, 1, 2, 3, 4, 10 ng). El resultado del experimento se presenta en la Fig. IV.6, en donde se observa los cambios en la acumulación de los transcritos, después de 5 ng, las lecturas no aumentan en forma proporcional con la concentración de cDNA utilizada como molde. El análisis fue realizado en distintas ocasiones independientes con los mismos resultados. De acuerdo a los resultados obtenidos durante la optimización en la concentración de ADN en el PCR-tr se decidió utilizar una concentración de 4 ng en los subsiguientes experimentos.

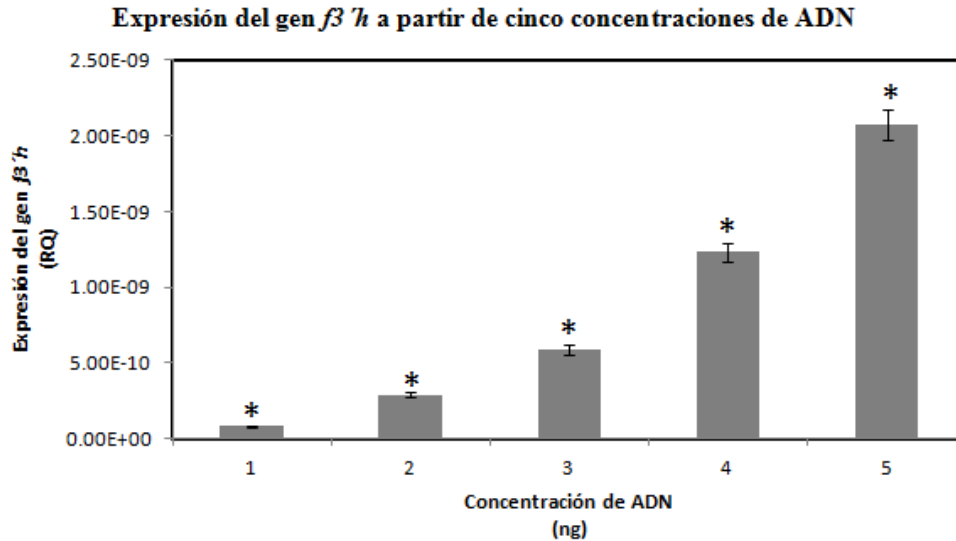


Figura V.6 Determinación de la cantidad de cDNA utilizado como molde para los análisis de la expresión de *f3'h*. El * representa los resultados estadísticamente diferentes con $P \leq 0.05$.

V.2.2.1 Análisis de la expresión del gen *f3'h* en las diferentes etapas de desarrollo floral de crisantemo.

Una vez establecidas las condiciones para el análisis de expresión del gen *f3'h*, se evaluó el nivel de expresión del gen en cada estado de desarrollo, para ello botones florales en diferentes etapas de desarrollo fueron colectados y congelados en nitrógeno líquido para la posterior extracción de ARN, misma que fue utilizada como base para la síntesis de cDNA. La carga de cDNA en cada mezcla de amplificación fue normalizada para la cuantificación de la expresión del gen de actina (gen de referencia). Todas las reacciones de PCR-tr se llevaron a cabo por triplicado para obtener una media representativa.

El análisis de los niveles de expresión de *f3'h* durante las cinco etapas de desarrollo del botón floral, mostro un cambio significativo en la cuantificación relativa (RQ), siendo la AC la etapa con mayor acumulación de transcritos (318.25 RQ), en contraste se observa un bajo nivel de expresión en las etapas IC, DC, MA y SE (Fig. IV-7), los cuales no mostraron diferencia estadística significativa entre ellos.

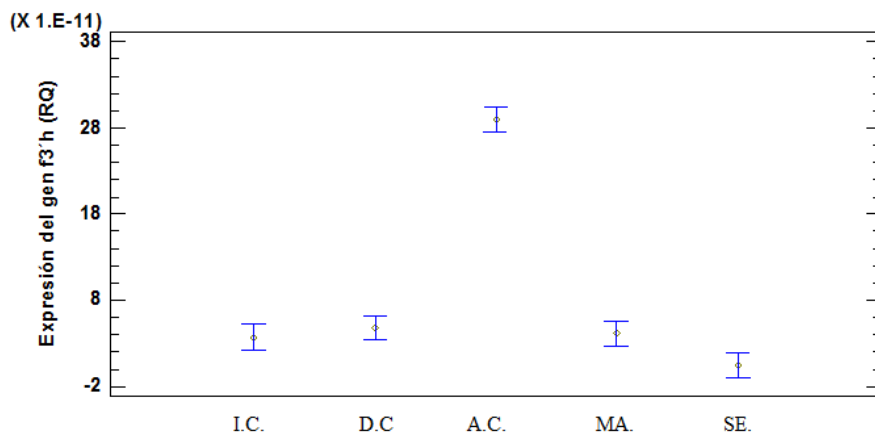


Figura V.7 Gráfica de medias en la cual se muestran la expresión del gen $f3'h$ en las diferentes etapas de desarrollo floral (EDF). En el eje de las x las EDF: Identidad celular (I.C), Duplicación celular (D.C.), Alargamiento celular (A.C), Maduración (MA.) y senescencia (SE).

Tabla V.1. Pruebas de rangos múltiples para la expresión del gen $f3'h$ por estado de desarrollo del botón floral.

<i>EDF</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
SE	3	4.19E-12	X
AC	3	3.66E-11	X
MA	3	4.16E-11	X
DC	3	4.74E-11	X
MA	3	2.9E-10	X

El patrón de los cambios en la acumulación de cianidina y la expresión del gen $f3'h$ coinciden en que la mayor proporción fue durante la etapa AC, para determinar la relación de la expresión del gen $f3'h$ sobre la acumulación de cianidina se realizó un análisis de correlación, en donde se demostró que existe una relación estadísticamente significativa entre la concentración de Cianidina y la expresión del gen $f3'h$ durante las diferentes etapas de desarrollo floral establecidas. El coeficiente de correlación obtenido fue 0.8904 (r) y una r^2 de 0.7921, indicando que existe una relación moderadamente fuerte o positiva entre la variables analizadas (Emerson, 2015), sugiriendo que a medida que cualquiera de las dos variables analizadas aumenta la otra tiende a aumentar. El modelo ajustado obtenido durante el análisis entre las variables indica una tendencia lineal positiva (Fig. IV.8) En estudios realizados en el análisis de antocianinas y otros flavonoides en pétalos de *Lotus Nelumbo nucifera* y *N. lutea*, Chen *et al.*,(2013), se reportó un coeficiente de correlación alta entre 0.85 y 0.98 en la concentración de antocianinas, resultados semejantes obtuvieron Schmitzer *et al.* , 2009 durante cuatro fases de desarrollo floral de *Rosa hybrida* L. var.

KORcrisett. Estos autores reportaron un coeficientes de correlación de Pearson positiva entre la concentraciones de cianidina-3,5-di-O-glucósido ($r=0.82$), Pelargonidina-3,5-di-O-glucósido (0.72) y Antocianinas totales (0.75).

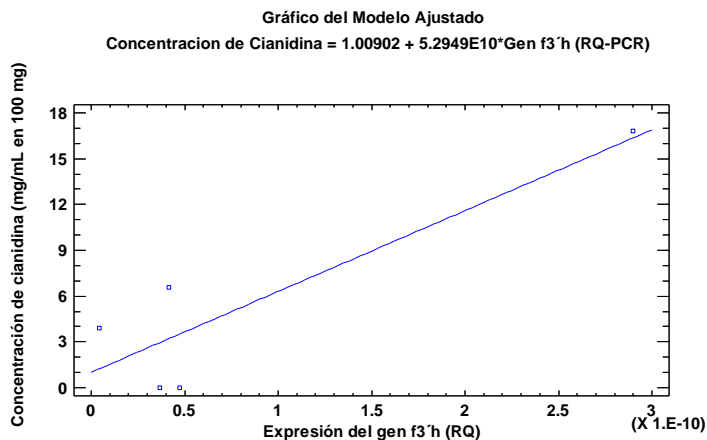


Figura V.8 Grafico del modelo ajustado obtenido durante la correlación entre la concentración de cianidina y la expresión del gen f3'h con una correlación positiva, en cinco etapas de desarrollo floral en plantas de crisantemo.

V.3 Conclusión

- A partir de las cinco etapas de desarrollo del botón floral de crisantemo analizadas (Identidad celular (I.C), Duplicación celular (D.C.), Alargamiento celular (A.C), Maduración (MA.) y senescencia (SE). Se encontró que solo en las tres últimas etapas de desarrollo fue posible detectar la presencia de cianidina cuyas concentraciones A.C fue de 16.79 mg/mL, MA fue 6.55 mg/mL y SE fue de 3.92 mg/mL, en 100 mg en base seca.
- Se obtuvo una mayor expresión de los transcritos del gen $f3^h$ en la etapa AM
- La correlación de Pearson y el coeficiente de determinación (R^2) entre los niveles de transcritos de la expresión del gen $f3^h$ y la concentración de Cianidina mostraron una correlación positiva con un valor de 0.8904 (r) y una r^2 de 0.7921 respectivamente.

Capítulo VI. Infección de plantas de crisantemo mediante pEuMV-YP: Δ AV1:f3'h.

VI.1 Introducción

El silenciamiento génico inducido por virus (VIGS- por sus siglas en inglés) es una técnica que emplea virus recombinantes de ADN o ARN para reducir específicamente la actividad de un gen endógeno a través de mecanismos de silenciamiento post-transcripcional (Kirigia *et al.*, 2014; Tuttle *et al.*, 2015). El silenciamiento mediante VIGS se ha utilizado como un método eficaz y de forma rutinaria en plantas de *N. benthamiana* para evaluar las funciones de genes en diversas vías de señalización, especialmente para la resistencia a enfermedades (Brigneti *et al.*, 2004). Una de las ventajas que presenta el sistema VIGS es el tiempo de inserción del gen blanco en el genoma del hospedantes y evitar largos proceso de transformación (Tuttle *et al.*, 2015).

Recientemente se ha propuesto el uso del virus bipartida EuMV, como sistema base de transformación, como vector de silenciamiento de genes, en donde después de modificar su estructura se obtuvo el sistema VIGS: EuMV- YP: Δ , compuesta de los componentes A y B; cuya eficiencia en el silenciamiento del gen Magnesium Chelatase (ChII) y NPR1, ha sido evaluada en *Nicotiana benthamiana* y *Capsicum annum*, confirmando la utilidad de este virus modificado como vector de transformación. Sin embargo, la eficiencia de transformación difiere dependiendo del hospedante, por ejemplo en plantas de *Jatropha (J. curcas)* las plantas no mostraron cambios en la expresión genética, aunque si detectaron la presencia del componente B (Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013).

En este capítulo se empleo el sistema de transformación EuMV- YP: Δ , para ser utilizado en plantas de crisantemo, para ello, se seleccionaron los genes ChII y f3'h como genes blancos del silenciamiento, ya que el silenciamiento del gen ChII resulta en una menor acumulación de transcrito del gen un cambio en la coloración de las hojas (manchas blancas) de plantas silenciadas. Por otra parte, el silenciamiento del gen f3'h puede resultar en la reducción en los niveles de transcritos y posiblemente en la disminución de la biosíntesis de cianidina (cambio en la coloración de las lígulas).

VI.2 Materiales y métodos

VI.2.1 Obtención del vector

La construcciones con el vector de EuMV-YP silvestre (HA), vector vacío EuMV-YP: Δ AV1 (CP) y VIG'S (pEuMV-YP: Δ AV1:f3'h) y el vector de Magnesio Quelatasa (EuMV-YP: Δ AV1:ChI) (Fig. V. 1), fueron construido por el Dr. Hernán de Jesús Villanueva Alonzo del Centro de Investigaciones Regionales Dr. Hideyo Noguchi de la UADY. Para inducir el silenciamiento del gen f3'h en crisantemo se partió del vector pEuMV-YP: Δ AV1 (Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013), el cual contiene el sitio múltiple de

clonación: *Sph*_I, *Sma*_I, *Pst*_I, y *EcoR*_V, y de un fragmento del gen *f3 h* de crisantemo previamente clonado en el vector pGem T Easy, el cual fue extraído de este vector mediante la digestión con *EcoRI* y ligado al vector pBluescrip KS digerido previamente con *EcoRI* obteniendo el plásmido pBluescrip:*f3 h*, el cual fue digerido con *EcoRV* y *PstI* para liberar el fragmento *f3 h*, este fragmento fue clonado en el pEuMV-YP: Δ AV1 digerido previamente con *EcoR*_V y *Pst*_I. Con lo cual se obtuvo el vector VIGS pEuMV-YP: Δ AV1:*f3 h*.

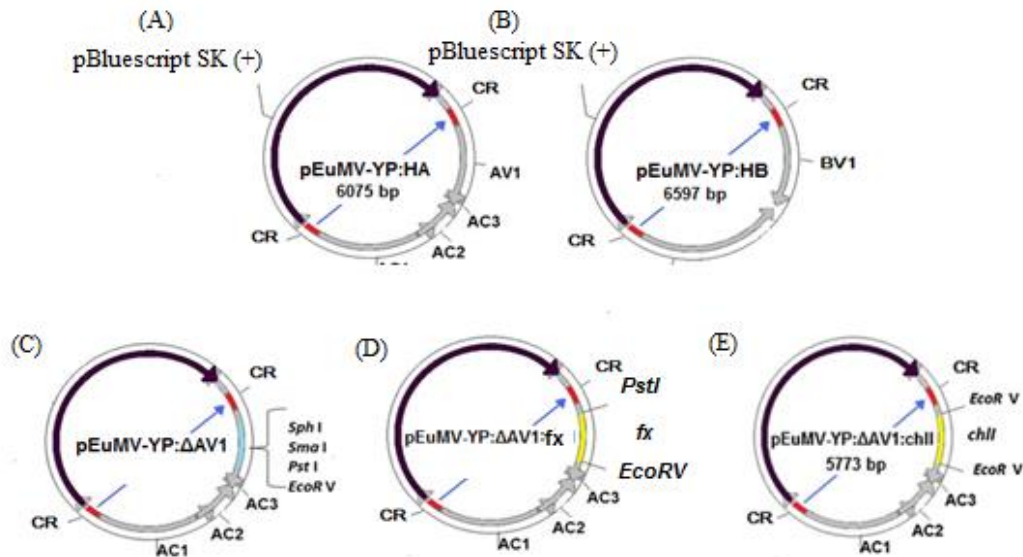


Figura VI.1. Plásmidos empleados para la inoculación. (A y B) hemidímeros de EuMV-YP, en color rojo se señalan las regiones comunes (CR), en color gris el genoma viral y en color negro el plásmido pBluescript SK + (Cortesía del Dr. Hernán Villanueva CIR-UADY).

La línea azul señala el sitio de inicio de la replicación por círculo rodante, el sitio de corte y recirculación del genoma viral durante la replicación. Esquema de las construcciones del vector VIGS (C) Componente A del *Euphorbia Mosaic Virus*-Yucatan Peninsula modificado a vector VIGS (pEuMV-YP: Δ AV1:*f3 h*); (D) Esquema del pEuMV-YP: Δ AV1:*f3h*, en color amarillo es la parte donde se encuentra el inserto del gen *f3 h*. (E) Esquema del pEuMV-YP: Δ AV1:*chll*.

VI.2.2 Obtención del material vegetal.

Plantas de crisantemo fueron cultivadas en fibra de coco:peat-moss:tierra roja en una proporción 1:1:0.5 v/v y fertilizadas con 3 mL/L de Bayfolan-Forte cada dos días, las plantas fueron podadas a los 15 días antes de la inoculación para obtener nuevos brotes.

VI.2.3 Inoculación por bombardeo.

La inoculación se realizó con diferentes construcciones del vector, utilizando 25 plantas de aproximadamente 10 cm de altura de Crisantemo (*D. grandiflora*) var. Micromargara con cuatro a seis hojas que fueron bombardeadas con micropartículas de oro como se describe en Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013. Las partículas de oro de 1 µm fueron cubiertas con 5 µg de ADN de cada construcción con el genoma viral de EuMV-YP, 50 µL de 2.5 M CaCl₂ y 20 µL de espermidina al 0.1 M. La solución fue agitada en vórtex por 3-5 min y después incubada en hielo por el mismo tiempo, las muestras fueron centrifugadas a 10,000 g por 15 seg. La pastilla fue lavada con 250 µL de alcohol absoluto y fue nuevamente centrifugada a 10,000 rpm por 15 seg. De la pastilla se tomara 10 µL de la solución y se colocó en un filtro milipore (Filter millipore 8-winnex-13) con poros de 1 cm de diámetro para cada disparo. El bombardeo se realizó con un equipo portátil mediante biobalística utilizando gas He para alcanzar la presión deseada a 60 psi, todas las plantas fueron bombardeadas a una distancia de 2 cm del filtro. Las plantas fueron inoculadas con las construcciones descritas en la tabla 1. Además se mantuvieron plantas sin inocular y plantas *in vitro* como testigo negativo. Las plantas inoculadas fueron mantenidas y crecidas a una temperatura de 25 ±2 °C con un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad).

Tabla VI.1. Vectores construidos a partir de EuMV-YP

Código	Vectores	Descripción
A	EuMV-YP:ΔAV1	Virus Silvestre
B	EuMV-YP:ΔAV1: <i>ChI</i>	Vector de silenciamiento Magnesio Quelatasa
C	EuMV-YP:ΔAV1:	Vector vacío
D	EuMV-YP:ΔAV1: <i>f3' h</i>	Vector de silenciamiento para el gen <i>f3' h</i>
E	Plantas no inoculadas	Control negativo

VI.2.4 Extracción de ADN en hojas de crisantemo.

La extracción de ADN se realizó con el método de DNazol (Invitrogen), el cual consistió en homogenizar 100 mg de muestra pulverizada con 1 ml de DNazol, después de 10 minutos las muestras fueron centrifugadas a 1,200 g por 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante fue transferido a un tubo con 500 µL de isopropanol, después de homogenizar por inversión las muestras fueron incubadas por 60 minutos a -20°C, posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 1,200 g por 10 minutos a temperatura ambiente, el sobrenadante fue retirado y la pastilla fue lavada con etanol en dos ocasiones,

descartando el sobrenadante, este pasó se repitió por dos ocasiones. Al finalizar los lavados con etanol se deja secar la pastilla por 20 minutos y se adicionó 40 μ L de agua ultrapura libre de RNasas y DNasas.

La integridad del ADN extraído se verificó mediante electroforesis, en un gel de agarosa al 1% el cual contiene una solución amortiguadora TAE y 0.05 mg/mL de bromuro de Etidio. El gel de electroforesis fue sometido a un voltaje de 85 volts por 45 minutos. Posteriormente las bandas fueron visualizadas en un fotodocumentador UVP con cámara integrada (UV-High Performance, UV transiluminator). Para confirmar la calidad se realizó la verificación del ADN mediante la espectrofotometría a una relación de 1.8 a 2 en una absorbancia de A_{260} nm/ A_{280} nm (Taylor *et al.*, 2010).

VI.2.5 Detección del ADN viral mediante PCR

Se tomó 100 ng de ADN total extraído a partir de plantas inoculadas con las construcciones descritas en la Tabla 1. Para la detección de EuMV-YP se realizó un RT-PCR, bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo a 94°C por 30 s, 55 °C por 30 s, y 72°C por 30 s por 35 ciclos; y un ciclo de 72 °C por 10 min. Utilizando el par de oligonucleótidos 5'-GACACCAGGACACCAGCAAT-3' y 5'-TTTGGGAACATCGCACTGAG-3' dirigida contra el gen *AC1* en EuMV-YP y los oligonucleótidos AV494: 5'-GCCYATRTAYAGRAAGCCMAG-3' y AC1048: 5'-GGRTTDGARGCATGHGTACATG-3' dirigida a la región AC presente en el vector A (Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013). El producto de PCR fue verificado en un gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio. Las bandas amplificadas en el gel de agarosa fueron purificadas utilizando el kit "PureLink® quick gel Extracción" siguiendo la metodología recomendada por el proveedor (Invitrogen). Los productos purificados fueron enviados para su secuenciación a Macrogen en Corea.

VI.2.6 PCR tiempo real (PCR-tr)

Para confirmar la infección de los diferentes vectores se realizó la amplificación de un fragmento del gen AC1 localizado en el componente A mediante PCR tiempo real (PCR-tr) utilizando el kit comercial Luminaris HiGreen qPCR Master Mix (No. K0991), con un volumen final de 10 μ L por reacción según las indicaciones del fabricante (Invitrogen) utilizando 100 ng de ADN de cada planta inoculada mediante bombardeo. Las reacciones de PCR-tr se realizaron en placas de 96 pozos, con los controles necesarios y por triplicado. Como control positivo se utilizó el plásmido del componente AC del vector Mg-Quelata (pEuMVYP: Δ AV1:chlI) utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar un fragmento de 148 pb dirigido al gen AC1.

VI.2.7 Detección de la expresión del gen *f3'h* en botones florales de plantas inoculadas mediante PCR-tr

La extracción de ARN, síntesis de cDNA y las condiciones de amplificación para PCR-tr se realizó en botones florales durante la fase de Alargamiento celular (AC) en plantas inoculadas siguiendo la metodología establecida en el capítulo 4.

VI.3 Extracción de Cianidina, cuantificación y análisis mediante HPLC en botones florales de crisantemo de plantas inoculadas

Se colectaron botones florales de Crisantemo, durante la etapa de desarrollo floral de alargamiento celular a partir de plantas inoculadas con los diferentes vectores, siguiendo la metodología de extracción de antocianinas en botones florales y cuantificación de antocianinas mediante HPLC descrito en el capítulo 2.

Los extractos obtenidos se analizaron en conjunto con estándares con el fin de confirmar la presencia de la Cianidina, utilizando el estándar comercial Cloruro de Cianidina (ALX-385-003-M010, Enzo Life Sciences) de grado analítico. Elaborando una curva de calibración de 9 puntos (0, 5, 10, 20, 40, 80, 100, 200 y 300 ppm), diluidos en metanol grado HPLC, inyectando por triplicado cada una de las concentraciones y los datos obtenidos de las muestras se interpolaron en la curva con una $R^2 = 0.9935$. Los resultados se expresaron en mg/mL de Cianidina en 100 mg de Base Seca (BS).

VI.4 Análisis estadísticos

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para establecer si existen diferencias significativas entre las medidas de los valores en los diferentes tratamientos y la prueba de comparación de medias (Tukey $P \leq 0.05$) para todas las variables registradas, mediante el programa estadístico se realizó con el programa Statgraphics Centurión XVI versión 16.1.11.

VI.5 Resultados y discusión

VI.5.1 Bombardeo de crisantemo con construcciones VIGS

Para determinar si el sistema de VIGS es adecuado para inducir el silenciamiento génico en plantas crisantemo, se propuso utilizar diferentes construcciones a partir de EuMV-YP. 1.- pEuMVYP: Δ AV1:ChII, construcción diseñada para silenciar el gen de la magnesio quelatasa, este silenciamiento evita la acumulación de la clorofila en los diferentes tejidos de la planta, provocando manchas o zonas de color blanco, Hernández-Zepeda *et al.*, 2007. La construcción 2.- pEuMV-YP: Δ AV1:f3'h, diseñada para inducir el silenciamiento del gen flavonoide 3'-hidroxilasa (f3'h) que está relacionado con la acumulación de Cianidina y se sugiere que su silenciamiento puede resultar en una disminución en la concentración de Cianidina. Adicionalmente se utilizaron testigos de transformación 3.- vector vacío (pEuMV-YP: Δ AV1), y 4.- virus silvestre pEuMV-YP.

La inoculación consistió en introducir las cuatro construcciones (anteriormente descritas) por medio de bombardeo (Fig. V. 2), se utilizaron cinco plantas por cada construcción. Las plantas inoculadas fueron llevadas a un cuarto de incubación que se mantiene a una temperatura de 25 ± 2 °C con un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad). Posteriormente a la inoculación de los diferentes vectores se monitorearon las plantas cada cuatro días para detectar si existía algún cambio morfológico ocasionado por el bombardeo. En todas las plantas inoculadas con la construcción pEuMVYP: Δ AV1:chlI se realizó la verificación de las hojas y tallos para observar algún síntoma o efecto que se pudiera sugerir el silenciamiento de magnesio Quelatasa. Finalmente todas las plantas inoculadas fueron inspeccionadas para detectar la presencia de algún daño en las hojas debidas al bombardeo.



Figura VI.2. Proceso de inoculación mediante bombardeo con las diferentes construcciones en plantas de crisantemo. Equipo para la inoculación (A), Preparación de la muestra para la inoculación (B y C), Sistema de inoculación (D), Planta de crisantemo inoculada (E): hoja bombardeada (E1) y hoja no bombardeada (E2), Incubación de las plantas bombardeadas (F).

VI.5.2 Detección de la infección por métodos moleculares PCR

Para determinar la infección de las plantas bombardeadas independientemente de la construcción, se propuso la detección molecular dirigida a la región AC y AV en los diferentes vectores. Para ello, a los 20 días posterior a la inoculación (dpi), se tomaron las hojas en las cuales se realizó el bombardeo. Adicionalmente se tomaron hojas cercanas a las bombardeadas. Todas las hojas colectadas fueron etiquetadas y almacenadas a -80°C . El análisis inició con la extracción de ADN de todas las hojas por el método de DNAzol (Invitrogen), el proceso permitió obtener ADN con una calidad espectrofotometría entre 1.8 a 2 en una absorbancia de $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$.

La integridad del ADN fue verificada por medio de un gel de agarosa como se describió en la metodología. Las imágenes digitalizadas se presentan en la Fig. V.3, donde se observa una sola banda de un tamaño superior a los 4 kb. En la parte superior de cada gel corresponde a las muestras de hojas bombardeadas y la parte inferior corresponde a las muestras de hojas no bombardeadas con un total de 10 extracciones por tratamiento.

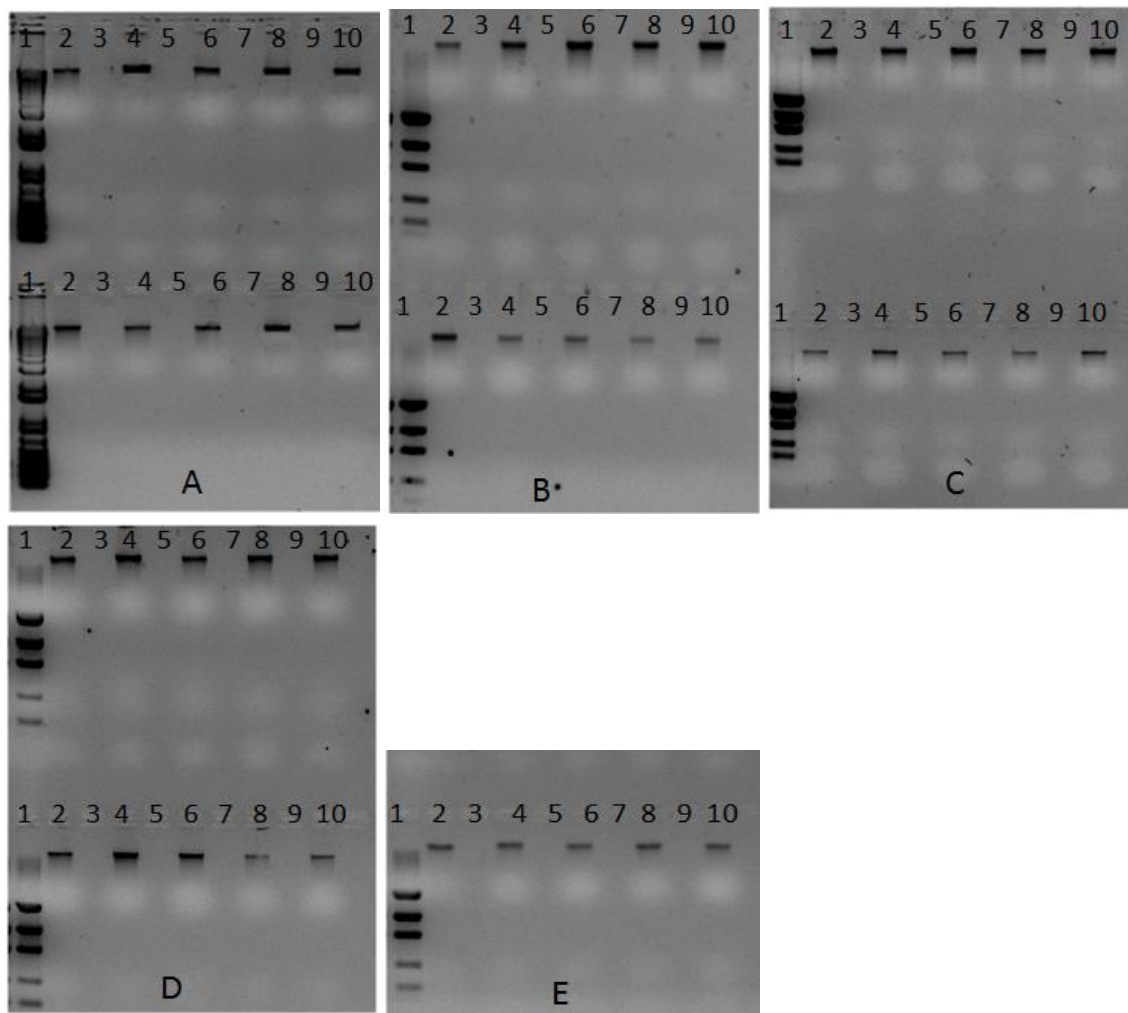


Figura VI.3. Gel de agarosa al 1%, parte superior ADN de hojas bombardeadas y la parte inferior ADN de hojas vecinas con cinco plantas inoculadas. A- Mg-Quelata (pEuMVYP: Δ AV1:chlI). B.- Virus silvestre (pEuMVYP). C.- Vector vacio (EuMV-YP: Δ AV1). D.- Vector EuMV-YP: Δ AV1-f3'h. E.- Testigo negativo.

El siguiente paso, fue la detección de EuMV-YP por medio del PCR, para ello 100 ng de ADN se utilizó como template, como se describe en la metodología. La amplificación se realizó utilizando los oligos AV494: 5'-GCCYATRtayagraagccmag-3' y AC1048: 5'-GGRTTDGARGCATGHGTACATG-3' se detectó la región AC y AV del componente CA del sistema VIG's. El resultado se presentó en la Fig. V.4, en la cual se observó en plantas inoculadas con las diferentes construcciones pEuMVYP: Δ AV1:chlI, virus silvestre (pEuMVYP), Vector vacio (EuMV-YP: Δ AV1) y Vector EuMV-YP: Δ AV1-f3'h, presento una banda de un tamaño aproximado de 650 pb en los carriles del 3 al 8 de cada gel.

El ADN extraído a partir de plantas no inoculadas fueron utilizadas para las reacciones de amplificación, mediante PCR como testigo negativo y como testigo positivo se utilizo ADN plásmidico obtenido a partir de clonas con las construcciones de pEuMVYP:ΔAV1:ChII (Fig. V.4).

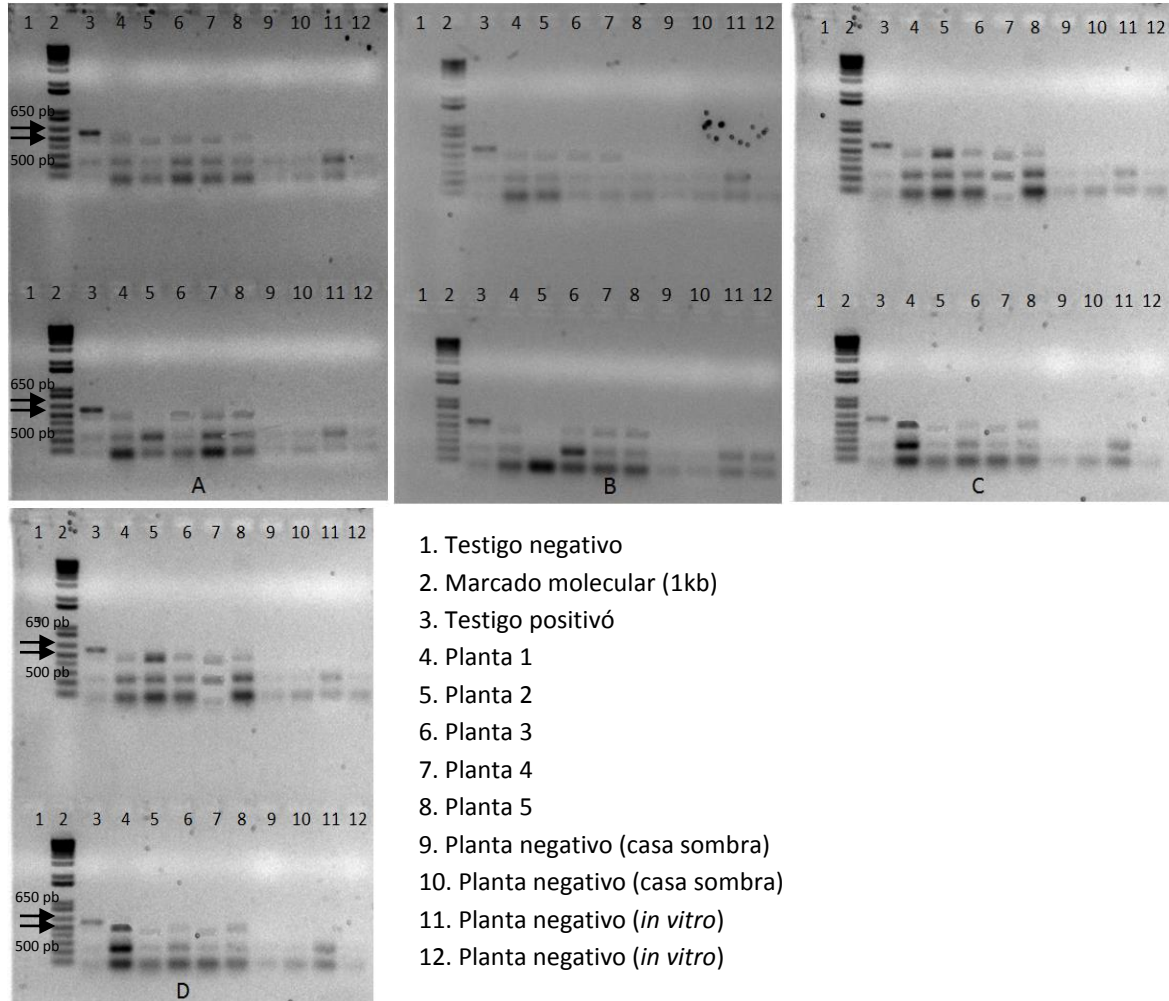


Figura VI.4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la amplificación mediante PCR de las muestras de ADN de las plantas inoculadas. En el gel se puede observar las fechas que señala a la banda entre la 600 y 550 pb, el cual corresponde al tamaño del fragmentó esperado del gen localizado en el componente A.

Las amplificaciones obtenidas en las plantas inoculadas con las diferentes construcciones pEuMVYP:ΔAV1:chlI, virus silvestre (pEuMVYP), Vector vacio (EuMV-YP:ΔAV1) y Vector EuMV-YP:ΔAV1-f3'h, presentaron una banda del tamaño de 650 pb, lo cual podría deberse a los productos inespecíficos, por lo que fue necesario confirmar que la banda de 650 pb correspondía a la amplificación de la región AC del vector pEuMVYP:ΔAV1, la banda fue aislada para su subsecuente secuenciación, el resultado de la purificación se

presenta en la Fig. V.5, en donde se observa una imagen digitalizada de un gel de agarosa al 1%, la parte superior de la imagen (Fig. V.5A) se encuentran los productos amplificados mediante PCR, de las cuales fueron aisladas y purificadas como se describe en la metodología. La parte inferior de la imagen (Fig. V.B) se observan las bandas aisladas y purificadas a partir de amplificaciones de las muestras. Los productos aislados fueron enviados para su secuenciación.

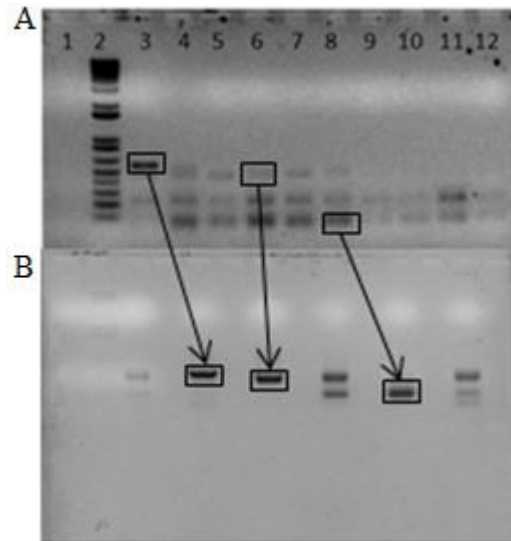


Figura VI.5. Parte superior de la imagen producto de la amplificación por PCR, en la cual se aislaron tres bandas (en recuadro). Parte inferior de la imagen se observa el producto las re-amplificación de las bandas aisladas en un gel de agarosa al 1%.

VI.5.3 Secuenciación

Las secuencias resultantes fueron de un tamaño de 516 pb, la cual fue alineada en la base de datos de la NCBI presentando una similitud de 98 y 99% con secuencias del virus *Pepper golden mosaic virus strain Tamaulipas* componente A (Tabla V.2). La similitud se puede observar en la Fig. V.6, en donde se presenta la alineación de la secuencia obtenida con las secuencias de las accesiones U57457.1, LN848795.1 y LN848769.1, reportadas en la base de datos del NCBI. Las secuencias provenientes de fragmentos inespecíficos que fueron purificados (Fig. V.5B) en las diversas plantas no se alinearon con alguna secuencia reportada.

Tabla VI.2. Porcentaje de similitud que comparte la secuencia obtenida en este trabajo con secuencias reportadas en la base de datos del NCBI.

Gen	No. de accesión	Secuencia reportada en la NCBI	Similitud %
<i>Componente A</i>	U57457.1	Pepper golden mosaic virus strain Tamaulipas component A, complete sequence	99
	LN848795.1	Pepper golden mosaic virus segment DNA-A, complete sequence, isolate TUL2028L2001	98
	LN848769.1	Pepper golden mosaic virus segment DNA-A, complete sequence, isolate DZI03W2007	98

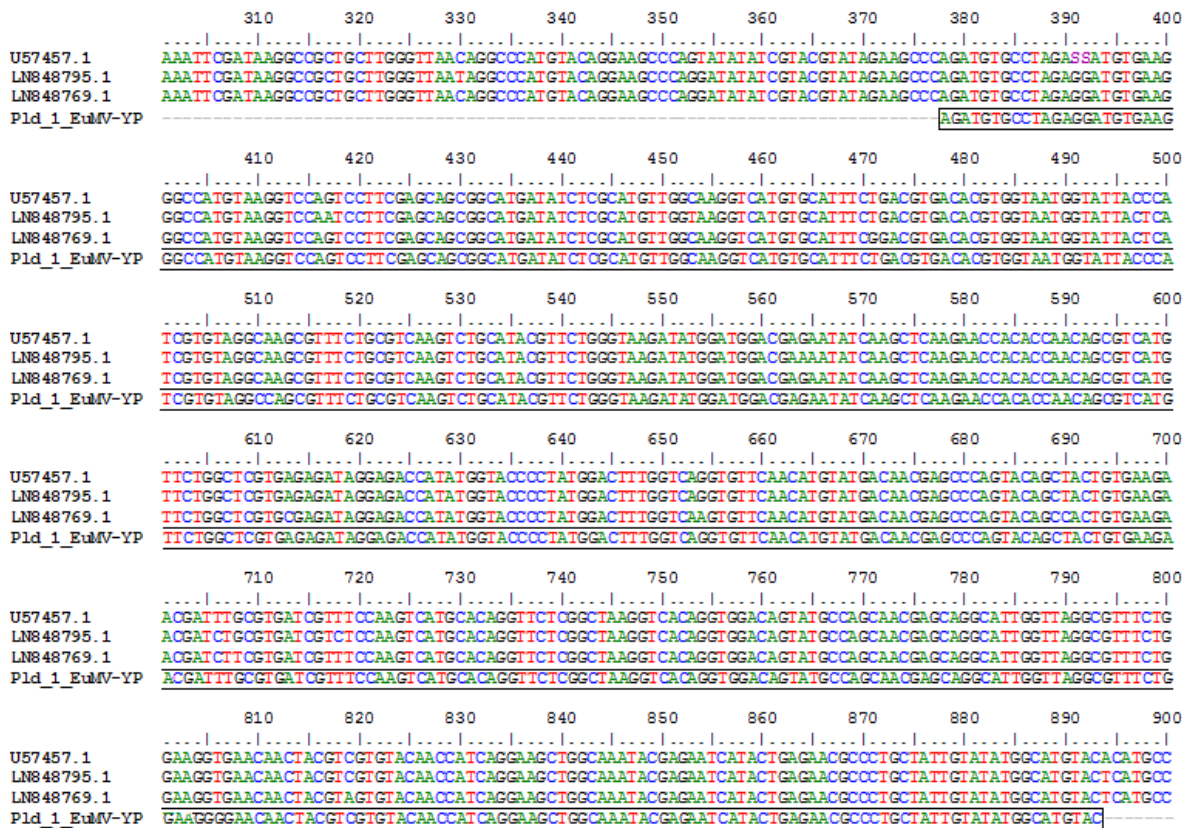


Figura VI.6. Alineamiento de la secuencia parcial del gen que codifica para el componente A del virus EuMV-YP en secuencias reportadas.

En este estudio se evaluó la capacidad de infección de las construcciones pEuMVYP:ΔAV1:chlI, virus silvestre (pEuMVYP), Vector vacío (EuMV-YP:ΔAV1) y Vector EuMV-YP:ΔAV1-f3'h, sin embargo no se detectó la infección por pruebas moleculares, sin embargo Hernández-Zepeda *et al.*, 2007 reporta que la sintomatología puede variar en ocho especies de plantas como *Cucurbita maxima* cv. Big Max (Cucurbitaceae), *Euphorbia heterophylla* (Euphorbiaceae), *Phaseolus vulgaris* cv. Top Crop (Fabaceae), *Gossypium hirsutum* cv. Delta y *Malva parviflora* (Malvaceae) y *Capsicum annuum* cv. Anaheim, *Datura stramonium* y *Lycopersicon esculentum* cv. Humaya (Solanaceae) que representan a cinco familias de plantas, las cuales fueron inoculadas mediante la técnica de Biobalística con EuMV-YP, plantas como *C. máxima*, *G. hirsutum*, y *M. parviflora* no presentaron los síntomas causados por EuMV-YP, sin embargo en plantas de *E. heterophylla* y *C. annuum* se obtuvo un 100% de plantas con síntomas característicos. En plantas de crisantemo inoculadas con el virus silvestre (EuMV-YP) no se observaron cambios en la morfología, similar a lo encontrado en *Jatropha curcas*, *A. thaliana*, *Cucurbita maxima* cv. Big Max, *Gossypium hirsutum* cv. Delta y *Malva parviflora*. En contraste en plantas como *Ricinus communis*, *Capsicum chinense*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana benthamiana*, *Euphorbia heterophylla* y *Capsicum annuum* cv. Anaheim donde

el 100% de las plantas infectadas presentaron la sintomatología esperada a los 7 a 12 dpi (Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013, Hernández-Zepeda *et al.*, 2007).

Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013 modificaron al EuMV-YP aislado, construyendo un vector con la capacidad de silenciar genes mediante VIGS, el cual fue utilizado para el silenciamiento del gen *NPR1* y *Magnesio Quelatasa* a partir de las construcciones pEuMVYP: Δ AV1:*NPR1* y pEuMVYP: Δ AV1:chlI respectivamente, plantas inoculadas con el vector pEuMVYP: Δ AV1:*NPR1* fue eficiente en ambas plantas. En *N. benthamiana* inoculadas con la construcción pEuMVYP: Δ AV1:chlI, fue eficiente en tejidos de hoja, tallo y peciolo presentando tejido blanqueado y la reducción de los niveles de transcritos de *ChlI* a los 5 días posteriores a la inoculación (dpi). Para la inoculación de las diferentes construcciones en plantas de crisantemo en este estudio se realizó la inoculación del vector pEuMVYP: Δ AV1:chlI el cual fue utilizado como un método de evaluación visual debido a la sintomatología reportada, sin embargo la sintomatología no fue observada en los diferentes días posteriores a la inoculación, tal como se observa en la Fig.V.7 con los diferentes días.



Figura VI.7. Plantas de crisantemo inoculadas con el vector pEuMVYP: Δ AV1:ChlI para silenciar el gen que codifica a Magnesio Quelatasa durante los 8, 12, 18, 22, 28 y 33 días posteriores a la inoculación (dpi).

VI.5.4 Diagnóstico por PCR tiempo real (PCR-tr) para EuMV-YP

La amplificación de un fragmento de 148 pb del gen AC1 por PCR-tr, se realizó para diagnosticar la presencia del vector en las plantas inoculadas mediante bombardeo, de manera que el diagnóstico positivo en este trabajo fue para confirmar la infección de las plantas bombardeadas. La amplificación se realizó a partir de 100 ng de ADN como template, siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos. La amplificación se realizó utilizando los oligos específicos 5'-GACACCAGGACACCAGCAAT-3' y 5'-TTTGGGAACATCGCACTGAG-3' que detecta la región del gen AC1 del sistema VIGS que amplifica un fragmento de 148 pb. El producto de las amplificaciones durante PCR-tr se visualizó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio que se presenta en la Fig. V.8, el cual se observa un fragmento de aproximadamente 200 pb en el testigo positivo, sin embargo, la banda amplificada no fue detectada en ADN de plantas de crisantemo.

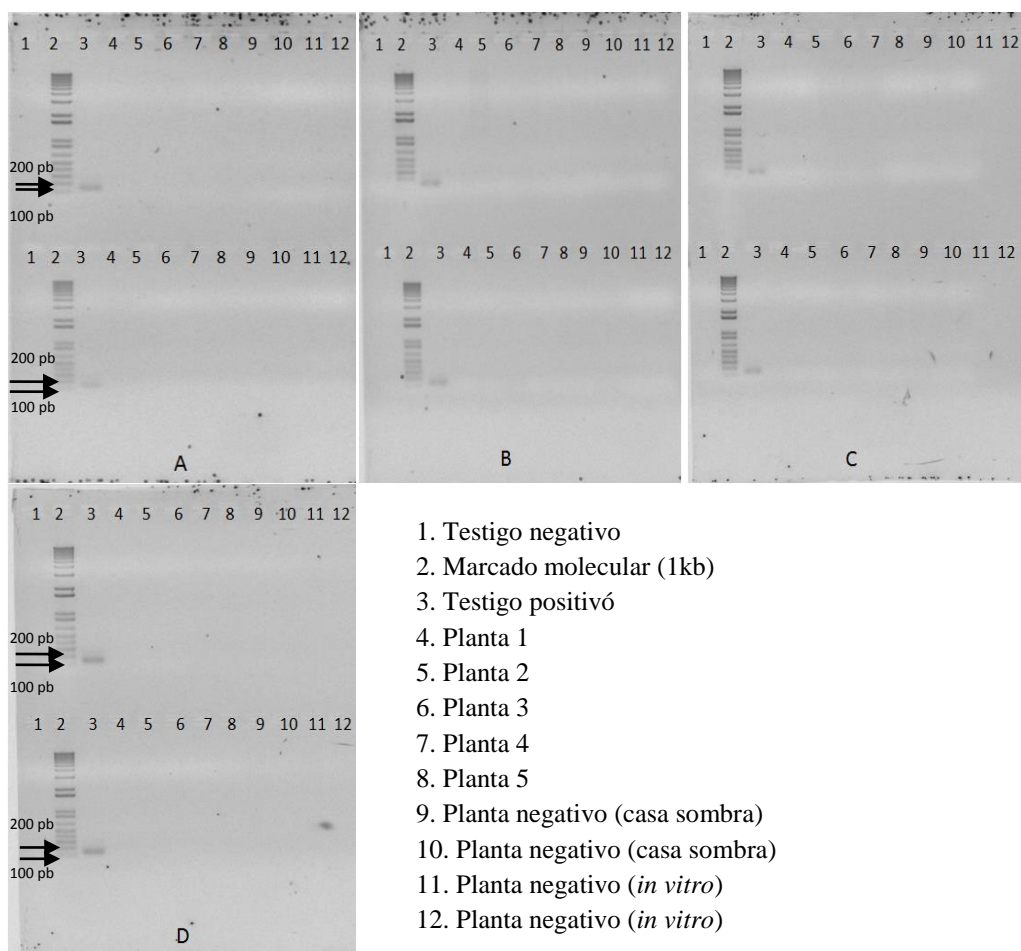


Figura VI.8. Producto de la amplificación del PCR-tr en un gel de agarosa al 1% de plantas inoculadas con los diferentes construcciones: A.- Mg-Quelatas (pEuMVYP:ΔAV1:chlI). B.- Virus silvestre (pEuMVYP). C.- Vector vacío (EuMV-YP:ΔAV1). D.- Vector EuMV-YP:ΔAV1-f3'h.

El análisis de la cuantificación relativa (RQ “*Relative quantification*” por su siglas en ingles) realizado durante el PCR-tr en muestras de ADN, se logro detectar la presencia del gen AC1 en el testigo positivo, obteniendo un RQ de 6.20E-06 tal como se observa en la Fig. V 9-A. El análisis de la curva de desnaturalización y ciclos cuantificados durante la amplificación del PCR-tr se observó un pico específico en color rojo (Fig. V 9 B y C), sin embargo, no fue detectada la presencia del gen AC1 en muestras con ADN de planta inoculadas mediante bombardeo.

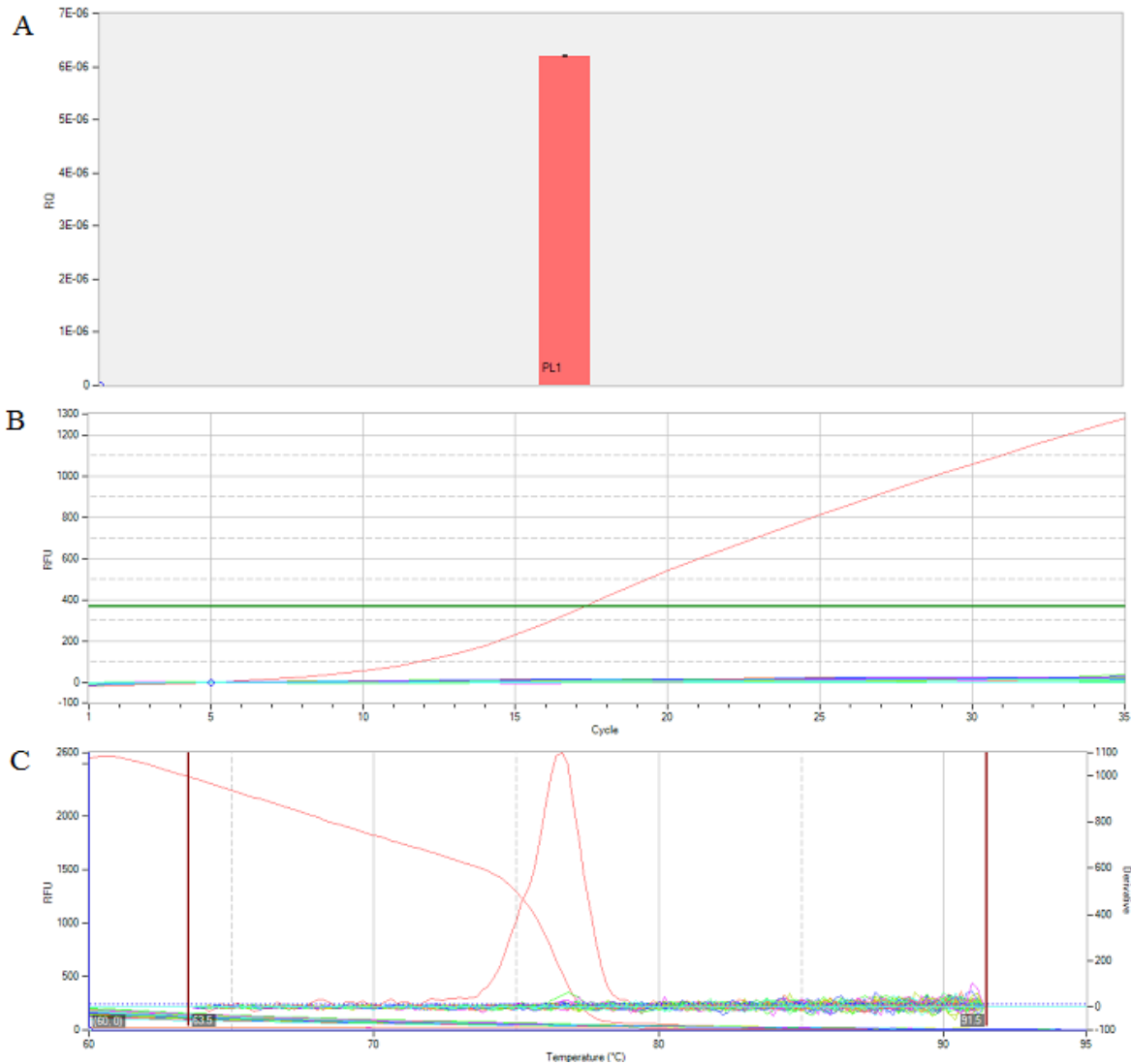


Figura VI.9. Gráficas de la detección del gen AC1 incluido en el vector EuMV-YP a partir de diferentes muestras de ADN en plantas inoculadas con las diferentes construcciones mediante PCR-tr. Cuantificación relativa (A), Ciclos cuantificados “Cq” (B) y Melting curve (C). En rojo amplificación del gen AC1 a partir del testigo positivo.

VI.5.5 Detección de la expresión del gen *f3'h* en botones florales de plantas inoculadas mediante PCR-tr

De acuerdo al análisis de expresión del gen *f3'h* mediante PCR-tr realizado en el capítulo 3 en las diferentes etapas de desarrollo floral, se estableció que la etapa de alargamiento celular "AC" presento la mayor expresión de los transcritos en relación con el gen de Actina utilizado como referencia, para comparar la expresión del gen *f3'h* en la etapa de alargamiento celular. Para este análisis, botones florales en la etapa de alargamiento celular "AC" (Fig. V.10), fueron colectados en plantas inoculadas con las diferentes construcciones establecidas. Los botones colectados fueron congelados en Nitrógeno líquido y guardados a congelación a -80°C para realizar la expresión del gen *f3'h* mediante PCR-tr.

La extracción de ARN, síntesis de cDNA se realizó siguiendo la metodología establecida en el capítulo 3. La cuantificación del ARN y cDNA se realizó por espectrofotometría con una relación de 1.8 a 2 en una absorbancia de $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ visualizada en un gel de agarosa al 1% en botones florales (Fig. V. 10).

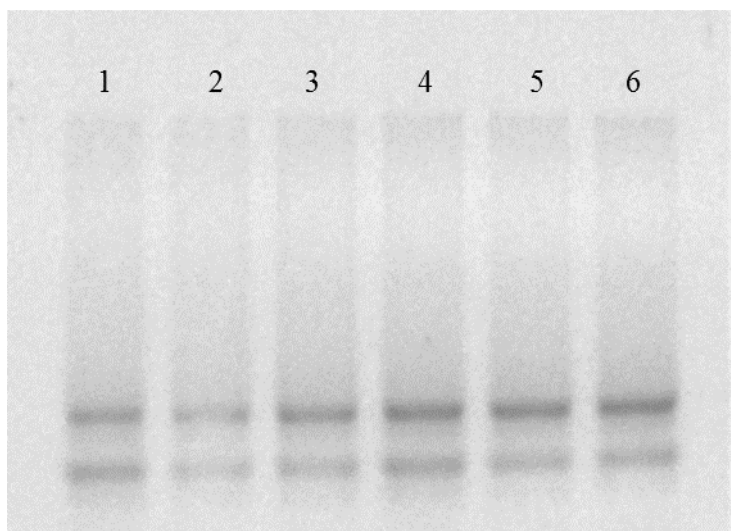


Figura VI.10. Producto de la extracción de ARN a partir de botones florales en la etapa de alargamiento celular "AC" en plantas inoculadas con los diferentes vectores construidos: 1 y 2: Vector Mg-Quelata (pEuMVYP: Δ AV1:chlI), 3: Vector virus silvestre (pEuMVYP), 4: Vector vacío (EuMV-YP: Δ AV1), 5: Vector VIG'S *f3'h* (EuMV-YP: Δ AV1:*f3'h*) y 6: planta silvestre (PS) en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

La determinación del nivel de expresión del gen *f3'h* a partir de la EDF de alargamiento celular “AC” en plantas inoculadas, fue realizado mediante PCR-tr. Los resultados obtenidos no presentaron diferencias significativas en la expresión del gen *f3'h* comparadas con plantas silvestres.

La cuantificación relativa (RQ) mediante PCR-tr de la expresión de los niveles de transcritos del gen *f3'h*, en plantas inoculadas con los diferentes vectores durante la fase de alargamiento celular “AC” comparados con los niveles de transcritos del gen de Actina utilizado como referencia, se observa en la grafica de la Fig. V.11 el cambio de la expresión del gen *f3'h* en plantas inoculadas

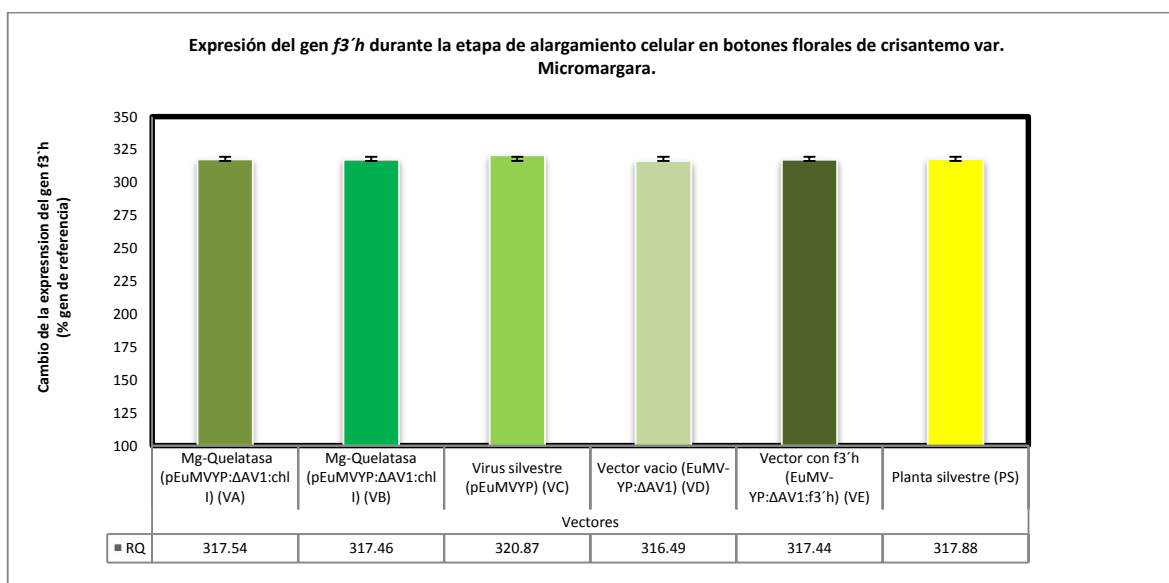


Figura VI.11. Cuantificación relativa de los niveles de transcritos en la expresión del gen *f3'h* /Actina mediante PCR-tr, en la etapa de Alargamiento celular “AC”. VA y VB: Vector Mg-Quelatas (pEuMVYP:ΔAV1:chlI), VC: Vector virus silvestre (pEuMVYP), VD: Vector vacío (EuMV-YP:ΔAV1), VE: Vector VIG’S *f3'h* (EuMV-YP:ΔAV1:*f3'h*) y PS: planta silvestre.

VI.5.6 Análisis estadístico de la expresión del gen *f3'h*.

El análisis estadístico mediante ANOVA indico que no existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos durante la expresión del gen *f3'h* con un 95.0% de de confianza (p-valor<0.05) (Fig. V.12).

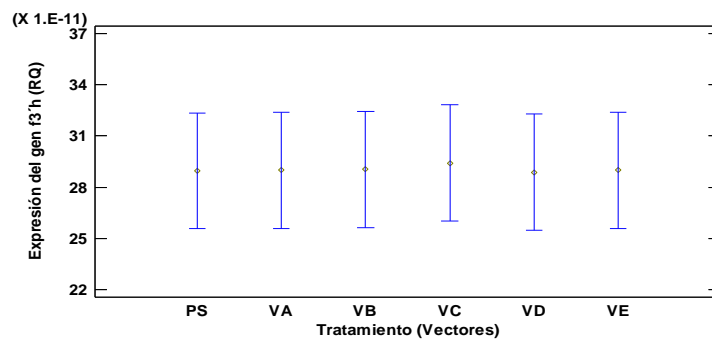


Figura VI.12. Grafica de medias y grafica de dispersión en la cual se muestran la expresión del gen f3'h en los diferentes tratamientos (Vectores). En el eje de las x los tratamientos: VA y VB: Vector Mg-Quelata (pEuMVYP: Δ AV1:chlI). VC: Vector virus silvestre (pEuMVYP). VD: Vector vacío (EuMV-YP: Δ AV1). VE: Vector VIG'S f3'h (EuMV-YP: Δ AV1:f3'h) y PS: planta silvestre.

Tabla VI.3. Pruebas de Rangos Múltiples para la expresión del gen Actina por EDF.

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
PS	3	9.1104E-11	X
VD	3	9.12359E-11	X
VA	3	9.13281E-11	X
VE	3	9.13614E-11	X
VB	3	9.15117E-11	X
VC	3	9.26481E-11	X

VI.5.7 Cuantificación de Cianidina en plantas inoculadas con VIG's

Para determinar el efecto de la inoculación de las plantas de crisantemo mediante bombardeo con las diferentes construcciones: Vector Mg-Quelataasa (pEuMVYP: Δ AV1:chlI), Vector virus silvestre (pEuMVYP), Vector vacio (EuMV-YP: Δ AV1) y Vector VIG'S f3'h (EuMV-YP: Δ AV1:f3'h), sobre el contenido de cianidina en los petalos de las plantas infectadas, se cuantificó la concentración de cianidina durante la fase de alargamiento celular "AC" en botones florales mediante HPLC. Los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos se muestran en los cromatogramas (Fig. V. 13).

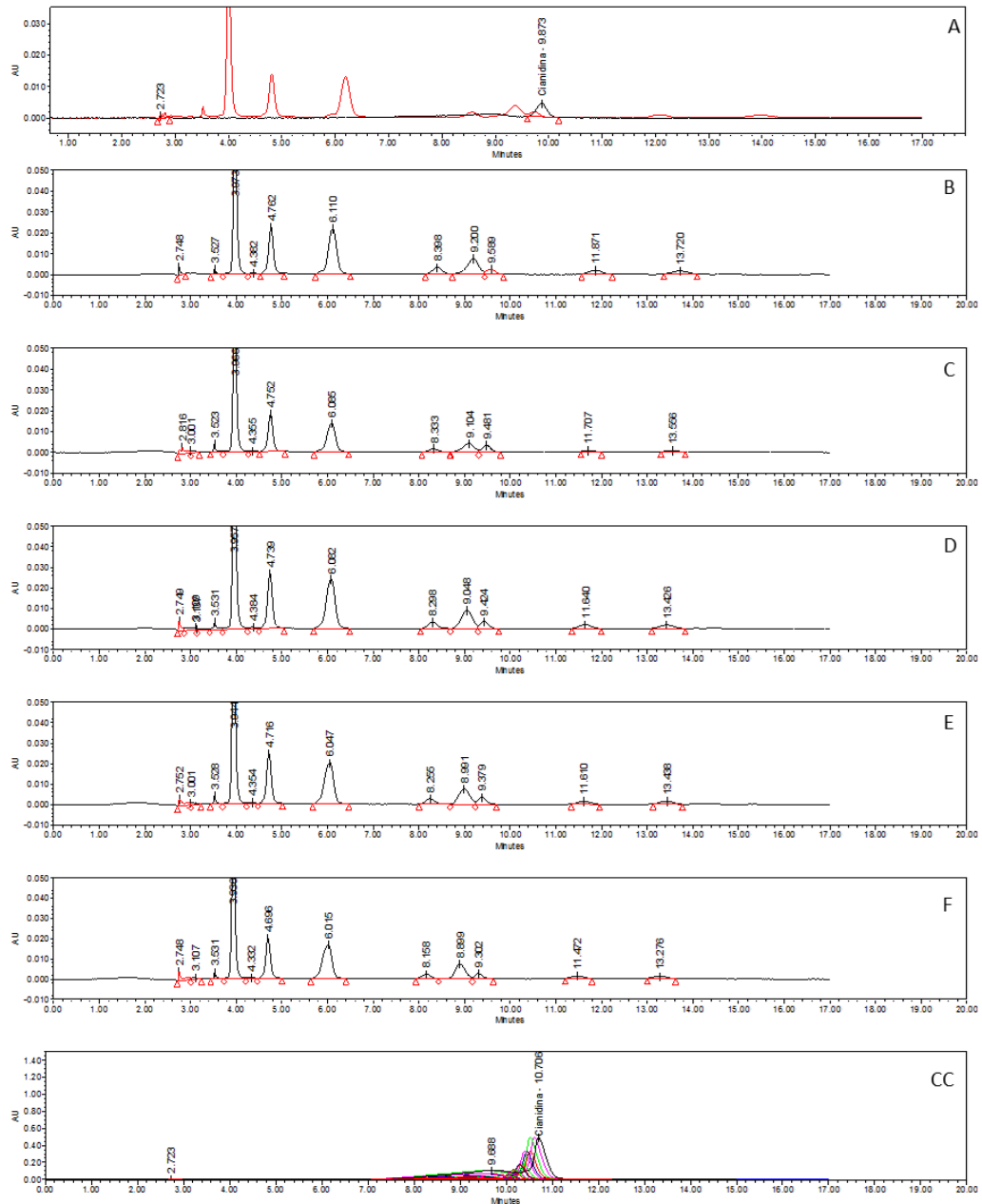


Figura VI.13. Cromatogramas obtenidos en el análisis en plantas inoculadas A y B: Vector Mg-Quelata (pEuMVYP:ΔAV1:chlI), C: Vector virus silvestre (pEuMVYP), D: Vector vacío (EuMV-YP:ΔAV1), E: Vector VIG'S f3'h (EuMV-YP:ΔAV1:f3'h), F: Planta silvestre y cromatograma de la curva de calibración del estándar Cloruro de Cianidina (CC).

De acuerdo a las gráficas de medias de LSD obtenidas en el análisis estadístico de ANOVA se puede observar que no existe una diferencias estadísticamente significativa con un 95% de confianza (p -valor <0.05) en la concentración de cianidina durante la etapa AC en plantas inoculadas con los diferentes construcciones, confirmando que no hay efectos de las construcciones (Fig. V.14 y Fig. V. 15).

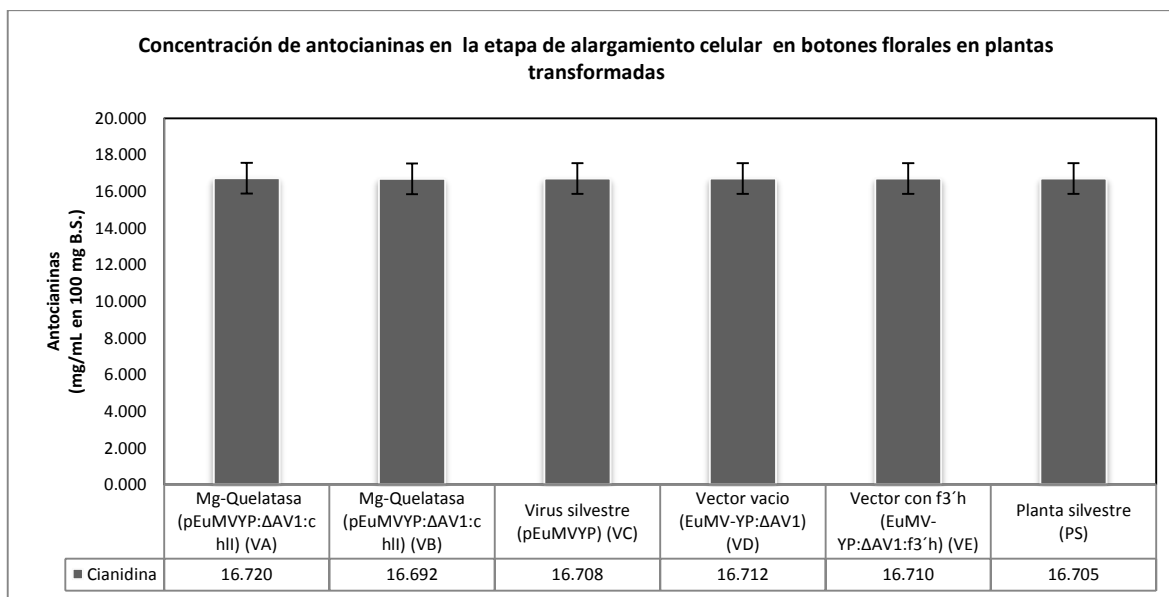


Figura VI.14. Concentración de Cianidina, obtenida mediante HPLC, en la etapa Alargamiento celular (A.C.) de botones florales de crisantemo var. Micromargara inoculadas. En el eje de la Y indica la concentración de cianidina y el eje de la X se muestra las construcciones utilizadas para la inoculación mediante bombardeo.

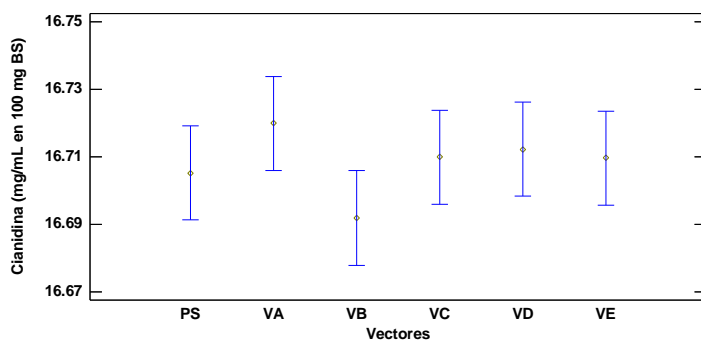


Figura VI.15. Gráfica de medias de la concentración de Cianidina obtenidas a partir de botones florales durante la etapa AC de plantas inoculadas. En el eje de las X plantas inoculadas con los diferentes vectores.

VI.6 Conclusión

- En las plantas de crisantemo var. Micromargara inoculadas mediante bombardeo con las construcciones: EuMV-YP silvestre (HA), vector vacío EuMV-YP:ΔAV1 y VIG'S (EuMV-YP:ΔAV1:*f3' h*) y el vector de Magnesio Quelatasa (EuMV-YP:ΔAV1:*ChI*) bajo las condiciones de cultivo a una temperatura 26 ± 2 °C. La infección no ocurrió, ya que fueron resultados negativos al diagnóstico mediante PCR punto final y PCR tiempo real.
- Se está evaluando la infección de los vectores construidos a partir de EuMV-YP en plantas de crisantemo para el silenciamiento de genes, sin embargo, es la primera prueba que se realiza en esta especie de planta.

Capítulo VII. Conclusión general

1. Se determinaron cinco etapas de desarrollo floral (EDF): Identidad celular (I.C), Duplicación celular (D.C), Alargamiento celular (A.C), Maduración (MA) y Senescencia (SE) en flores de crisantemo para la expresión del gen *f3'h* y la cuantificación de antocianinas.
2. Se cuantifico la expresión del gen *f3'h* en cinco etapas de desarrollo floral mediante PCR tiempo real, obteniendo la expresión más alta con 318.25 RQ en la etapa de alargamiento celular "AC".
3. Se presentó una correlación positiva entre la expresión del gen *f3'h* y la concentración de Cianidina en cinco etapas de desarrollo floral en plantas de crisantemo.
4. El dendrograma construido a partir de la secuencia del gen *f3'h* mostro un agrupamiento con especie de la familia Asteraceae en las que se encuentran crisantemo, teniendo un 98 % de similitud con secuencias reportadas del gen *f3'h* en crisantemo.
5. Se determinó que el mejor tratamiento para la extracción de antocianinas a utilizar fue el solvente Metanol-Agua-Acido fórmico (70:28:2 v/v/v), la desactivación de la enzima PPO a 100°C por 10 s y hidrólisis por una hora.
6. Se detectó y cuantificó la concentración de Cianidina en tres etapas de desarrollo floral, obteniendo la concentración más alta con 16.79 mg/mL en 100 mg en base seca en la etapa de alargamiento celular.
7. No se detectó la infección de los diferentes vectores construidos a partir del virus EuMV-YP en plantas de crisantemo mediante PCR y PCR tiempo real.

Capítulo VIII. Perspectivas

1. Se sugiere detectar y cuantificar la expresión de los genes que se codifican en la Biosíntesis de antocianina como f3h, DFR, ANS en las diferentes etapas del desarrollo floral mediante PCR y PCR-tiempo real.
2. Se sugiere realizar la detección de compuestos polifenólicos u otros compuestos mediante la HPLC acoplado a masas para la detección más específicas de antocianinas en botones florales de crisantemo var. Micromarga.
3. Se sugiere realizar un acondicionamiento del cultivo de las plantas de crisantemo posterior a la inoculación del vector EuMV-YP: Δ AV1:f3 h , que implique controlar la temperatura y luz, ya que algunos autores mencionan el efecto de estos factores para el silenciamiento de genes inducida por virus.

Capítulo IX. Bibliografía

- Aida R, Kishimoto S, Tanaka Y, Shibata M (2000) Modification of flower color in torenia (*Torenia fournieri* Lind.) by genetic transformation. *Plant Sci* 153: 33–42
- An CH, Lee KW, Lee SH, Jeong YJ, Woo SG, Chun H, Park Y Il, Kwak SS, Kim CY (2015) Heterologous expression of IbMYB1a by different promoters exhibits different patterns of anthocyanin accumulation in tobacco. *Plant Physiol Biochem* 89: 1–10
- Ananga A, Georgiev V, Ochieng J, Phills B, Tsoleva V (2013) Production of Anthocyanins in Grape Cell Cultures: A Potential Source of Raw Material for Pharmaceutical, Food, and Cosmetic Industries. *Mediterr Genet Code - Grapevine Olive* 247–287
- Anderson N, Ascher P (2003) *Chrysanthemum* variety 95-105-6.
- Anderson NO (2007) Flower Breeding and Genetics. Chapter 14 *Chrysanthemum Dendranthema x grandiflora* Tzvelv. In Springer, ed, 2007, U.S.A, pp 389–437
- Bahadur B, Venkat M, Leela R, Ii V, Genomics P (2015) *Plant Biology and Biotechnology*. doi: 10.1007/978-81-322-2286-6
- Biassoni R, Raso A (2014) Quantitative Real-Time PCR. *Methods and Protocols, Humana Pre*. doi: 10.1007/978-1-4939-0733-5
- Boase MR, Lewis DH, Davies KM, Marshall GB, Patel D, Schwinn KE, Derolles SC (2010) Isolation and antisense suppression of flavonoid 3', 5'-hydroxylase modifies flower pigments and colour in cyclamen. *BMC Plant Biol* 10: 107
- Brigneti G, Martín-Hernández AM, Jin H, Chen J, Baulcombe DC, Baker B, Jones JDG (2004) Virus-induced gene silencing in Solanum species. *Plant J* 39: 264–272
- Broderick SR, Jones ML (2014) An Optimized Protocol to Increase Virus-Induced Gene Silencing Efficiency and Minimize Viral Symptoms in Petunia. *Plant Mol Biol Report* 32: 219–233
- Brugliera F, Tao GQ, Tems U, Kalc G, Mouradova E, Price K, Stevenson K, Nakamura N, Stacey I, Katsumoto Y, et al (2013) Violet/Blue chrysanthemums-metabolic engineering of the anthocyanin biosynthetic pathway results in novel petal colors. *Plant Cell Physiol* 54: 1696–1710
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, et al (2009) The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem* 55 : 611–622

- Cao J, Li X, Liu Y, Leng F, Li X, Sun C, Chen K (2015) Bioassay-Based Isolation and Identification of Phenolics from Sweet Cherry That Promote Active Glucose Consumption by HepG2 Cells. *J Food Sci* 80: C234–C240
- Casanova E, Trillas MI, Moysset L, Vainstein A (2005) Influence of rol genes in floriculture. *Biotechnol Adv* 23: 3–39
- Chandler S (2013) Genetically Engineered Ornamental Plants: Regulatory Hurdles to Commercialization. 12–14
- Chandler SF, Sanchez C (2012) Genetic modification; the development of transgenic ornamental plant varieties. *Plant Biotechnol J* 10: 891–903
- Chaves-Bedoya G, Ortiz-Rojas L (2011) Ingeniería genética vegetal para resistencia viral y vectores virales en genética reversa Plant genetic engineering for viral resistance and viral vectors in reverse genetics. *Orinoquia* 15: 148–159
- Chen S, Xiang Y, Deng J, Liu Y, Li S (2013) Simultaneous Analysis of Anthocyanin and Non-Anthocyanin Flavonoid in Various Tissues of Different Lotus (*Nelumbo*) Cultivars by HPLC-DAD-ESI-MSn. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0062291
- Chen W-H, Hsu C-Y, Cheng H-Y, Chang H, Chen H-H, Ger M-J (2011) Downregulation of putative UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase gene alters flower coloring in *Phalaenopsis*. *Plant Cell Rep* 30: 1007–1017
- D'haene B, Vandesompele J, Hellemans J (2010) Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR. *Methods* 50: 262–270
- Derveaux S, Vandesompele J, Hellemans J (2010) How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods* 50: 227–30
- Emerson R (2015) Causation and Pearson's Correlation Coefficient. *J Vis Impair Blind* 36: 242–244
- Faivre-rampant O, Gilroy EM, Hrubikova K, Hein I, Millam S, Loake GJ, Birch P, Taylor M, Lacomme C, G PCCEM, et al (2004) Potato Virus X-Induced Gene Silencing in Leaves and Tubers of Potato 1. *134*: 1308–1316
- Falcone Ferreyra ML, Rius SP, Casati P (2012) Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Front Plant Sci* 3: 1–15
- Gantait SS, Pal P (2010) Anthocyanin content of spray Chrysanthemum cultivars under polyhouse and open field conditions. *Indian J Nat Prod Resour* 1: 236–242

- Gregorio-Jorge J, Bernal-Alcocer A, Bañuelos-Hernández B, Alpuche-Solís AG, Hernández-Zepeda C, Moreno-Valenzuela O, Frías-Treviño G, Argüello-Astorga GR (2010) Analysis of a new strain of Euphorbia mosaic virus with distinct replication specificity unveils a lineage of begomoviruses with short Rep sequences in the DNA-B intergenic region. *Virology* 7: 275
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis 41:95-98., program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*
- Hase Y, Okamura M, Takeshita D, Narumi I, Tanaka A (2010) Efficient induction of flower-color mutants by ion beam irradiation in petunia seedlings treated with high sucrose concentration. *Plant Biotechnol* 27: 99–103
- He H, Ke H, Keting H, Qiaoyan X, Silan D (2013) Flower colour modification of chrysanthemum by suppression of F3'H and overexpression of the exogenous *Senecio cruentus* F3'5'H gene. *PLoS One* 8: e74395
- Hernández-Zepeda C, Idris a. M, Carnevali G, Brown JK, Moreno-Valenzuela O a. (2007) Molecular characterization and experimental host range of Euphorbia mosaic virus-Yucatan Peninsula, a begomovirus species in the Squash leaf curl virus clade. *Plant Pathol* 56: 763–770
- Ho PC (2005) Quantitation of amino acids and amines by chromatography - methods and protocols. *J Chromatogr Libr.* doi: 10.1016/S0301-4770(05)80019-3
- Hong Y, Tang X, Huang H, Zhang Y, Dai S (2015) Transcriptomic analyses reveal species-specific light-induced anthocyanin biosynthesis in chrysanthemum. *BMC Genomics* 16: 1–18
- Hsieh MH, Lu HC, Pan ZJ, Yeh HH, Wang SS, Chen WH, Chen HH (2013) Optimizing virus-induced gene silencing efficiency with Cymbidium mosaic virus in Phalaenopsis flower. *Plant Sci* 201-202: 25–41
- Hughes NM, Carpenter KL, Cannon JG (2013) Estimating contribution of anthocyanin pigments to osmotic adjustment during winter leaf reddening. *J Plant Physiol* 170: 230–233
- J. Dole and Wilkins H (2004) *Floriculture: Principles and species*. 2nd Ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey., Second Edi. New Jersey
- Jaiswal V, DerMarderosian A, Porter JR (2010) Anthocyanins and polyphenol oxidase from dried arils of pomegranate (*Punica granatum* L.). *Food Chem* 118: 11–16

- Jovel J, Ramirez P (2002) Silenciamiento de genes virales : el contraataque de las plantas frente a infecciones de virus fitopatógenos. *Manejo Integr Plagas (Costa Rica)* 2 66: 49–61
- Katsumoto Y, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y, Brugliera F, Holton T a., Karan M, Nakamura N, Yonekura-Sakakibara K, Togami J, Pigeaire A, et al (2007) Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin. *Plant Cell Physiol* 48: 1589–1600
- Kirigia D, Runo S, Alakonya A (2014) A virus-induced gene silencing (VIGS) system for functional genomics in the parasitic plant *Striga hermonthica*. *Plant Methods* 10: 16
- Kjemtrup S, Sampson KS, Peele C, Nguyen L, Conkling M, Thompson W, Roberson D (1998) Gene silencing from DNA carried by a geminivirus. *Plant J* 14: 91–100
- Kotakis C, Vrettos N, Kotsis D, Tsagris M, Kotzabasis K, Kalantidis K (2010) Light intensity affects RNA silencing of a transgene in *Nicotiana benthamiana* plants. *BMC Plant Biol* 10: 220
- Kumar B, Kumar S, Thakur M (2012) In Vitro Mutation Induction and Selection of *Chrysanthemum (Dendranthema Grandiflora Tzelev)* Lines with Improved Resistance to *Septoria Obesa Syd*. *Int J Plant Res* 2: 103–107
- Lee JH, Kim YC, Choi D, Park JM (2013) Identification of novel pepper genes involved in Bax-or INF1-mediated cell death responses by high-throughput virus-induced gene silencing. *Int J Mol Sci* 14: 22782–22795
- Lema-rumi J, Zalewska M (2005) Changes in flower colour among Lady Group of *Chrysanthemum × grandiflorum* / Ramat . / Kitam . as a result of mutation breeding. *Folia Horti* 61–72
- Li Q, Wang J, Sun H-Y, Shang X (2014) Flower color patterning in pansy (*Viola × wittrockiana* Gams.) is caused by the differential expression of three genes from the anthocyanin pathway in acyanic and cyanic flower areas. *Plant Physiol Biochem* 84: 134–141
- Lindbo J, Silva-Rosales L, Proebsting W, Dougherty W (1993) Induction of a Highly Specific Antiviral State in Transgenic Plants: Implications for Regulation of Gene Expression and Virus Resistance. *Plant Cell* 5: 1749–1759
- Liou MR, Huang YW, Hu CC, Lin NS, Hsu YH (2014) A dual gene-silencing vector system for monocot and dicot plants. *Plant Biotechnol J* 12: 330–343

- MacFarlane S a., Popovich AH (2000) Efficient Expression of Foreign Proteins in Roots from Tobravirus Vectors. *Virology* 267: 29–35
- Maleka M, Albertyn J, Spies J (2013) The floriculture industry and flower pigmentation—a review. *Philos Trans Genet* 110: 55–110
- Manmathan H, Shaner D, Snelling J, Tisserat N, Lapitan N (2013) Virus-induced gene silencing of *Arabidopsis thaliana* gene homologues in wheat identifies genes conferring improved drought tolerance. *J Exp Bot* 64: 1381–1392
- McPherson M, Geir MS (2009) PCR. Group: Taylor & Francis.
- Montaigu A De, Giakountis A, Rubin M, Tóth R, Cremer F, Sokolova V (2014) Natural diversity in daily rhythms of gene expression contributes to phenotypic variation. 1–6
- Moura FB, Vieira MRDS, Evangelista WS, Silva LF, Oliveira RH, Rocha a. T, Costa FB (2014) Cultivars, conduction, photoperiodic and quality chrysanthemum in Brazil. *J Horticult For* 6: 53–57
- Nakamura N, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y, Ishiguro K, Suzuki K, Suzuki H, Okazaki K, Shibata D, Tanaka Y (2010) Generation of pink flower varieties from blue *Torenia hybrida* by redirecting the flavonoid biosynthetic pathway from delphinidin to pelargonidin. *Plant Biotechnol* 27: 375–383
- Nakatsuka T, Mishiba KI, Kubota A, Abe Y, Yamamura S, Nakamura N, Tanaka Y, Nishihara M (2010) Genetic engineering of novel flower colour by suppression of anthocyanin modification genes in gentian. *J Plant Physiol* 167: 231–237
- Nakatsuka T, Nishihara M, Mishiba K, Yamamura S (2005) Temporal expression of flavonoid biosynthesis-related genes regulates flower pigmentation in gentian plants. *Plant Sci* 168: 1309–1318
- NCS (2015) National Chrysanthemum Society, Inc., USA. All Rights Reserved. 2000-2014. <http://www.mums.org/>
- Newman SE (2011) Floriculture. *In* JOBT-E of EH Nriagu, ed, Elsevier, Burlington, pp 756–768
- Nishihara M, Shimoda T, Nakatsuka T, Arimura G-I (2013) Frontiers of torenia research: innovative ornamental traits and study of ecological interaction networks through genetic engineering. *Plant Methods* 9: 23

- Noda N, Aida R, Kishimoto S, Ishiguro K, Fukuchi-Mizutani M, Tanaka Y, Ohmiya A (2013) Genetic engineering of novel bluer-colored chrysanthemums produced by accumulation of delphinidin-based anthocyanins. *Plant Cell Physiol* 54: 1684–1695
- Noor SH, Ushijima K, Murata A, Yoshida K, Tanabe M, Tanigawa T, Kubo Y, Nakano R (2014) Double flower formation induced by silencing of C-class MADS-box genes and its variation among petunia Cultivars. *Sci Hortic (Amsterdam)* 178: 1–7
- Pang J, Zhu Y, Li Q, Liu J, Tian Y, Liu Y, Wu J (2013) Development of Agrobacterium-mediated virus-induced gene silencing and performance evaluation of four marker genes in *Gossypium barbadense*. *PLoS One* 8: e73211
- Park C, Chae S, Park S-Y, Kim J, Kim Y, Chung S, Arasu M, Al-Dhabi N, Park S (2015a) Anthocyanin and Carotenoid Contents in Different Cultivars of Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Ramat.) Flower. *Molecules* 20: 11090–11102
- Park CH, Chae SC, Park S-YSU, Kim JK, Kim YJ, Chung SO, Arasu MV, Al-Dhabi NA, Park S-YSU (2015b) Anthocyanin and Carotenoid Contents in Different Cultivars of Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Ramat.) Flower. *Molecules* 20: 11090–1102
- Peele C, Jordan C V., Muangsan N, Turnage M, Egelkrout E, Eagle P, Hanley-Bowdoin L, Robertson D (2001) Silencing of a meristematic gene using geminivirus-derived vectors. *Plant J* 27: 357–366
- Pflieger S, Blanchet S, Meziadi C, Richard M, Thareau V, Mary F, Mazoyer C, Geffroy V (2014) The “one-step” Bean pod mottle virus (BPMV)-derived vector is a functional genomics tool for efficient overexpression of heterologous protein, virus-induced gene silencing and genetic mapping of BPMV R-gene in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Plant Biol* 14: 232
- Ramegowda V, Senthil-kumar M, Udayakumar M, Mysore KS (2013) A high-throughput virus-induced gene silencing protocol identifies genes involved in multi-stress tolerance. *BMC Plant Biol* 13: 193
- Robertson D (2004) VIGS vectors for gene silencing: many targets, many tools. *Annu Rev Plant Biol* 55: 495–519
- Roepke J, Jean T, Perkel KJ, Blom T, Bozzo GG (2013) Daminozide Alters Anthocyanin Metabolism in Ray Florets of Bronze Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.). *J Plant Growth Regul* 32: 453–460

- Schmitzer V, Veberic R, Osterc, Gregor and Stampar F (2009) Changes in the phenolic concentration during flower development of rose “KORcrisett.” J Am Soc Hortic Sci 134: 491–496
- Seitz C, Ameres S, Schlangen K, Forkmann G, Halbwirth H (2015) Multiple evolution of flavonoid 3',5'-hydroxylase. *Planta*. doi: 10.1007/s00425-015-2293-5
- Seo J, Kim SW, Kim J, Cha HW, Liu JR (2007) Co-expression of flavonoid 3' 5'-hydroxylase and flavonoid 3'-hydroxylase Accelerates Decolorization in Transgenic Chrysanthemum Petals. *J Plant Biol* 50: 626–631
- Shchennikova A V, Shulga O a, Immink R, Skryabin KG, Angenent GC (2004) Identification and characterization of four chrysanthemum MADS-box genes, belonging to the APETALA1/FRUITFULL and SEPALLATA3 subfamilies. *Plant Physiol* 134: 1632–1641
- Shi Y, Wang R, Luo Z, Jin L, Liu P, Chen Q, Li Z, Li F, Wei C, Wu M, et al (2014) Molecular Cloning and Functional Characterization of the Lycopene ϵ -Cyclase Gene via Virus-Induced Gene Silencing and Its Expression Pattern in *Nicotiana tabacum*. *Int J Mol Sci* 15: 14766–14785
- SIAP-SAGARPA (2014) Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera-Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2013, <http://www.siap.gob.mx>
- Solleiro JL, Briseño A (2003) Propiedad intelectual ii: el caso de la biotecnología en México. *Interciencia* 28: 90–94
- Song JY, Sivanesan I, Jeong BR (2012) Use of petal explants for successful transformation of *Dendranthema × grandiflorum* Kitamura 'Orlando' mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. 11: 9141–9148
- Sung SY, Kim SH, Velusamy V, Lee YM, Ha BK, Kim JB, Kang SY, Kim HG, Kim DS (2013) Comparative gene expression analysis in a highly anthocyanin pigmented mutant of colorless chrysanthemum. *Mol Biol Rep* 40: 5177–5189
- Sung Y-C, Lin C-P, Chen J-C (2014) Optimization of virus-induced gene silencing in *Catharanthus roseus*. *Plant Pathol* 63: 1159–1167
- Suzuki KI, Xue HM, Tanaka Y, Fukui Y, Fukuchi-Mizutani M, Murakami Y, Katsumoto Y, Tsuda S, Kusumi T (2000) Flower color modifications of *Torenia hybrida* by cosuppression of anthocyanin biosynthesis genes. *Mol Breed* 6: 239–246

- Suzuki S, Nishihara M, Nakatsuka T, Misawa N, Ogiwara I, Yamamura S (2007) Flower color alteration in *Lotus japonicus* by modification of the carotenoid biosynthetic pathway. *Plant Cell Rep* 26: 951–959
- Svec D, Tichopad A, Novosadova V, Pfaffl MW, Kubista M (2015) How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomol Detect Quantif* 3: 9–16
- Tan J, Wang M, Tu L, Nie Y, Lin Y, Zhang X (2013) The Flavonoid Pathway Regulates the Petal Colors of Cotton Flower. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0072364
- Tanaka Y, Brugliera F, B PTRS (2013) Flower colour and cytochromes P450 Flower colour and cytochromes P450 †. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*
- Tanaka Y, Brugliera F, Chandler S (2009) Recent progress of flower colour modification by biotechnology. *Int J Mol Sci* 10: 5350–5369
- Tanaka Y, Tsuda S, Kusumi T (1998) Metabolic Engineering to Modify Flower Color. *Plant Cell Physiol* 39: 1119–1126
- Taylor S, Wakem M, Dijkman G, Alsarraj M, Nguyen M (2010) A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods* 50: S1–S5
- Teixeira da Silva J a., Kulus D (2014) Chrysanthemum biotechnology: discoveries from the recent literature. *Folia Horti* 26: 67–77
- Teixeira da Silva J a., Shinoyama H, Aida R, Matsushita Y, Raj SK, Chen F (2013) Chrysanthemum Biotechnology: Quo vadis ? *CRC Crit Rev Plant Sci* 32: 21–52
- Teixeira JA (2014) Organogenesis from chrysanthemum *Dendranthema x grandiflora* (Ramat .) Kitamura petals (disc and ray florets) induced by plant growth regulators.
- Thomas CL, Jones L, Baulcombe DC, Maule AJ (2001) Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for RNA-directed methylation in *Nicotiana benthamiana* using a potato virus X vector. *Plant J* 25: 417–425
- Tian J, Pei H, Zhang S, Chen J, Chen W, Yang R, Meng Y, You J, Gao J, Ma N (2014) TRV-GFP: A modified Tobacco rattle virus vector for efficient and visualizable analysis of gene function. *J Exp Bot* 65: 311–322
- Tuttle J, Haigler CH, Robertson D (2012) Method: low-cost delivery of the cotton leaf crumple virus-induced gene silencing system. *Plant Methods* 8: 27

- Tuttle JR, Haigler C, Walker JM, Robertson D (2015) Virus-Induced Gene Silencing of Fiber-Related Genes in Cotton. In Plant Gene Silencing Chapter 16. doi: 10.1007/978-1-4939-2453-0
- UN-COMTRADE (2015) United Nations Commodity Trade Statistics Database (UN-COMTRADE).
<http://comtrade.un.org/db/mapserver/mapIt.aspx?data=1&type=1&cc=060314&px=HS&y=2014,2013,2012,2011&rg=1>
- Valentine T, Valentine T, Shaw J, Shaw J, Blok VC, Blok VC, Phillips MS, Phillips MS, Oparka KJ, Oparka KJ, et al (2004) Efficient Virus-Induced Gene Silencing in Roots Using a Modified Tobacco Rattle Virus Vector. *Society* 136: 3999–4009
- Velásquez AC, Chakravarthy S, Martin GB (2009) Virus-induced gene silencing (VIGS) in *Nicotiana benthamiana* and tomato. *J Vis Exp* 20–23
- Villanueva-Alonzo HJ, Us-Camas RY, López-Ochoa L a., Robertson D, Guerra-Peraza O, Minero-García Y, Moreno-Valenzuela O a. (2013) A new virus-induced gene silencing vector based on Euphorbia mosaic virus-Yucatan peninsula for NPR1 silencing in *Nicotiana benthamiana* and *Capsicum annum* var. Anaheim. *Biotechnol Lett* 35: 811–823
- Wilson EO (2003) The encyclopedia of life. *Trends Ecol Evol* 18: 77–80
- Zambrano K, Fernández-Rodríguez T, Marys E (2012) Molecular characterization of a new begomovirus that infects *Euphorbia heterophylla* and *Solanum lycopersicum* in Venezuela. *Arch Virol* 157: 379–382
- Zhang C, Wang W, Wang Y, Gao S, Du D, Fu J, Dong L (2014a) Anthocyanin biosynthesis and accumulation in developing flowers of tree peony (*Paeonia suffruticosa*) “Luoyang Hong.” *Postharvest Biol Technol* 97: 11–22
- Zhang J, Han Z, Tian J, Zhang X, Song T, Yao Y (2015) The expression level of anthocyanidin synthase determines the anthocyanin content of crabapple (*Malus sp.*) petals. *Acta Physiol Plant* 37: 109
- Zhang J-S, Zhao J, Zhang S, He C (2014b) Efficient gene silencing mediated by tobacco rattle virus in an emerging model plant *Physalis*. *PLoS One* 9: e85534
- Zhang Y, Butelli E, Martin C (2014c) Engineering anthocyanin biosynthesis in plants. *Curr Opin Plant Biol* 19: 81–90

Zhao D, Tao J (2015) Recent advances on the development and regulation of flower color in ornamental plants. *Front Plant Sci* 6: 1–13

Zuker A, Tzfira T, Ben-Meir H, Ovadis M, Shklarman E, Itzhaki H, Forkmann G, Martens S, Neta-Sharir I, Weiss D, et al (2002) Modification of flower color and fragrance by antisense suppression of the flavanone 3-hydroxylase gene. *Mol Breed* 9: 33–41