



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Doctorado en Ingeniería de Biosistemas

Silenciamiento génico en el desarrollo de fruto por aplicación de RNA bicatenario
exógeno en plantas de tomate.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Doctorado en Ingeniería de Biosistemas

Presenta:

Christopher Alexis Cedillo Jiménez

Dirigido por:

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

Co-Director:

Dr. Andrés Cruz Hernández

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Octubre 2021



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Doctorado en Ingeniería de Biosistemas

Silenciamiento génico en el desarrollo de fruto por aplicación de RNA bicatenario
exógeno en plantas de tomate.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Doctorado en Ingeniería de Biosistemas

Presenta:

Christopher Alexis Cedillo Jiménez

Dirigido por:

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

Co-Director:

Dr. Andrés Cruz Hernández

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

Presidente

Firma

Dr. Andrés Cruz Hernández

Secretario

Firma

Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez

Vocal

Firma

Dra. Ma. Estela Vázquez Barrios

Suplente

Firma

Dr. Erik Gustavo Tovar Pérez

Suplente

Firma

Dr. Manuel Toledano Ayala
Director de la Facultad de Ingeniería

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Octubre 2021

RESUMEN

En años recientes, se han desarrollado diferentes estrategias basadas en RNAs con potencial interferente para el control de plagas y enfermedades en plantas. Estas moléculas de RNA resultan interferentes y específicos para algunos organismos que, al interactuar con las plantas tratadas, resultan intoxicados o reducen su capacidad de reproducirse. Sin embargo, poco se ha estudiado sobre el potencial para silenciar genes endógenos de la planta tratada. En este trabajo se utilizó el mecanismo de silenciamiento postranscripcional mediado por miRNAs para generar una base de datos de potenciales interacciones que confieren ventajas productivas en plantas de tomate. Utilizando esta información, se diseñó una estrategia de aplicación de RNAs pequeños, en un complejo bicatenario, para el silenciamiento de CTR4sv3, el cual es un gen endógeno de tomate que regula negativamente la síntesis de etileno. Mediante una aplicación inyectada en el fruto maduro verde, se logró el silenciamiento del gen objetivo en 72 h posterior al tratamiento en comparación con el control, lo cual provocó la reducción de 48% de la expresión de CTR4sv3 y se incrementó cuatro veces la sobreexpresión de ACO1, que es un gen importante en la síntesis de etileno en la etapa autocatalítica y que resulta de especial relevancia en frutos climatéricos. Estos resultados indican la posibilidad de usar fenómenos en la naturaleza para diseñar estrategias que agudicen interacciones moleculares específicas sobre circuitos preexistentes, sin necesidad de hacer uso de organismos genéticamente modificados.

Palabras clave: *Solanum*, siRNA, dsRNA, miR1917, etileno, SIGS

SUMMARY

In recent years, different strategies based on RNAs with interfering potential have been developed for the control of pests and diseases in plants. These RNA molecules are interfering and specific for some organisms that, when interacting with the treated plants, become intoxicated or reduce their ability to reproduce. However, little has been studied about the potential to silence endogenous genes of the treated plant. In this work, the post-transcriptional silencing mechanism mediated by miRNAs was used to generate a database of potential interactions that confer productive advantages in tomato plants. Using this information, a strategy was designed for the application of small RNAs, in a double-stranded complex, for the silencing of CTR4sv3, which is an endogenous tomato gene that negatively regulates ethylene synthesis. Through an application injected into the green mature fruit, the target gene was silenced in 72 h after the treatment compared to the control, which caused a 48% reduction in CTR4sv3 expression and a four-fold increase in overexpression of ACO1, which is an important gene in the synthesis of ethylene in the autocatalytic stage and which is of special relevance in climacteric fruits. These results indicate the possibility of using phenomena in nature to design strategies that sharpen specific molecular interactions on pre-existing circuits, without the need to make use of genetically modified organisms.

Key words: *Solanum*, siRNA, dsRNA, miR1917, ethylene, SIGS

Dirección General de Bibliotecas UAQ

*A mi familia y amistades,
quienes siempre han estado ahí,
apoyando.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de estudios de posgrado, sin la cual no habría logrado continuar mis estudios. También, reconozco con gratitud el soporte institucional por parte de los directivos en la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ), especialmente en la Dirección del Dr. Manuel Toledano Ayala, y en la División de Posgrado bajo la dirección del Dr. Juan Carlos Jauregui Correa.

Dentro del campus Amazcala de la UAQ, agradezco al Dr. Enrique Rico García por brindar las facilidades para instalar mi proyecto en un invernadero experimental, al Dr. Ramón Gerardo Guevara, por el apoyo administrativo como coordinador del programa de posgrado, así como por facilitar infraestructura e insumos, en su laboratorio. Al Dr. Juan Fernando García Trejo por facilitar el uso de instrumentos el Laboratorio de Bioingeniería, siempre bajo la amable atención de la M. en C. María Isabel Nieto Ramírez. También. A la Dra. Rosario Guzmán Cruz, quien facilitó la cámara de control ambiental para el desarrollo de experimento y al Dr. Genaro Martín Soto Zarazúa, quien me brindó un espacio digno para mi trabajo de oficina en el Laboratorio de Gestión Industrial.

A todo mi comité tutorial por la confianza que me brindaron al darme gran libertad en los planteamientos de mi proyecto, especialmente al Dr. Andrés Cruz Hernández, quién me ha asesorado desde la especialidad, maestría y ahora, en el doctorado: sus palabras y consejos me han brindado paz mental en momentos de angustia y frustración.

A Fernando Olvera Martínez por su apoyo en el laboratorio. A Guillermo Esqueda Silva, Abraham Gastelum Barrios y a Raúl Romero Galindo por su apoyo y asesoría en aspectos relacionados con programación y control. A Diana Saenz de la O por su apoyo total a mi proyecto, dentro y fuera del laboratorio. Finalmente, a Karla Jimena González Aguilar por apoyar con ilustraciones para la tesis y otros trabajos académicos, pero sobre todo por su apoyo emocional.

Muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDOS

1.	INTRODUCCIÓN.....	13
2.	ANTECEDENTES	15
2.1	DESARROLLO Y MADURACIÓN DE FRUTO DE TOMATE.....	15
2.2	SILENCIAMIENTO POR SRNAS	17
2.3	TECNOLOGÍA RNA PARA CONTROL DE ENFERMEDADES	20
3.	HIPÓTESIS.....	24
4.	OBJETIVOS.....	24
4.1	OBJETIVO GENERAL.....	24
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
5.1	CREACIÓN DE UNA BASE DE DATOS DE MI RNAS	25
5.1.1	<i>Análisis diacrónico del rol de miRNAs durante el desarrollo de fruto</i>	<i>25</i>
5.1.2	<i>Predicción computacional de blancos de miRNAs de tomate</i>	<i>25</i>
5.1.3	<i>Estructura de la base de datos</i>	<i>25</i>
5.2	MATERIAL VEGETAL	25
5.2.1	<i>Cultivo de tejidos</i>	<i>25</i>
5.2.2	<i>Producción en invernadero.....</i>	<i>26</i>
5.2.3	<i>Desarrollo de fruto.....</i>	<i>26</i>
5.2.4	<i>Control de condiciones ambientales durante experimentación</i>	<i>28</i>
5.2.5	<i>Variables biométricas analizadas.....</i>	<i>28</i>
5.3	ANÁLISIS MOLECULAR.....	28
5.3.1	<i>Extracción de RNA total.....</i>	<i>28</i>
5.3.2	<i>Análisis de expresión y cuantificación de moléculas de sRNAs</i>	<i>29</i>
5.3.3	<i>Análisis de expresión de transcritos</i>	<i>30</i>
5.4	DISEÑO Y SÍNTESIS DE RNA DOBLE CADENA.....	31
5.5	APLICACIÓN DE RNA EXÓGENO	32
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32

6.1	INTEGRACIÓN DE BASE DE DATOS INTERNA DE RELACIONES MIRNAS-MRNA BLANCO	32
6.2	CARACTERIZACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE MIRNA MADURAS.....	33
6.2.1	<i>Evidencia experimental en reportes de miRNAs en tomate</i>	<i>33</i>
6.2.2	<i>Tamaño de miRNAs maduros en tomate.....</i>	<i>34</i>
6.2.3	<i>Análisis de la función biológica de los miRNAs en tomate</i>	<i>35</i>
6.2.4	<i>miR1917 con rol destacable en el desarrollo de fruto en tomate</i>	<i>43</i>
6.2.5	<i>Análisis de interacción entre miR1917 y transcritos blancos</i>	<i>44</i>
6.3	ESTRATEGIA PARA EL ANÁLISIS DE MIR1917-CTR4sv3.....	47
6.3.1	<i>Diseño de oligonucleótidos para análisis de miR1917.....</i>	<i>47</i>
6.3.2	<i>Diseño de oligonucleótidos para análisis de CTR4sv3</i>	<i>51</i>
6.4	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MIR1917 DURANTE EL DESARROLLO DE FRUTO DE TOMATE.....	52
6.4.1	<i>Procesamiento y extracción de RNA.....</i>	<i>52</i>
6.4.2	<i>Evaluación de las condiciones para el análisis de expresión miR1917-CTR4sv3</i>	<i>53</i>
6.4.3	<i>Análisis de expresión miR1917-CTR4sv3 durante la maduración de fruto de MT.....</i>	<i>56</i>
6.5	DISEÑO DE RNA BICATENARIO CON POTENCIAL INTERFERENTE.....	58
6.5.1	<i>Criterios de diseño para las propuestas de RNA con potencial interferente: cantidad de nucleótidos (técnico).....</i>	<i>58</i>
6.5.2	<i>Criterios de diseño para las propuestas de RNA con potencial interferente: cantidad de nucleótidos (económico).....</i>	<i>59</i>
6.5.3	<i>Criterios de diseño para las propuestas de RNA con potencial interferente: modificaciones químicas.....</i>	<i>59</i>
6.5.4	<i>Criterios de diseño para las propuestas de RNA con potencial interferente: empalme en moléculas bicatenarias.....</i>	<i>59</i>
6.5.5	<i>Propuestas de diseño de RNA bicatenario con potencial interferente</i>	<i>59</i>
6.5.6	<i>Análisis de dimerización de sRNA.....</i>	<i>60</i>
6.5.7	<i>Predicción de blancos y transcritos off-target por aplicación de sRNAs.....</i>	<i>62</i>
6.6	SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE R1, R1* Y R1-R1*	65
6.6.1	<i>Síntesis in vitro y características de R1 y R1*</i>	<i>65</i>
6.6.2	<i>Preparación de soluciones de R1 y R1* con potencial interferente.....</i>	<i>67</i>
6.6.3	<i>Evaluación de formación de sRNA bicatenario.....</i>	<i>68</i>

6.7	APLICACIÓN DE SRNA BICATENARIO Y POTENCIAL ACCIÓN INTERFERENTE EN FRUTO	69
6.7.1	<i>Evaluación del silenciamiento de CTR4sv3 24 horas postratamiento</i>	<i>69</i>
6.7.2	<i>Evaluación del silenciamiento de CTR4sv3 en GM, 72 horas postratamiento.....</i>	<i>72</i>
7.	CONCLUSIONES.....	78
8.	REFERENCIAS.....	78
9.	APÉNDICES	85
9.1	APÉNDICE A: RESUMEN DE OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS.....	85
9.2	APÉNDICE B: ABSORBANCIAS Y CONCENTRACIÓN DE TODOS DE TODOS LOS EXPERIMENTOS.....	86
9.3	APÉNDICE C: CERTIFICADO DE ANÁLISIS POR PROVEEDORE PARA RNA SINTÉTICO	88
9.4	APÉNDICE C: PRUEBAS DE RETENCIÓN DE SOLUCIÓN EN FRUTO	90

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración de fertilizantes para sistema hidropónico	26
Tabla 2. Reactivos para retrotranscripción de RNAs pequeños	29
Tabla 3. Reactivos para qPCR de RNAs pequeños	29
Tabla 4. Reactivos para síntesis de cDNA usando oligodT	30
Tabla 5. Reactivos para qPCR de mRNA	31
Tabla 6. Estructura de la base de datos generada para el rol de miRNA en tomate	33
Tabla 7. Gene Ontolgy para los blancos de miRNA de tomate.....	36
Tabla 8. Papel de miRNAs en la regulación del desarrollo de fruto de tomate.....	38
Tabla 9. Descripción de CTR4 y las alternativas de corte y empalme de mRNA.....	45
Tabla 10. Secuencia de miR1917 y oligonucleótidos para analizar su expresión.....	47
Tabla 11. Energía libre para la dimerización de oligonucleótidos para retrotranscripción de miR1917	48
Tabla 12. Rango de las relaciones de absorbancia para la extracción de RNA para análisis de miR1917-CTR4sv3	53
Tabla 13. Secuencias y energía libre de Gibbs para homo y heterodimerización de RNA..	61
Tabla 14. Predicción de blancos para las secuencias para sRNAs	63
Tabla 15. Resumen de las características principales del RNA sintetizado <i>in vitro</i> . ¹	66
Tabla 16. Evaluación de la concentración de las soluciones de R1 y R1*	67
Tabla 17. Comparación del rango de la masa de RNA aplicada	68

Tabla 18. Extracción de RNA, 24 h postratamiento: rango del diámetro y relaciones de absorbancia.....	70
Tabla 19. Extracción de RNA, 72 h postratamiento: rango del diámetro y relaciones de absorbancia.....	73
Tabla 20. Resultados de absorbancia a 230, 260 y 280 nm para análisis de expresión de miR1917-CTR4sv3	86
Tabla 21. Diámetro y resultados de absorbancia de la extracción de RNA en el tratamiento de 24 h	86
Tabla 22. Diámetro y resultados de absorbancia de la extracción de RNA en el tratamiento de 72 h	87
Tabla 23. Prueba de retención de solución en fruto	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de Yang y biosíntesis de etileno. Imagen tomada de Taiz y Zeiger (2002).	16
Figura 2. Biogénesis canónica y no canónica de miRNAs en plantas. Imagen modificada de Budak y Akpinar (2015).....	20
Figura 3. Características del fruto de tomate en maduración de MG a BR.....	27
Figura 4. Características del fruto de tomate en maduración de MG a RR.....	27
Figura 5. Evidencia de la secuencia de miRNA reportada.....	34
Figura 6. Diversidad de secuencias maduras de miRNAs.....	35
Figura 7. Red de regulación debida a miRNAs durante el desarrollo de tomate	41
Figura 8. Fenotipo resultante por la atenuación de miR396 y sobreexpresión de miR1917.	42
Figura 9. Localización de miR1917 dentro del genoma de tomate (SL3.0).....	44
Figura 10. Sitio de interacción miR1917 y SICTR4sv3	47
Figura 11. Estimación computacional de las potenciales dimerizaciones para la retrotranscripción de miR1917 basado en Wang et al. (2018)	49
Figura 12. Estimación computacional de las potenciales dimerizaciones para la retrotranscripción de miR1917, diseño nuevo.....	50
Figura 13. Estimación del tamaño de producto por PCR para miR1917	51
Figura 14. Resultados Primer-BLAST para oligonucleótidos para CTR4sv1, sv2 y sv2 por qPCR	52
Figura 15. Extracción de RNA para análisis miRNA-mRNA.....	53
Figura 16. Amplificación no exitosa de miR1917 por qPCR.....	54
Figura 17. Amplificación exitosa de miR1917 por qPCR.....	55

Figura 18. Amplificación exitosa de CTR4sv3 por qPCR	56
Figura 19. Análisis de expresión de miR1917 en tomate ($p < 0.001$)	57
Figura 20. Análisis de expresión de CTR4sv3 en tomate ($p < 0.05$).....	58
Figura 21. Predicción de la interacción de nucleótidos de acuerdo con la dimerización más estable estimada por <i>RNAfold</i>	62
Figura 22. Cromatograma y espectro de masas de las secuencias de RNA sintético.....	66
Figura 23. Dimerización de complejo bicatenario R1-R1*.....	69
Figura 24. Expresión de CTR4sv3 por la inyección de sRNA o H ₂ O, en fruto GM, BR y RR.	71
Figura 25. Pérdida de peso en tratamiento por 72 h.....	72
Figura 26. Expresión de CTR4sv3 debido a la aplicación de sRNA bicatenario, en GM 72 h	74
Figura 27. Modelo de señalización por etileno	75
Figura 28. Regulación de la maduración de fruto de tomate.....	76
Figura 29. Expresión de EIN2 por la aplicación de sRNA bicatenario, en GM 72 h.....	77
Figura 30. Expresión de ACO1 por la aplicación de sRNA bicatenario, en GM 72 h.....	77
Figura 31. Prueba de retención en fruto por inyección de solución acuosa	90

1. INTRODUCCIÓN

Solanum lycopersicum es el nombre científico del tomate, que es una planta originaria de Perú, Ecuador y Chile, pero cuyo centro de diversidad se desarrolló en México. Actualmente, es uno de los cultivos con mayor relevancia económica, lo cual probablemente se debe al éxito que han tenido los programas de fitomejoramiento que han logrado incrementar el rendimiento y mejorar algunas características de sus frutos. La importancia del tomate no solo es económica, pues también es una planta modelo para el estudio del desarrollo de frutos carnosos y climatéricos (Kimura y Sinha, 2008).

El fruto es el órgano con interés comercial y para producirlo es necesario conocer su biología desde la germinación hasta la etapa reproductiva (Bäurle y Dean, 2006), lo que representa una compleja regulación que permite el desarrollo vegetal durante todo el ciclo de vida.

Así, Moxon et al. (2008) reportan que dentro de las moléculas responsables de la regulación del desarrollo de tomate, se encuentran diferentes clases de RNAs pequeños, identificados aquí como sRNA, que tienen entre 21 y 24 nucleótidos (nt) y que provocan silenciamiento génico a nivel postranscripcional.

Existen diferentes vías de generación de sRNAs, lo que resulta en diversidad de este tipo de moléculas y el grupo más estudiado corresponde los microRNAs (miRNA). Su biogénesis resulta en una secuencia madura de sRNA que funge como guía de un complejo de silenciamiento génico inducido por RNA. Dicho complejo se enlaza por complementariedad de nucleótidos con su blanco RNA mensajero (mRNA), provocando el corte del transcrito o bien, retrasa o dificulta la producción de la proteína correspondiente (Ha y Kim, 2014).

Además de ser una pieza indispensable en los programas de desarrollo, los sRNAs también son moléculas que participan en la interacción entre organismos, incluso de diferentes reinos, funcionando como una vía de comunicación necesaria en procesos de inmunidad y virulencia entre hospedero y patógeno (Weiberg et al., 2015).

Wang et al. (2016) han producido plantas transgénicas de *Arabidopsis* y tomate que producen moléculas de sRNAs diseñadas para prevenir la infección contra Botritis, pero también han desarrollado una estrategia de aspersión de sRNAs con el mismo efecto sin usar plantas genéticamente modificadas. En ambos casos, el grupo de investigación ha obtenido resultados favorables, por lo que proponen el desarrollo de una nueva línea de biopesticidas, como estrategia efectiva en el control de plagas y enfermedades de plantas, con menor impacto ambiental, sin la controversia asociada a plantas genéticamente modificadas.

La tecnología con base en sRNAs se ha enfocado principalmente en el diseño de oligonucleótidos para la defensa de la planta frente a patógenos, mientras que existen pocos trabajos sobre el efecto de la aplicación de sRNA sobre la planta y el potencial de silenciamiento de transcritos endógenos. Uno de los trabajos que sí lo abordan corresponde a Dubrovina et al. (2020), quienes detectaron silenciamiento génico por la aplicación de sRNA bicatenario y sintético, con secuencia complementaria al neomicina fosfotransferasa II en hojas de plantas transgénicas de *Arabidopsis*.

Desde nuestro conocimiento no existen trabajos de aplicación exógena de sRNAs para producir silenciamiento de genes endógenos en frutos. De tal manera que el objetivo de este trabajo fue diseñar y aplicar sRNA bicatenario para provocar silenciamiento génico en frutos de tomate. Para ello, se realizamos una búsqueda sistemática del rol que tienen los miRNAs durante el desarrollo y maduración de fruto. Luego, seleccionamos y caracterizamos la expresión de miR1917 y su blanco que es la variante de corte-empalme 3 del transcrito *Constitutive triple response 4* (CTR4sv3), debido a que su expresión está validada en laboratorio de manera experimental, se tienen estudios de funcionalidad, que dan prueba del rol regulatorio que tiene sobre el control del tiempo de maduración, vía biosíntesis de etileno. Después, diseñamos y sintetizamos una secuencia de sRNA con potencial de silenciamiento efectivo sobre el mismo sitio de interacción del blanco de miR1917. Se encontró que la aplicación, vía inyección, de una solución con sRNA bicatenario y complementario a CTR4sv3, no logró provocar cambios 24 h posterior al tratamiento en ningún estado de maduración de fruto de tomate. Sin embargo, cuando el periodo para el análisis aumentó a

72 h posterior al tratamiento en estado de maduración verde maduro, se logró el efecto de silenciamiento postranscripcional esperado, con una reducción del 48% del transcrito blanco CTR4sv3, lo cual provocó un aumento concomitante de 4 veces la expresión de ACO1, gen necesario para producción de etileno durante la maduración de fruto de tomate.

2. ANTECEDENTES

2.1 Desarrollo y maduración de fruto de tomate

Los frutos solo existen en plantas con flor y son de vital importancia para el desarrollo y dispersión de las semillas, aunque también es indispensable en la dieta humana; por lo que su valor es tanto biológico como económico (Liu y Franks, 2015). El patrón de eventos que ocurren para la formación del fruto sucede de manera localizada y coordinada. La biosíntesis, transporte y señalamiento por auxinas, provocan cambios, dentro de los cuales se encuentra la activación de la biosíntesis de giberelinas; que posterior a la fertilización, señalizan óvulos y ovarios para estimular el crecimiento del fruto (Seymour et al., 2013).

Los atributos principales para categorizar los frutos son dehiscente o no dehiscente, secos o carnosos y, carpelos libres o fusionados (apocárpico o sincárpico, respectivamente). Otra forma en la que se clasifican los frutos es como climatérico y no-climatérico, de acuerdo con los cambios fisiológicos provocados por la fitohormona etileno. Los frutos climatéricos se caracterizan por un rápido aumento en la tasa de respiración provocada por una producción autocatalítica de etileno; mientras que los no-climatéricos tienen un perfil de maduración independiente de la producción de dicha hormona. (Palma et al., 2011).

La biosíntesis de etileno depende del ciclo de Yang y, posteriormente, la acción de dos enzimas clave, la ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) sintasa, y la ACC oxidasa (Cherian et al., 2014). ACC sintasa es estimulada por encharcamientos, estrés hídrico, daño mecánico, mordedura de herbívoros, incremento o aplicación del ácido indol acético, senescencia floral y la maduración de fruto; mientras que ACC oxidasa depende especialmente del mismo proceso de maduración (Figura 1).

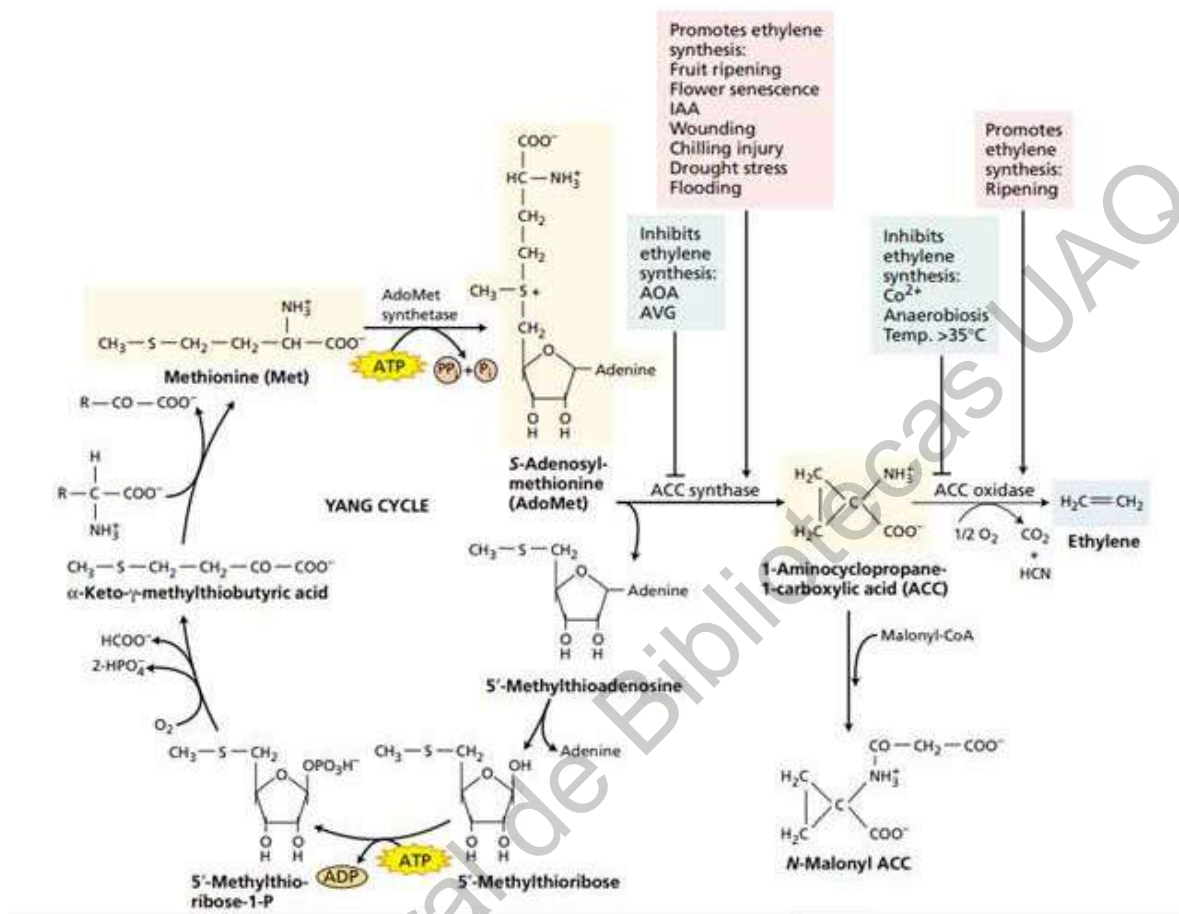


Figura 1. Ciclo de Yang y biosíntesis de etileno. Imagen tomada de Taiz y Zeiger (2002).

Por otro lado, ha sido reportada la relación entre las hormonas ya mencionadas, factores de transcripción y expresión de miRNAs como un proceso coordinado y determinante en el desarrollo y maduración de fruto. Los miRNAs han sido propuestos como un mecanismo fino de regulación genética (Seymour et al., 2008). Se ha estudiado ampliamente la expresión de miRNAs en frutos de silicuas en *Arabidopsis thaliana*, tomate, fresa (Li et al., 2009; Yu et al., 2011), pera (Wu et al., 2014), chile (Liu et al., 2017), plátano (Bi et al., 2015), naranja (Liu et al., 2014), manzana (Visser et al., 2014), uva (Carra et al., 2009), sandía (Jagadeeswaran et al., 2012), tuna (Rosas-Cárdenas et al., 2015), por tan solo mencionar algunos de los trabajos.

2.2 Silenciamiento por sRNAs

Aunque todas las moléculas de RNA comparten las mismas bases nitrogenadas (adenina, guanina, citosina y uracilo), existe una gran diversidad de estructuras y funciones. Sin embargo, moléculas de RNA no codificante (ncRNA) pasaron por alto durante una etapa temprana de los estudios de expresión de genes. Esto, probablemente se debió a la concepción del llamado “dogma central de la biología molecular”, enunciada por Crick (1970) que hacía énfasis en el flujo de DNA → RNA → proteína. Así, los ncRNA fueron considerados “basura” hasta los años 90s, cuando se empezó a encontrar función biológica no asociada a la producción proteica (Lee et al., 1993).

Los ncRNA tienen varias funciones biológicas, como son el silenciamiento de genes (Waterhouse y Hellens, 2015), modificación de la estructura de la cromatina (Yunxiang Wang et al., 2018) y metilación de DNA (Gallusci et al., 2016). Estas moléculas son reguladores de programas de desarrollo en animales (He et al., 2017) y en plantas (Kim et al., 2017).

Los miRNAs son la clase de ncRNA más estudiada (He et al., 2018) y de acuerdo con Zhang *et al.* (2006) para ser considerados dentro de esta categoría necesitan cumplir con las siguientes características: 1) son moléculas de ncRNA de entre 19 y 22 nt para animales y entre 20-24 para plantas, 2) el precursor del posible miRNA (pre-miRNA) forma una estructura tallo-horquilla y esta estructura posee energía libre muy baja, 3) son altamente conservados durante la evolución y 4) existe confirmación experimental que se valga tanto de criterio de biogénesis como de expresión. De acuerdo con Bartel (2004), la conservación de miRNAs entre plantas y animales ha sido un mecanismo de regulación genética que data al menos desde el ancestro en común entre estos reinos. Aun así, las diferencias en el mecanismo han sido postuladas como resultado de la biosíntesis de miRNA, diferente entre animales y plantas.

En la Figura 2 se muestra la biogénesis de miRNAs, la cual ha sido descrita abundantemente en trabajos como el de Budak y Akpinar (2015) y básicamente pasa por el siguiente proceso:

- a) Inicia por la transcripción de los denominados genes *MIR* por una polimerasa en específico, la RNA polimerasa II. La transcripción está regulada por activadores de la transcripción y motivos promotores *MIR*.
- b) Después de la transcripción se genera el miRNA primario (pri-miRNA), de longitud variable y plegamiento tallo-horquilla de su estructura.
- c) La estructura pri-miRNA es reconocida por miembros de la familia de enzimas Dicer-like (DCL) y ésta es responsable de procesar pri-miRNA en el precursor de miRNA (pre-miRNA). En el caso de *Arabidopsis*, la familia DCL consta de cuatro miembros y es DCL1 el responsable de la etapa entre pri y pre-miRNA, así como del segundo corte, que libera el dúplex miRNA:miRNA*
 - a. Previamente el término miRNA hacía referencia a la estructura de miRNA madura y miRNA* al complemento pasajero, es decir, que se degradaba rápidamente; sin embargo, como lo reconoce miRBase y otros trabajos (Vaz *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2015; Budak *et al.*, 2016), debido a que ambos brazos, el 5' y 3' pueden generar miRNAs maduros funcionales; ahora se hace referencia como miR-#-5p y miR-#-3p.
 - b. DCL1 y DCL4 producen secuencias maduras de miRNAs de 21 nt (la longitud más común), mientras DCL2 y DCL3 producen secuencias maduras de 22-24 nt y se postula que es la distancia entre las regiones del dominio RNasa III y PAZ, los responsables de la longitud final de miRNA.
- d) En plantas, el dúplex de los brazos 5' y 3' se genera en compartimentos llamados Dicing-bodies (D-bodies) en el núcleo, posteriormente se lleva a cabo la metilación en el extremo 3' por Gua Enhancer 1 (HEN1). Esta 2'-O-metilación del dúplex es crucial para proteger la estructura madura de exonucleasas una vez que es exportado al citoplasma.
- e) En el citoplasma, el dúplex se separa y la secuencia guía es cargada en el complejo de silenciamiento inducido por RNA o RISC (*RNA-induced silencing complex*) con la proteína Argonauta (AGO).

- a. La secuencia guía que es cargada es aquella con mayor estabilidad termodinámica en el extremo 5', mismo sitio que es responsable del enlace con AGO.
- b. La mayoría de los miRNAs conocidos en plantas son cargados en AGO1 y cuando el complejo RISC se encuentra ensamblado, proteínas adicionales como Heat Shock Protein 90 (Hsp90), contribuyen en la unión con la secuencia complementaria del miRNA guía provocando el rompimiento o bien, la inhibición del mRNA blanco.
- f) La vía previamente descrita, puede ser considerada como la biogénesis canónica, sin embargo, se reportan pequeñas diferencias en el proceso con influencia en la estructura madura. La orientación del procesamiento puede llevarse en el sentido opuesto, en un mecanismo conocido como *loop-to-base*, evento que se reporta para ath-miR319 y miR159, donde se ha encontrado que son procesados en la orientación opuesta.

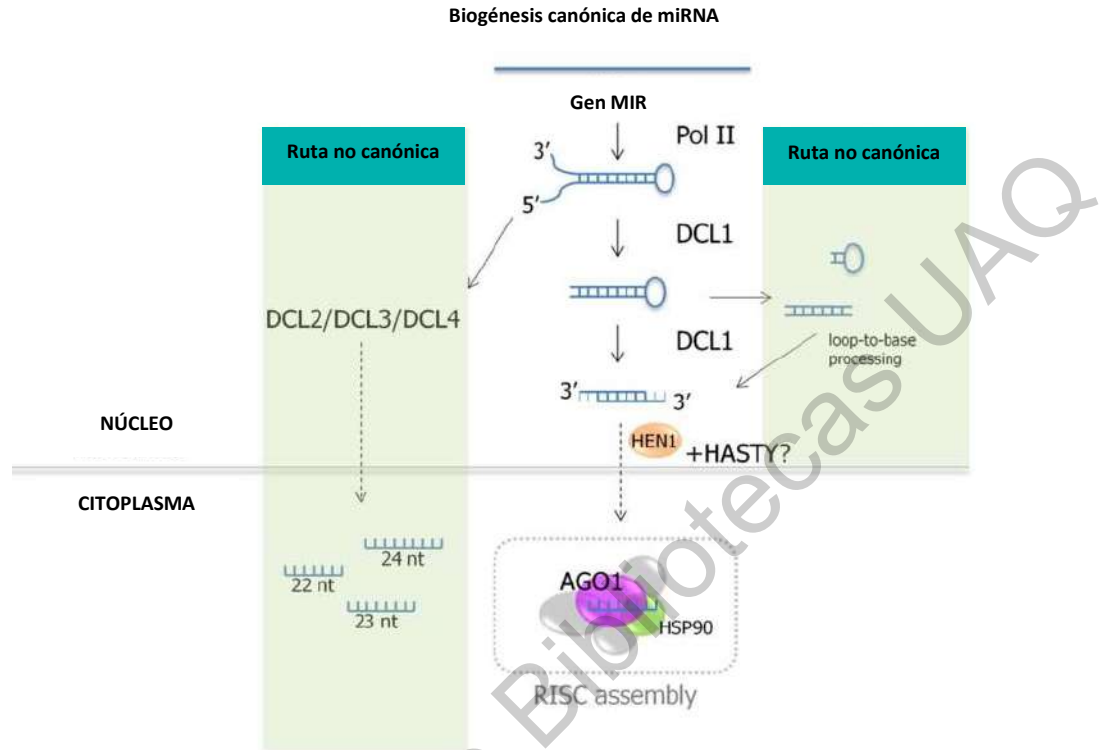


Figura 2. Biogénesis canónica y no canónica de miRNAs en plantas. Imagen modificada de Budak y Akpinar (2015)

2.3 Tecnología RNA para control de enfermedades

Algunos sRNAs son móviles entre células de manera local e incluso sistémica. En el caso de plantas, el movimiento se realiza a través de plasmodesmos y vía floema donde el fenómeno es observado incluso a través del tejido conectado en injertos (Wang et al., 2017). Por otro lado, en humanos se ha reportado que los sRNAs se transfieren por AGO2 en complejos de lipoproteínas de alta densidad o vesículas extracelulares, las cuales son vesículas membranosas de 40 a 1000 nm de diámetro, pudiendo ser exosomas o ectosomas dependiendo del tamaño y origen (Wang et al., 2017)

Recientemente se ha publicado que los sRNAs no solo se mueven entre células del individuo, sino que es posible el tráfico de estas moléculas como el resultado de interacciones entre

especies, lo cual ha sido reportado como un mecanismo de establecimiento en relaciones huésped – patógeno y huésped - simbiote (Wang et al., 2017).

Por ejemplo, Wang *et al.* (2017a) reportaron que el nemátodo gastrointestinal *Heligmosomoides polygyrus* libera miRNAs en células epiteliales del intestino a través de exosomas, lo que provoca la represión de genes de respuesta inmune del huésped. Al parecer la protección de los exosomas evita que los miRNAs sean degradados por RNAsas, lo que confiere estabilidad en la transferencia de oligonucleótidos que resultan efectores en la relación patógeno-hospedero.

Wang *et al.* (2017a) también reportan que el hongo *B. cinerea*, causante de la enfermedad conocida como pudrición gris, desarrolló un mecanismo de virulencia a través de la transferencia RNA que provoca el “secuestro” del complejo RISC de la planta y que, como resultado, favorece la infección.

Fenómenos como los recién mencionados, han sido estudiados para comprender las relaciones y factores que promueven o limitan la interacción entre especies. Con ello, se han desarrollado propuestas que mimetizan el contexto biológico en una aplicación y desarrollo tecnológico para la defensa de la planta frente a patógenos. Wang et al. (2017) revisan de manera crítica los sistemas que se han establecido con tecnología cuya base está en el uso de sRNAs, donde describen cultivos transgénicos que producen RNA mono o bicatenario cuyos genes blanco corresponden a transcritos indispensables de algunos patógenos y depredadores, tal es el caso del algodón transgénico con RNA de doble cadena que reduce la expresión del gen citocromo P450 cuando el tejido vegetal es masticado por la larva de gusano; también describen el caso de cebada transgénica que produce RNA bicatenario contra 1,3-b-glucanosiltransferasa para reducir la patogenicidad de *Blumeria graminis*.

Aunque dichas alternativas sugieren el potencial de esta tecnología para el manejo fitosanitario, la opinión pública sobre el uso de plantas transgénicas sigue siendo un impedimento para el desarrollo de proyectos económicamente exitosos. Así, Wang y Jin (2017) es que se propuso el uso de RNA con potencial de silenciamiento que resulte exitoso

por aplicaciones exógenas como ha sido descrito como silenciamiento génico inducido por spray, o SIGS por sus siglas en inglés (*Spray-induce gene silencing*).

El fundamento y prueba de concepto del uso de SIGS ha sido reportado por Koch et al. (2016), donde se destaca:

- a) Aplicaciones de RNA de doble cadena son absorbidas localmente por la planta: se ha encontrado que la aplicación vía SIGS con RNA de doble cadena para silenciar tres genes de CYP para el control de *Fusarium graminearum*, son absorbidos localmente, sobre follaje de cebada donde se realizó la aplicación.
- b) El RNA de doble cadena aplicado foliarmente, es traslocado posterior a la absorción: posterior a la aplicación contra *Fusarium graminearum*, se muestra resistencia en partes distales de la hoja donde se realizó la aplicación, lo que sugiere la traslocación de RNA entre células y tejidos en una operación a distancia y probablemente sistémica. Mediante RNA marcado, se observó traslocación en xilema, floema, células acompañantes, células mesófilas, tricomas y estomas.
- c) El RNA de doble cadena por SIGS produce sRNAs interferente: Se detectó acumulación de RNA de entre 21 y 22 nt en los segmentos locales; es decir, que el RNA de doble cadena de 791 nt, fue procesado por la maquinaria de la planta.
- d) Estabilidad de SIGS posterior a aplicación: Se encontró que no se redujo la expresión del RNA de doble cadena aún 168 horas después de la aplicación, lo cual sugiere que el material nucleico es absorbido, o bien, que se mantiene estable sobre la superficie de la planta hasta siete días.

El enfoque del desarrollo tecnológico apunta principalmente al control de enfermedades y en comparación con ellos, existen pocos estudios sobre el potencial de SIGS para el silenciamiento de los genes endógenos de la planta. Dubrovina et al. (2020) evaluaron el silenciamiento de genes endógenos de plantas transgénicas de *A. thaliana* con el gen neomicina fosfotransferasa II usando SIGS con sRNA bicatenario y sintético. La aplicación se realizó en hojas que habían sido sometidas a un tratamiento abrasivo en la zona abaxial y adaxial, misma que fue la sometida a una solución con RNA y donde se detectó el

silenciamiento de neomicina en 24 h posterior al tratamiento. Las características del tejido pareciera ser una condición no muy estudiada, por lo que resulta conveniente evaluar diferentes órganos como el caso de fruto.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

3. HIPÓTESIS

La aplicación exógena de RNA bicatenario, sintético y complementario a un transcrito relacionado con la biosíntesis de etileno en tomate, produce cambios moleculares durante el desarrollo y maduración de fruto.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Analizar los cambios fenológicos y moleculares a nivel postranscripcional por aplicación exógena de una secuencia de RNA bicatenario en frutos de tomate en diferentes estados de maduración.

4.2 Objetivos específicos

1. Crear una base de datos interna de miRNAs en tomate y su relación con el proceso de maduración de fruto.
2. Seleccionar y analizar la expresión de la secuencia de RNA con fuerte evidencia como reguladora de desarrollo de fruto de tomate.
3. Analizar los cambios moleculares y fenológicos en tomate por la aplicación de RNA bicatenario sintético.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Creación de una base de datos de miRNAs

5.1.1 Análisis diacrónico del rol de miRNAs durante el desarrollo de fruto.

Se realizó una búsqueda de artículos en el motor de búsqueda *Google Scholar* hasta diciembre del 2019 y se seleccionaron aquellos que presentaron reporte experimental de la presencia de miRNA por PCR o Northern blot durante el proceso de maduración de fruto. Se recuperó información del nombre del miRNA, su secuencia madura y el método de por el que fue detectado. Cuando fue posible, se obtuvo el blanco asociado y otros genes relacionados.

5.1.2 Predicción computacional de blancos de miRNAs de tomate.

Se adquirieron las secuencias de miRNAs maduros para la especie *Solanum lycopersicum* de la base de datos miRBase v22.1 (Kozomara et al., 2018). Éstas fueron usadas para la predicción de mRNA blancos utilizando *psRNATarget web server* (Dai et al., 2018). Los resultados fueron analizados en R.

5.1.3 Estructura de la base de datos.

La base de datos constó de tres documentos en formato CSV: 0) índice con identificadores e identidad de la secuencia madura, 1) evidencia que se presenta para los reportes en la miRBase v22.1, 2) interacciones miRNA-mRNA verificados en laboratorio, 3) interacciones miRNA-mRNA aproximadas por métodos computacionales.

5.2 Material vegetal

Se usaron plantas de *Solanum lycopersicum* cv. MicroTom (MT) como modelo para el desarrollo de fruto, obtenidas de la casa semillera Just Seed (Reino Unido).

5.2.1 Cultivo de tejidos

Para el cultivo de tejidos se desinfectaron las semillas por inmersión en cloro al 15% durante 7 min y se sembraron en medio de cultivo “Murashiage & Skoog” en cajas Petri. Por cada litro de medio, se utilizaron 2 g de medio MS y 10 g de sacarosa hasta solución homogénea,

posteriormente se ajustó el pH a 5.4 ± 0.2 y, usando agitación y calor se disolvieron 3 g de Phytigel™ (Sigma-Aldrich). Luego, el medio se esterilizó y vertió en cajas Petri de trabajo.

5.2.2 Producción en invernadero

Para la obtención de frutos se germinaron plantas en lana de roca. Al surgimiento de la primera hoja verdadera se trasplantó a bolsas de 1 kg en el invernadero experimental No. 6 de 36 m², ubicado en el Campus Amazcala de la Facultad de Ingeniería (Universidad Autónoma Querétaro) que contaba con aireación natural por ventanas manuales y riego automatizado por tiempos con gotero autocompensado. Se realizó monitoreo de temperatura y humedad relativa usando un sensor DHT11 en Arduino.

Se utilizó la nutrición propuesta por Motohashi et al. (2015) con modificaciones (Tabla 1), la cual fue suministrada para 400 ml planta⁻¹ día⁻¹.

Tabla 1. Concentración de fertilizantes para sistema hidropónico

Fertilizante*	Concentración (mg L⁻¹)
KNO ₃	808
MgSO ₄ ·7H ₂ O	492
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	944
NH ₄ H ₂ PO ₄	152
MnSO ₄	2.1179
Na ₂ [B ₄ O ₅ (OH) ₄]·8H ₂ O	11.5854
Quelato de Fe	20.3571
Quelato de Cu	0.1429
Quelato de Zn	0.2857
Molibdato de sodio	0.0429

Se realizaron podas de acuerdo con las necesidades de la planta con relación a sanidad, así como raleo de flor para producir máximo cinco frutos por racimo. La polinización fue mediante la acción natural del viento.

5.2.3 Desarrollo de fruto

Se obtuvieron tres niveles de maduración de fruto: verde maduro (MG), breaker (BR) y rojo maduro (RR). Para la selección y cosecha, se usó como referencia la guía de color reportada

en las hojas de datos “Vegetables Produce Facts” por el Centro de Postcosecha de la Universidad de California (Suslow and Cantwell, 2015; Figura 3 y Figura 4).



Figura 3. Características del fruto de tomate en maduración de MG a BR.
 En los recuadros color rojo se establecen los estados de maduración seleccionados para análisis. Fuente: “Vegetables Produce Facts” por el Centro de Postcosecha de la Universidad de California.



Figura 4. Características del fruto de tomate en maduración de MG a RR.
 En los recuadros color rojo se establecen los estados de maduración seleccionados para análisis. Fuente: “Vegetables Produce Facts” por el Centro de Postcosecha de la Universidad de California. Baja calidad de imagen de origen.

El mismo día que se realizaron los experimentos, los frutos fueron cosechados a las 8 h, se enjuagaron con agua y se desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio 500 ppm por 10 minutos.

5.2.4 Control de condiciones ambientales durante experimentación

Antes de cualquier análisis y durante el periodo de cada tratamiento, las muestras se mantuvieron dentro de una cámara ambiental “Scorpion Scientific” para controlar las condiciones de temperatura, humedad e iluminación. La programación constó en iluminación constante, temperatura de 20 °C y se activaron nebulizadores para aumentar la humedad relativa aproximadamente a 90%.

5.2.5 Variables biométricas analizadas

De acuerdo con las necesidades del experimento, se obtuvieron las variables longitud y diámetro con un vernier (Pretul), la masa con una Balanza analítica Precisa XB220A (Dietikon, Suiza), ° Brix con un refractómetro digital y color, con colorímetro Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta Inc., Japón)

5.3 Análisis molecular

5.3.1 Extracción de RNA total

Se realizó un corte en la zona apical de los frutos muestreados para su posterior análisis, posteriormente fue congelado con nitrógeno líquido, pulverizado y almacenado a -70 °C hasta su procesamiento. Se tomaron aproximadamente 100 mg de tejido congelado y se procedió a la extracción de RNA total utilizando TRIzol™ Reagent (Ambion Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Posteriormente, el RNA fue resuspendió en 50 µL de agua estéril y libre de RNAsas.

Se realizó el análisis de integridad de RNA por electroforesis en gel de agarosa a 70 V por 45 min, luego se adquirió la imagen en un fotodocumentador de Biorad Gel Doc™ EZ System y se visualizó en el software ImageLab™. Finalmente, se obtuvo la absorción a 230, 260 y 280 nm en µDrop (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland) para la cuantificación de ácidos nucleicos en cada muestra.

5.3.2 Análisis de expresión y cuantificación de moléculas de sRNAs

Para el análisis de sRNAs, se utilizaron oligonucleótidos tipo tallo-horquilla para la retrotranscripción, así como un par oligonucleótidos para qPCR (Chen et al., 2005; Varkonyi-Gasic et al., 2007). Se utilizaron oligonucleótidos de acuerdo con reportes previos y cuando fue necesario, se propuso un nuevo diseño usando la herramienta desarrollada por Astrid Research (Czimmerer et al., 2013). Se usó U6 como gen de referencia para la normalización y se incluyó control sin templado.

En la Tabla 2 y Tabla 3 se muestran los reactivos usados para la retrotranscripción y qPCR de RNAs pequeños, respectivamente, de acuerdo a la metodología reportada previamente por Varkonyi-Gasic et al. (2007).

Tabla 2. Reactivos para retrotranscripción de RNAs pequeños.

Reactivo	Cantidad
Oligonucleótido tallo-horquilla 1 μ M	1 μ L
10 mM dNTPs	0.5 μ L
Transcriptasa reversa RevertAid™ (200 u/ μ L, Thermo Scientific)	0.25 μ L
5X buffer de reacción	4 μ L
0.1 M DTT	2 μ L
Inhibidor RNaseOUT™ (40 u/ μ L, Invitrogen)	0.1 μ L
RNA total	100 ng
Agua libre de nucleasas	Vol. Para ajustar 20 μ L

El termociclador Techne TC-4000 se programó de la siguiente manera: incubación 30 min 16°C, 60 ciclos a 30°C por 30 s, 42° por 30 s, 50°C por 1; incubación a 85 °C por 5 min para inactivar la transcriptasa reversa; 4 °C a infinito.

Tabla 3. Reactivos para qPCR de RNAs pequeños

Reactivo	Cantidad
-----------------	-----------------

Mezcla maestra para qPCR Maxima™ SYBR™ Green	4 µL
Oligonucleótido adelantado 10 µM	*
Oligonucleótido reversa 10 µM	*
cDNA	2 µL
Agua libre de nucleasas	Vol. Para ajustar 20 µL

* se realizó una matriz de oligonucleótidos con el fin de optimizar la reacción.

Se utilizó un equipo CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, Inc), el cual se programó de la siguiente manera: incubación a 95°C por 5 min, seguido de 45 ciclos a 95 °C por 5 s, 60°C (esta temperatura fue optimizada al igual que la concentración de oligonucleótidos, como se mencionó previamente) por 10 s y 72°C por 1 s. Se incluyó curva de fusión de acuerdo con los parámetros de tiempo y temperatura predeterminados por el equipo. Se analizaron los resultados usando CFX Manager software (Bio-Rad Laboratories, Inc). El tamaño de los productos fue visualizado por electroforesis usando las condiciones descritas previamente.

5.3.3 Análisis de expresión de transcritos

Para el análisis de transcritos se utilizó el kit de *Maxima First Strand* (K1641, Thermo Scientific) cuya mezcla consta de oligo(dT)₁₈ y hexámeros aleatorios como oligonucleótidos para la retrotranscripción. Se usó actina como gen de referencia para la normalización y se incluyó control negativo sin templado. En la Tabla 4 se muestran los reactivos usados para la retrotranscripción y en la Tabla 5, para qPCR.

Tabla 4. Reactivos para síntesis de cDNA usando oligodT

Reactivo	Cantidad
5x Buffer de reacción	4 µL
<i>Maxima First Strand Mix</i>	2 µL
RNA	100 ng
Agua libre de nucleasas	Vol. Para ajustar 20 µL

El termociclador Techne TC-4000 se programó de la siguiente manera: incubación 25°C por 10 min, seguido de 50 °C por 15 min, inactivación a 85°C por 5 min y 4°C infinito.

Tabla 5. Reactivos para qPCR de mRNA

Reactivo	Cantidad
Mezcla maestra para qPCR	4 µL
Maxima™ SYBR™ Green	
Oligonucleótido adelantado 10 µM	*
Oligonucleótido reversa 10 µM	*
cDNA	2 µL
Agua libre de nucleasas	Vol. Para ajustar 20 µL

* se realizó una matriz de oligonucleótidos con el fin de optimizar la reacción. La temperatura de alineamiento de oligonucleótidos fue calculada para cada gen, de acuerdo con la herramienta “Tm Calculator” de Thermo Scientific Web Tools (disponible: <https://bit.ly/36ptYpj>).

Se utilizó un equipo CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, Inc), el se programó de la siguiente manera: incubación a 95°C por 10 min, seguido de 38 ciclos a 95 °C por 15 s, 60°C (esta temperatura fue optimizada al igual que la concentración de oligonucleótidos, como se mencionó previamente) por 30 s y 72°C por 30 s. Se incluyó curva de fusión de acuerdo con los parámetros de tiempo y temperatura predeterminados por el equipo. Se analizaron los resultados usando CFX Manager software (Bio-Rad Laboratories, Inc). El tamaño de los productos fue visualizado por electroforesis usando las condiciones descritas previamente.

En la sección de Apéndice, se encuentra disponible el Apéndice A: Resumen de oligonucleótidos utilizados.

5.4 Diseño y síntesis de RNA doble cadena

Para el diseño de RNA de doble cadena con potencial interferente, se utilizó el sitio de interacción de un miRNA-mRNA con evidencia en la regulación de desarrollo y maduración

de fruto por su rol en la biosíntesis de etileno. La capacidad de formar dímeros, así como las potenciales interacciones con transcritos fuera del objetivo fueron analizadas.

La síntesis de las secuencias fue realizada *in vitro* por GenScript (Piscataway, USA) y el material se mantuvo liofilizado hasta su utilización.

5.5 Aplicación de RNA exógeno

La preparación del dúplex de RNA sintético, con potencial interferente, se realizó de acuerdo con el protocolo presentado por Dubrovina et al. (2020), donde básicamente se prepararon soluciones de RNA interferente y su complemento en una proporción 1:1, luego se mantuvo a 90 °C por 1 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente, para lograr el templado del RNA bicatenario.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se decidió presentar los resultados y discusión juntos, para cada objetivo específico, debido a que esta secuencia resulta más efectiva en la comunicación de esta tesis.

6.1 Integración de base de datos interna de relaciones miRNAs-mRNA blanco

Se ha documentado la importancia que tiene el estudio de los miRNAs debido al mecanismo de silenciamiento y su papel en la regulación de procesos de desarrollo vegetal (Pasquinelli, 2012; Luo et al., 2013). Además, el potencial que posee el conocimiento del mecanismo de regulación mediada por miRNAs en específico o de RNAs interferentes, en general, para el desarrollo de tecnología orientada al mejoramiento de cultivos agrícolas resulta evidente ante el crecimiento de su protección intelectual a nivel mundial (Dalakouras et al., 2020).

Así, se realizó un análisis del rol de los miRNAs reportados para tomate como punto de partida para orientar preguntas científicas y estrategias de mejoramiento de cultivo de tomate. Así, el procesamiento de los datos se encuentra público en la plataforma GitHub (<https://github.com/chrisantics/mtitomato/>) y la base de datos generada fue publicada en un

set de datos en formato csv (Cedillo-Jiménez, 2021), cuya estructura se presenta en la Tabla 6.

Tabla 6. Estructura de la base de datos generada para el rol de miRNA en tomate

Archivo	Descripción
0index.csv	Identificadores internos, por nombre de secuencia y al secuencia de 5' a 3'
1evidence.csv	Evidencia experimental que sostiene la existencia de las secuencias de miRNAs maduros
2mtiExperimental.csv	Evidencia experimental de las relaciones para cada par miRNA-mRNA blanco
3mtiComputational.csv	Predicción computacional de las probables relaciones miRNA-mRNA blanco

6.2 Caracterización de las secuencias de miRNA maduras

6.2.1 Evidencia experimental en reportes de miRNAs en tomate

Para construir la base de datos, se analizaron las 148 secuencias reportadas en la miRBase, a excepción de miR858 que no cuenta con registro, pero sí con evidencia experimental de su existencia e incluso el silenciamiento de su blanco.

La mayoría de la evidencia que se presenta para registrar un miRNA de tomate en la miRBase, corresponde a secuenciación por ilumina y 454, 100 y 15 reportes, respectivamente; se presentan 19 con evidencia confirmada por qPCR, 3 por Northern blot y 11 etiquetados como “no experimental” (Figura 5). En este último caso, se debe a que el análisis ha sido sobre la secuencia de ADN y cuyo transcrito probablemente genera una estructura tallo-horquilla, que le confiere potencial para ser procesado por la maquinaria de biogénesis por miRNA.

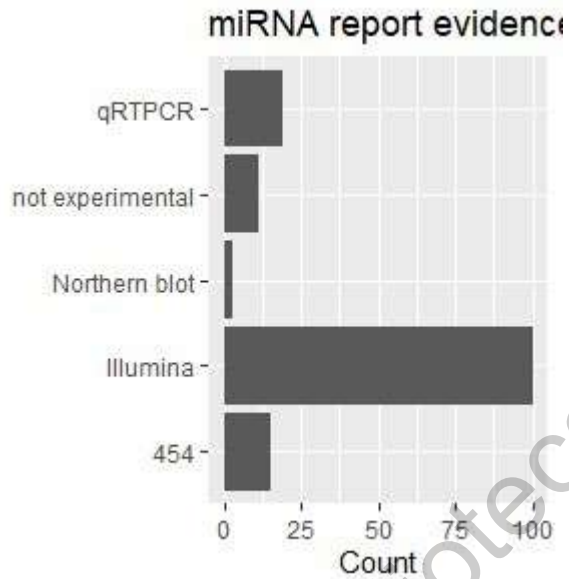


Figura 5. Evidencia de la secuencia de miRNA reportada

6.2.2 Tamaño de miRNAs maduros en tomate

Existen 138 secuencias únicas, y la diferencia con las totales, previamente mencionadas, se debe a que el contexto genético de la secuencia proviene de otra región, pero que después del procesamiento de RNA que es parte de la biogénesis de miRNAs, la secuencia madura producida puede ser idéntica a otros loci o, por otro lado, la diversidad en las endonucleasas DCL puede producir diferente longitud de nt para miRNAs maduros (Karlova et al., 2013). En la Figura 6 se muestra la frecuencia de longitud en nucleótidos de los miRNAs, siendo los de 21 nt la categorías más numerosas.

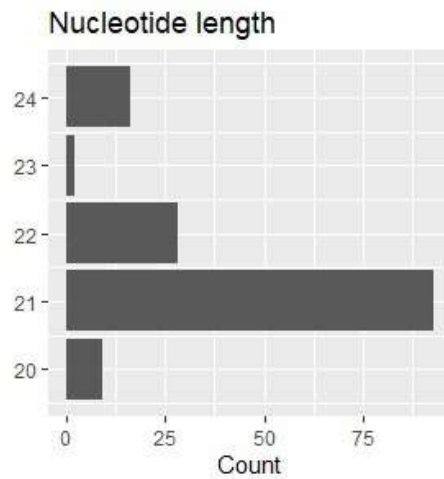


Figura 6. Diversidad de secuencias maduras de miRNAs.

Vaucheret (2009) indica que distintos contextos genómicos pueden producir secuencias con longitud predominante, como es el caso del gen MIR168a que produce miR168 de 21 nt, mientras que MIR168b produce cantidades iguales de secuencias maduras de 21 y 22 nt; sin embargo, solo las secuencias de 21 nt son cargadas en el AGO1, que es la endonucleasa responsable de producir el corte en el transcrito blanco. Esta información orienta la selección de la longitud de secuencias para el diseño de sRNAs con potencial interferente.

Así se presentan características globales de los miRNAs reportados para tomate. Sin embargo, para conocer su rol biológico es necesario conocer las interacciones con transcritos blancos asociados.

6.2.3 Análisis de la función biológica de los miRNAs en tomate

Para conocer las interacciones entre miRNAs y sus correspondientes blancos, se realizaron dos aproximaciones: a) determinadas experimentalmente por trabajos previos y b) aproximación computacional.

Con relación a las interacciones determinadas experimentalmente, se seleccionaron los artículos publicados hasta el mes de diciembre de 2019 y se obtuvieron 107 publicaciones que cumplieran con los siguientes requisitos: reportó evidencia experimental sobre la expresión

de miRNAs, blancos asociados y se analizó el fenotipo resultante de la aplicación de la ingeniería genética. Por otro lado, para la aproximación computacional usamos los algoritmos reportados por (Dai et al., 2018) mediante el uso de la plataforma PsRNATarget versión 2. Así, obtuvimos 39 interacciones miRNA – transcrito blanco mediante la estrategia de búsqueda por reporte experimental, mientras que por aproximación computacional obtuvimos 17,442.

El total de interacciones fueron analizadas por ontología genética para conocer el rol de cada transcrito en los procesos biológicos y se muestra en la Tabla 7, donde la mayoría de los transcritos están asociados a corresponden a actividad catalítica.

Tabla 7. Gene Ontolgy para los blancos de miRNA de tomate

Términos de Ontología Genética	Proporción de transcritos blanco
Actividad en regulación (GO:0045182)	0.9%
Enlace (GO:0005488)	26.8%
Actividad como receptor (GO:0004872)	4.0%
Actividad estructural (GO:0005198)	2.6%
Actividad transducción de señal (GO:0004871)	3.2%
Actividad catalítica (GO:0003824)	49.3%
Actividad antioxidante (GO:0016209)	0.8%
Actividad como transportador (GO:0005215)	12.6%

Los procesos asociados al desarrollo de fruto de tomate son de particular interés de nuestro grupo de investigación. Por ello, resulta destacable la actividad de transcritos con actividad como reguladores y como receptores, debido a la vía de percepción de etileno y transducción

de señales que resulta en la síntesis de los elementos necesarios para entrar del sistema I de producción de etileno que es auto inhibitorio, al sistema II, que es auto catalítico (Li et al., 2019).

Hüttenhofer et al. (2005) indica que las técnicas de alto rendimiento para obtener datos de salida han engrosado los reportes de secuencias de RNA no codificante lo cual coincide con el resultado reportado en la Figura 5. El mismo autor critica que los datos ofrecidos de manera masiva son potenciales y reportar su existencia es altamente especulativo; por ello, sugiere reportar únicamente cuando se cuenta con evidencia de la actividad funcional, como método de validación. Así, se integró la base de datos interna con las siguientes sugerencias de uso:

1. La existencia de miRNAs debe ser tomada con prudencia, considerando la evidencia experimental que se ofrece y confirmando últimas actualizaciones experimentales
2. Cuando la existencia del miRNA se soporta por datos masivos, como con técnicas de secuenciación por Illumina o 454, se sugiere conducir un experimento de validación experimental de la secuencia, por Northern blot o PCR.
3. Cuando la existencia del miRNA está validada de acuerdo con el punto 2, no es indicativa de función biológica. Por ello, es necesario conducir una aproximación computacional para conocer potenciales transcritos blancos.
4. El potencial blanco requiere ser validado experimentalmente por PCR y se debe diseñar un experimento para resolver preguntas de ciencia básica, sobre contexto biológico en cuanto a localización en tejido y tiempo en el desarrollo.

En la Tabla 8 se presentan únicamente las relaciones entre miRNA y transcrito blanco que poseen evidencia poderosa sobre la interacción real entre, lo cual se presenta en la. Además, en la Figura 7 se muestran las relaciones entre miRNAs y blancos, así como genes corriente abajo que tienen relación con el desarrollo y maduración de fruto, donde los datos están organizados por nodos.

Tabla 8. Papel de miRNAs en la regulación del desarrollo de fruto de tomate.

miRNA	Cantidad de nt	Rol biológico	Descripción del rol	Evidencia	Transcritos blanco
sly-miR156a	21	Establecimiento de identidad de órganos: flor y fruto	Índice de ramificación Verticilos florales Identidad de fruto Cantidad de lóculos	Hibridación In situ qRT-PCR	SlySBP2,3,6a,10,13,15 LeSPL-CNR
sly-miR156b	21	Establecimiento de identidad de órganos: flor y fruto	Índice de ramificación Verticilos florales Identidad de fruto Cantidad de lóculos	Hibridación In situ qRT-PCR	SlySBP2,3,6a,10,13,15 LeSPL-CNR
sly-miR156c	21	Establecimiento de identidad de órganos: flor y fruto	Índice de ramificación Verticilos florales Identidad de fruto Cantidad de lóculos	Hibridación In situ qRT-PCR	SlySBP2,3,6a,10,13,15 LeSPL-CNR
sly-miR156d-5p	20	Reblandecimiento	Reblandecimiento del fruto	qRT-PCR	LeSPL-CNR
sly-miR156e-5p	20	Reblandecimiento	Reblandecimiento del fruto	qRT-PCR	LeSPL-CNR
sly-miR159	21	Inducción de fruto	Establecimiento e inicio del desarrollo de fruto	qRT-PCR	GAMYB1/2
sly-miR160a	21	Regulación de forma: elongación de fruto	Organización de ovario y flores Abscisión de fruto Forma del fruto	Northernblot	SIARF10A, SIARF10B, SIARF17
sly-miR164a-5p	21	Transición en etapas del desarrollo de fruto	Cantidad de lóculos Tiempo en la transición entre etapas del desarrollo de fruto	qRT-PCR	GOB
sly-miR164b-5p	21	Transición en etapas del desarrollo de fruto	Cantidad de lóculos Tiempo en la transición entre etapas del desarrollo de fruto	qRT-PCR	GOB

sly-miR166a	21	Señalización regulada por hormonas	Mantenimiento de meristemas Diferenciación celular en transición de flor a fruto Mantenimiento del ciclo de vida celular	qRT-PCR	REV-like
sly-miR166b	21	Transición en etapas del desarrollo de fruto	Mantenimiento de meristemas Diferenciación celular en transición de flor a fruto Mantenimiento del ciclo de vida celular	qRT-PCR	REV-like
sly-miR166c-3p	21	Transición en etapas del desarrollo de fruto	Mantenimiento de meristemas Diferenciación celular en transición de flor a fruto Mantenimiento del ciclo de vida celular	qRT-PCR	REV-like
sly-miR168a-3p	21	Transición en etapas del desarrollo de fruto	Inducción floral Índice de ramificación Tasa de crecimiento de fruto Tamaño y forma de fruto Partenocarpia Acumulación de miRNAs Inducción floral	qRT-PCR	SIAGO1a, SIAGO1b
sly-miR168b-3p	21	Transición en etapas del desarrollo de fruto	Inducción floral Índice de ramificación Tasa de crecimiento de fruto Tamaño y forma de fruto Partenocarpia Acumulación de miRNAs Inducción floral Regulación del tiempo del desarrollo desde inducción del fruto hasta maduración fisiológica	qRT-PCR	SIAGO1a, SIAGO1b
sly-miR171a	21	Transición en etapas del desarrollo de fruto	Tamaño de fruto Cantidad de semillas Regulación de comunicación hormonal entre auxinas y giberelinas	qRT-PCR	GRAS24, GRAS40
sly-miR1917	21	Tiempo de desarrollo de fruto	Tiempo de desarrollo y maduración	qRT-PCR	SICTR4sv1, SICTR4sv2, SICTR4sv3

sly-miR396a-5p	21	Regulación de forma: tamaño de fruto	Tamaño de flor y sépalo Masa de fruto Tamaño de fruto	qRT-PCR	SIGRF1, SIGRF2, SIGRF3, SIGRF4, SIGRF5
sly-miR396b	21	Regulación de forma: tamaño de fruto	Tamaño de flor y sépalo Masa de fruto Tamaño de fruto	qRT-PCR	SIGRF1, SIGRF2, SIGRF3, SIGRF4, SIGRF5
sly-miR403-3p	21	Transición en etapas del desarrollo de fruto	Tiempo de floración Viabilidad de semilla	qRT-PCR	SIAGO2
miR858	21	Color de fruto	Color de fruto, inconsistencias en resultados	qRT-PCR	SIMYB12, SIMYB48-like

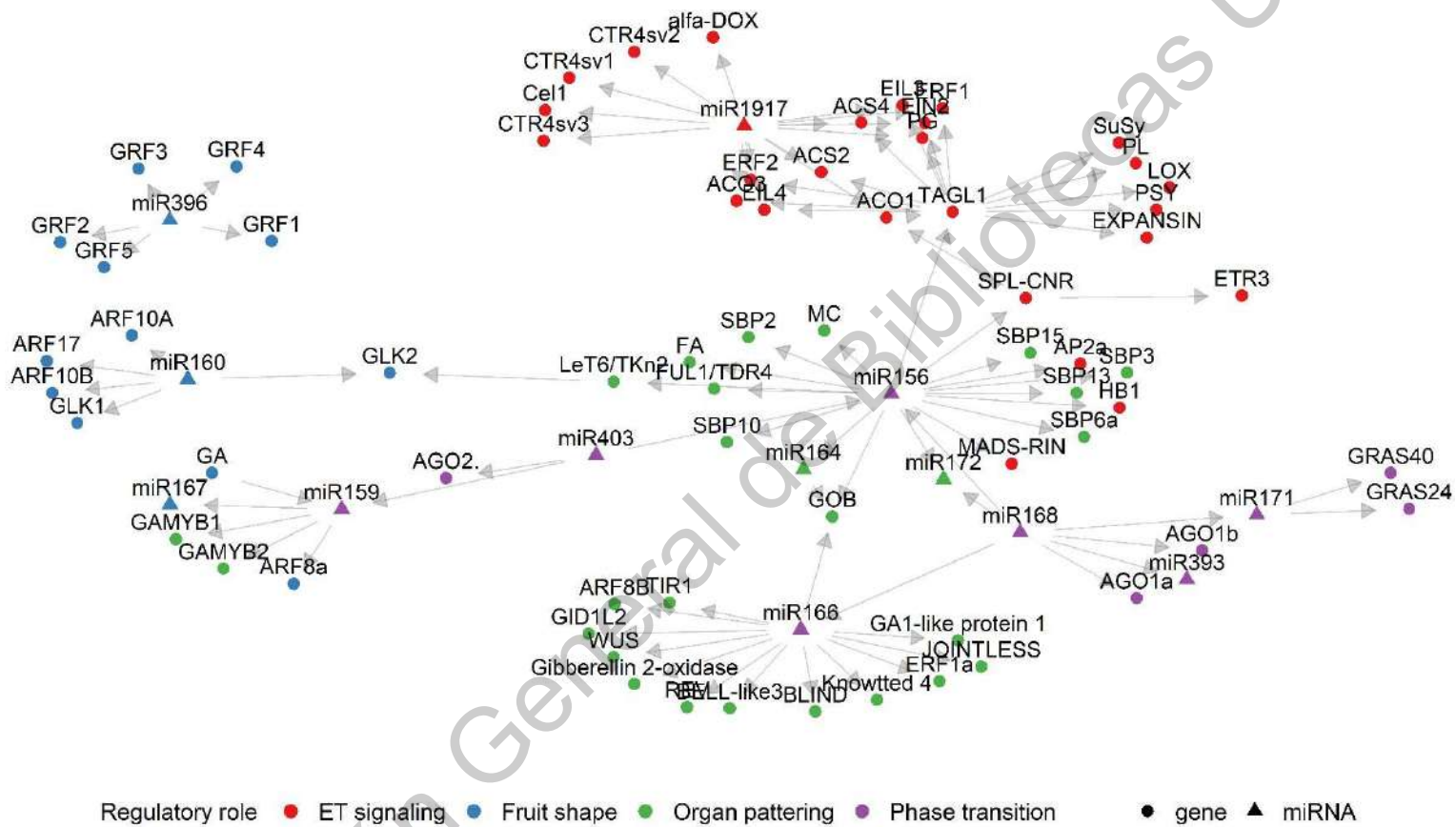


Figura 7. Red de regulación debida a miRNAs durante el desarrollo de tomate.

En los nodos se encuentran cuatro procesos importantes durante el desarrollo de tomate: a) señalización por etileno, b) regulación de la forma y tamaño del fruto, c) patrón de desarrollo de los órganos y d) transición entre etapas del desarrollo. Algunos miRNAs tienen función en más de uno de los nodos, como es el caso de miR1917 cuya relación con la señalización y percepción por etileno contribuye posteriormente en la transición etapas del desarrollo y maduración.

Dos miRNAs son destacables para diseñar estrategias para mejoramiento de cultivo: miR396 tiene una contribución muy importante en el tamaño de fruto pues podría tener impacto en el incremento de rendimiento y miR1917 para regular el tiempo de maduración. Cao et al. (2016) reportan que en tomate se expresa miR396a y b en su forma madura y silencian factores de transcripción de crecimiento y utilizando tecnología STTM para bloquear la función de miR396 se incrementó se redujo la intensidad del silenciamiento de los transcritos blancos, provocando un incremento de entre el 39 y 45 % del peso del fruto (Figura 8A). Por su parte, Yanling Wang et al. (2018) estudiaron la sobreexpresión de miR1917 y encontraron que aumenta la respuesta a etileno, provocando abscisión acelerada del peciolo pero también el tiempo para que el fruto madure (Figura 8B).

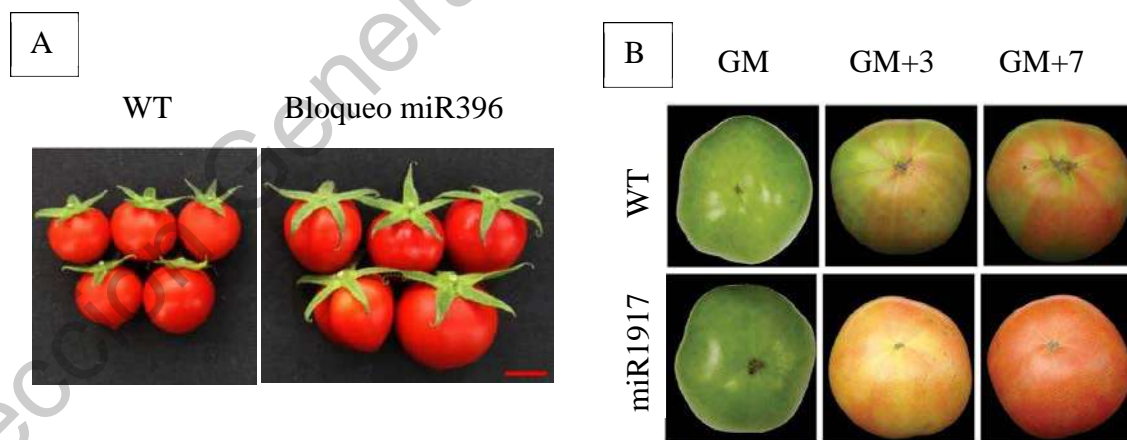


Figura 8. Fenotipo resultante por la atenuación de miR396 y sobreexpresión de miR1917.
A: Comparación de frutos Wild-type y línea transgénica #4 con secuencia STTM contra miR396. La barra representa 1 cm. Imagen editada de Cao et al. (2016).
B: Comparación de frutos Wild-type y línea transgénica #4-20 con sobreexpresión de miR1917 donde se muestran los estados GM, tres y siete días después. Imagen editada de Wang et al. (2018).

Mientras que el caso de miR396 se planteó una estrategia para mitigar su efecto interferente para liberar la expresión de su blanco, para miR1917 se promovió su expresión para acelerar la maduración de fruto. Si bien, miR396 tiene potencial en desarrollo con interés productivo y económico, en nuestro grupo de investigación nos enfocamos en comprender el proceso y los tiempos de maduración de fruto.

6.2.4 miR1917 con rol destacable en el desarrollo de fruto en tomate

Nuestro equipo de trabajo ha reportado mediante una revisión descriptiva, la relación que tienen los miRNAs durante el proceso de desarrollo y maduración de fruto de tomate, donde establecimos nodos o interruptores asociados a un proceso en particular: señalización por etileno, forma del fruto, organización de tejidos y transición en etapas del desarrollo (Cedillo-Jimenez et al., 2020).

Así, miR1917 cumple con una serie de criterios que lo convierte en un buen candidato para estudiar el proceso de maduración, donde se relaciona la biosíntesis de etileno y el silenciamiento postranscripcional. Además, se tiene evidencia de su existencia por secuenciación de sRNAs, así como Northern blot y qPCR, se han confirmado sus blancos que corresponden a variantes de un regulador negativo en la señalización por etileno e incluso se ha evaluado su función mediante su sobre expresión en plantas transgénicas de tomate y se ha establecido su relación con genes asociados a etileno.

La secuencia de miR1917 fue detectada por secuenciación profunda de sRNAs y confirmada por Moxon et al. (2008), nombrada provisionalmente 'Sly-miR-X' y posteriormente registrada como sly-miR1917 (*sly* por *Solanum Lycopersicum*, disponible en la miRBase v. 22.1). Debido a que el producto de PCR produjo una señal muy baja, los autores mencionados recurrieron al bloqueo de ácidos nucleicos (LNA, por las siglas de *locked nucleic acid*) que es una técnica que permite incrementar la sensibilidad de la PCR (You et al., 2006).

Aunque no fue detectada la secuencia complementaria a miR1917, que se esperaría como parte del dúplex generado en la biogénesis de miRNA, su contexto genómico sí es conocido

y se encuentra en el cromosoma 8: 52099541-52099671 [-] (SL2.50; GCA_000188115.2, Figura 9).

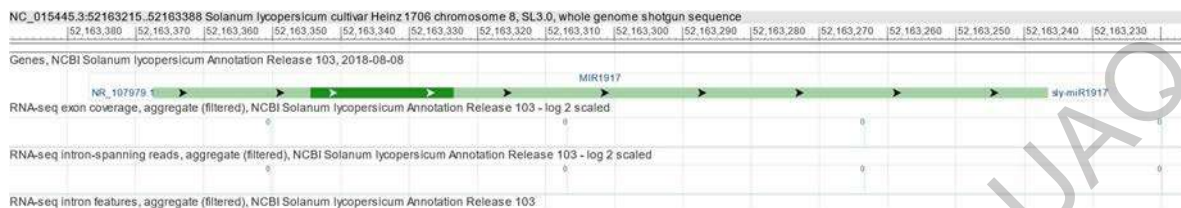


Figura 9. Localización de miR1917 dentro del genoma de tomate (SL3.0). En color verde oscuro, la secuencia madura de miR1917. Fuente: sitio NCBI.

Más tarde, Wang et al. (2018) detectaron la expresión de miR1917 por PCR en plántula, raíces, tallo, hoja, flor y fruto. Para los fines que los autores perseguían, resultaba especialmente relevante conocer la expresión de miR1917 en sépalo, pétalo, estambre y pistilo; sin embargo, la mayor expresión entre todos los órganos se detectó en el fruto. Al analizar el desarrollo de este órgano, encontraron que la expresión de miR1917 aumenta conforme transcurre el desarrollo y su expresión alcanza el máximo en la etapa BR.

6.2.5 Análisis de interacción entre miR1917 y transcritos blancos.

Se tienen identificadas tres variantes corte- corte-empalme (conocido popularmente por el anglicismo *splicing*) de CTR4 (mRNA, secuencia codificante reportada por Adams-phillips et al. (2004), identificación de GenBank AY382678.1). Dichas variantes, conocidas como CTR4sv (sv por *splicing variant*) han sido detectadas como blanco de miR1917 (Moxon et al. 2008; Wang et al. 2018)

En la publicación de Adams-phillips et al. (2004) se reportaron los transcritos de [CTR4](#) (AY382678) y la primer variante [CTR4sv1](#) (AY394002); luego, en trabajos realizados entre 2008 y 2020 reportaron otras variantes y reportes duplicados de los ya mencionados, provocando una potencial confusión entre CTR4sv1 y sv2. Con el propósito de generar información confiable y rastreable, en este trabajo reconocemos las secuencias [CTR4sv1](#), [CTR4sv2](#), [CTR4sv3](#), con las referencias NCBI NM_001247528.1, NR_131258.1, MF522195.1, respectivamente (Tabla 9).

Tabla 9. Descripción de CTR4 y las alternativas de corte y empalme de mRNA.

	CTR4 mRNA CDS	CTR4sv1	CTR4sv2	CTR4sv3
Definición	<i>Lycopersicon esculentum</i> CTR1-like protein kinase (CTR4) mRNA, complete cds	<i>Solanum lycopersicum</i> CTR1- like protein kinase (CTR4), transcript variant 1, mRNA	<i>Solanum lycopersicum</i> CTR1- like protein kinase (CTR4), transcript variant 2, non- coding RNA	<i>Solanum lycopersicum</i> cultivar Zhongshu 6 CTR1-like protein kinase transcript variant 3 (CTR4) mRNA, complete cds, alternatively spliced
Entrada en NCBI del mRNA	AY382678.1	NM_001247528.1	NR_131258.1	MF522195.1
Longitud	2935 pb mRNA	2935 pb RNA	2839 pb RNA	2966 pb RNA
Análisis de interacción con miR1917	No se detectó con algoritmos de Bonnet et al. (2010)	No se detectó con algoritmos de Bonnet et al. (2010)	target NR_131258.1 miRNA sly- miR1917 score 2.5 mfe_ratio 0.83 start 2630 seed_gap 0 seed_mismatch 0 seed_gu 1	target MF522195.1 miRNA sly- miR1917 score 2.5 mfe_ratio 0.83 start 2788 seed_gap 0 seed_mismatch 0 seed_gu 1

			<pre> gap 0 mismatch 1 gu 1 miRNA_3' UGAAAUCCUGAGAAUAAUUA aln . o o target_5' UCUUUGGCAUUCUUUAUUAU </pre>	<pre> gap 0 mismatch 1 gu 1 miRNA_3' UGAAAUCCUGAGAAUAAUUA aln . o o target_5' UCUUUGGCAUUCUUUAUUAU </pre>
Proteína resultante	AAR89821.1	NP_001234457.1	No codificante	ATY38750.1
Referencias	Adams-phillips et al. (2004)	Yang et al. (2020) Li et al. (2019) Wang et al. (2018) Li et al. (2019) Adams-phillips et al. (2004)	Yang et al. (2020) Li et al. (2019) Wang et al. (2018) Li et al. (2019) Adams-phillips et al. (2004)	Wang et al. (2018)

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Usando los algoritmos de emparejamiento diseñados por Bonnet et al. (2010) y *PsRNATarget*, se logró detectar el sitio de interacción de dos variantes corte-empalme, CTR4sv2 y CTR4sv3 (Figura 10).

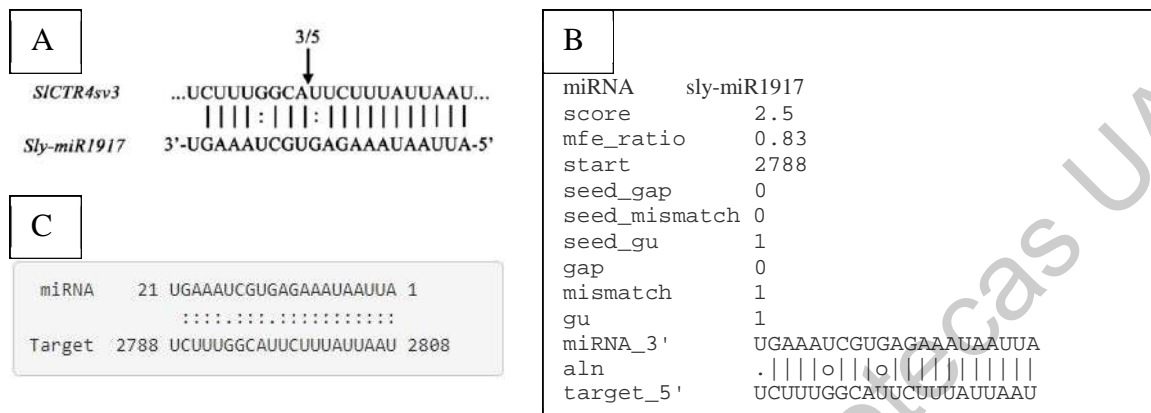


Figura 10. Sitio de interacción miR1917 y SICTR4sv3.

A: sitio de corte validado por Wang et al. (2018). Aproximación computacional sobre la interacción por **B:** Bonnet et al. (2010) y **C:** PsRNATarget

Mientras CTR4sv2 no produce proteína, CTR4sv3 sí por lo que éste es el blanco relevante para el proceso de silenciamiento por miR1917. En consecuencia, se caracterizó la expresión de miR1917 y CTR4sv3 en las condiciones de trabajo locales y con la variedad de toma MT, debido a las ventajas metodológicas que supone su tamaño de fruto y ciclo de vida.

6.3 Estrategia para el análisis de miR1917-CTR4sv3

6.3.1 Diseño de oligonucleótidos para análisis de miR1917

Para la retrotranscripción, se utilizaron dos juegos de oligonucleótidos: los reportados por Wang et al. (2018) y un diseño propio que se realizó utilizando los algoritmos publicados por Czimmerer et al. (2013). Para ambos casos, las secuencias se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Secuencia de miR1917 y oligonucleótidos para analizar su expresión.

Secuencia (5' a 3')	Referencia
sly-miR1917 MIMAT0007909 AUUAAUAAAGAGUGCUGAAAGU	miRBase V22.1

Retrotranscripción:
 CTCAGCGGCTGTCGTGGACTGCGCGCTGCCGCTGAGACTT
 qPCR (adelantado):
 CTGTGATTAATAAAGAGTGCTA
 qPCR (reversa):
 GGCTGTCGTGGACTGCG

Wang et al., 2018

Retrotranscripción:
 GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCC
 AACACTTTA
 qPCR (adelantado):
 GTTGGGGATTAATAAAGAGTGTC
 qPCR (reversa universal):
 GTGCAGGGTCCGAGGT

Nuevo diseño

Analizamos la estabilidad de plegamiento “tallo-horquilla” del oligonucleótido para la retrotranscripción de miRNAs de acuerdo con Chen et al. (2005). Para ello, se usaron los algoritmos de plegamiento de RNA de ViennaRNA Package 2.0 (Lorenz et al., 2011). La energía libre para cada caso se presenta en la Tabla 11, la visualización de estructuras se muestra en la Figura 11 y Figura 12; los productos de PCR en la Figura 13.

Tabla 11. Energía libre para la dimerización de oligonucleótidos para retrotranscripción de miR1917.

Dimerización	Wang et al. (2018)	Nuevos
Auto plegamiento tallo-horquilla	-52.53 kcal/mol	-70.73 kcal/mol
Plegamiento tallo-horquilla: miRNA	-26.74 kcal/mol	-34.28 kcal/mol
Nucleótidos de con que interactúa miR1917	5'-AAGU-3'	5'-UAAAGU-3'
Tamaño de producto de PCR	51 pb	55 pb

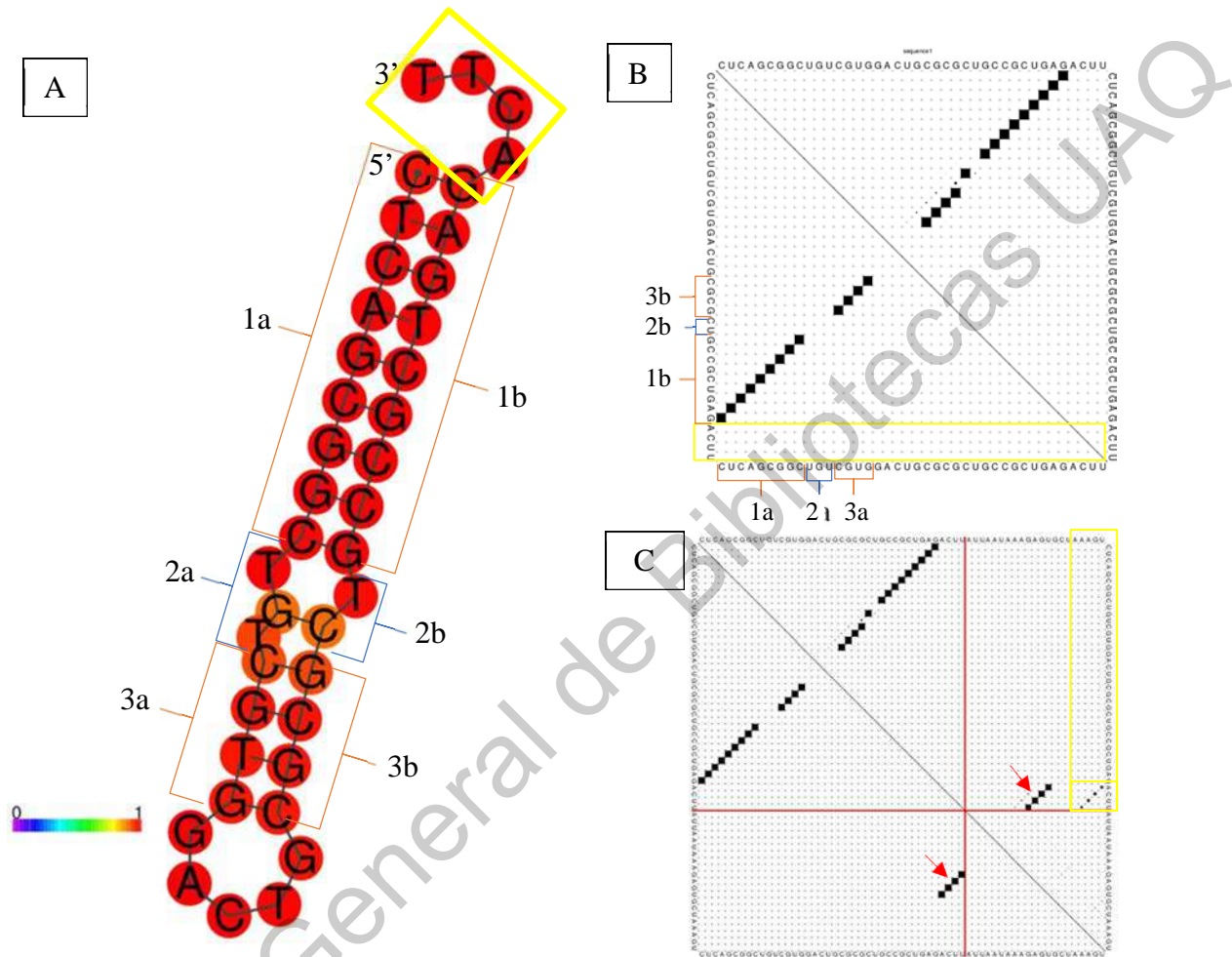


Figura 11. Estimación computacional de las potenciales dimerizaciones para la retrotranscripción de miR1917 basado en Wang et al. (2018)

La secuencia en cuadro amarillo (5'-ACTT-3') es el sitio de interacción con miR1917 (5'-AAGU-3'). A: plegamiento de estructura tallo-horquilla, donde el color representa la probabilidad de apareamiento de bases. B: gráfico de puntos que representa la probabilidad de apareamiento de pares de bases, en correspondencia con (A) se indican las secciones 1-3 a y b. C: gráfico de puntos que representa la probabilidad de apareamiento de bases, en el primer cuadrante del oligonucleótido, así como el empalme para fusión oligonucleótido – miRNA (cuadro amarillo) y dos interacciones que estarían obstruidas por la estructura tallo-horquilla (flechas rojas).

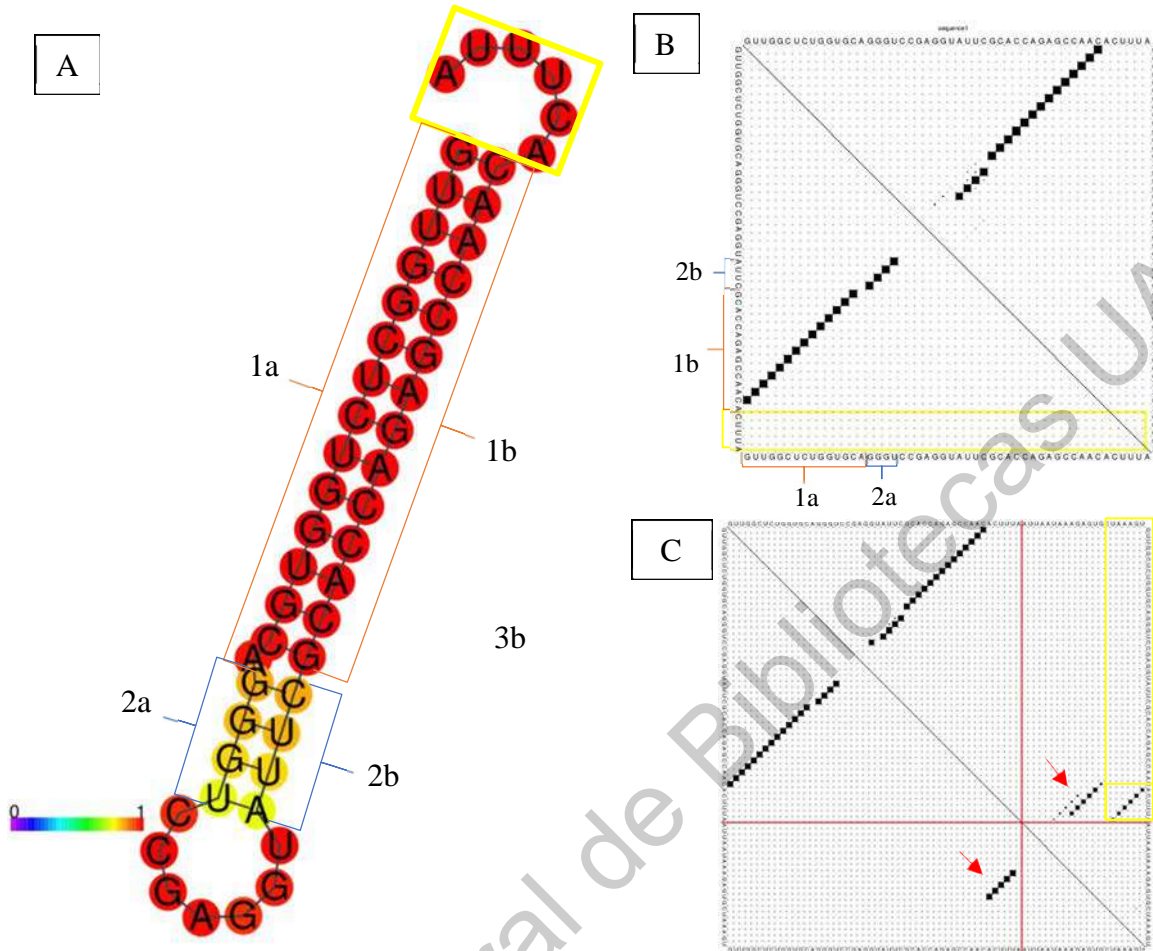
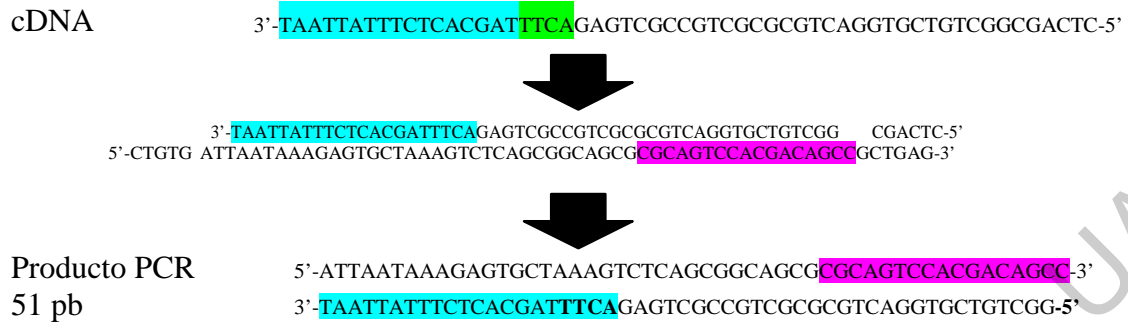


Figura 12. Estimación computacional de las potenciales dimerizaciones para la retrotranscripción de miR1917, diseño nuevo.

La secuencia en cuadro amarillo (5'-ACTTTA-3') es el sitio de interacción con miR1917 (5'-UAAAGU-3'). A: plegamiento de estructura tallo-horquilla, donde el color representa la probabilidad de apareamiento de bases. B: gráfico de puntos que representa la probabilidad de apareamiento de pares de bases, en correspondencia con (A) se indican las secciones 1-2 a y b. C: gráfico de puntos que representa la probabilidad de apareamiento de bases, en el primer cuadrante del oligonucleótido, así como el empalme para fusión oligonucleótido – miRNA (cuadro amarillo) y dos interacciones que estarían obstruidas por la estructura tallo-horquilla (flechas rojas).

A. Wang et al. (2018)



B. Nuevos

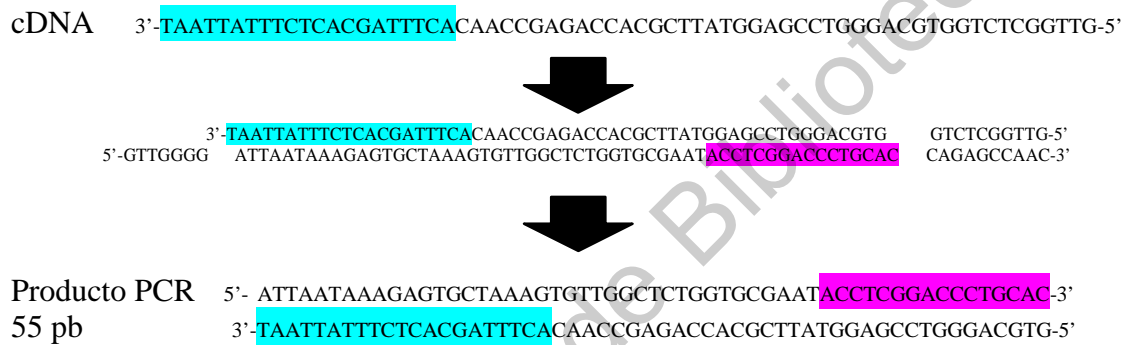


Figura 13. Estimación del tamaño de producto por PCR para miR1917
Secuencia de cDNA resultante de retrotranscripción y producto PCR. Sitios de interacción: en verde
miR1917 con oligonucleótido tallo-horquilla durante retrotranscripción, en turquesa con
oligonucleótido PCR adelantado y en magenta, con el reversa.

6.3.2 Diseño de oligonucleótidos para análisis de CTR4sv3

Usando Primer3 y BLAST se evaluó el emparejamiento de los oligonucleótidos para analizar la expresión de CTR4sv3 (adelantado 5'-AGGGTATGAGGCTTGAAATTCC-3' y retrasado 5'-TATGAGCGGTTTCAACATATCCAT-3') y CTR4svs (adelantado 5'-GGCTACCTTCGCCTTCAATAAA-3' y retrasado 5'-TGGTCCAAGCTCTTCCTCTCAG-3') propuestos por Wang et al. (2018). Para CTR4sv3 se detectó un producto de 131 pb que empareja con CTR4sv1 en la zona codificante, mismo tamaño de producto para sv2 (RNA

no codificante) y un producto de 209 pb en la zona 3' no codificante de CTR4sv3 (Figura 14).



Figura 14. Resultados Primer-BLAST para oligonucleótidos para CTR4sv1, sv2 y sv3 por qPCR. En las flechas se indica el fragmento amplificado, de 131 pb para CTR4sv1 y sv2, de 209 pb para CTR4sv3. En la franja azul, se indica la zona de interacción entre miR1917 y CTR4sv2 y sv3.

Se evaluaron y optimizaron los primers de acuerdo con lo que se presenta en el apartado de análisis del par miR1917-CTR4sv3.

6.4 Análisis de la expresión de miR1917 durante el desarrollo de fruto de tomate.

6.4.1 Procesamiento y extracción de RNA

De cada muestra, se tomó un corte en la zona apical del fruto, misma que fue congelada con nitrógeno líquido y pulverizada para la extracción de RNA. En la Tabla 12 se muestran los

resultados para las relaciones de absorbancia y concentración de RNA, la tabla completa se encuentra en Apéndice B: Absorbancias y concentración de todos de todos los experimentos. Los resultados de la electroforesis se muestran en la Figura 15. Aunque los intervalos para la relación 260/230 fueron bajos, las bandas ribosomales en el gel se presentaron integras, por lo que se trabajó con estas muestras.

Tabla 12. Rango de las relaciones de absorbancia para la extracción de RNA para análisis de miR1917-CTR4sv3

Madurez	Abs. 260/280	Abs. 260/230	ng μL^{-1}
GM	1.40-1.83	0.22-0.68	93.26-414.4
BR	1.48-1.88	0.35-0.44	247.2-296.8
RR	0.97-1.63	0.14-0.63	79.2-3.5.6

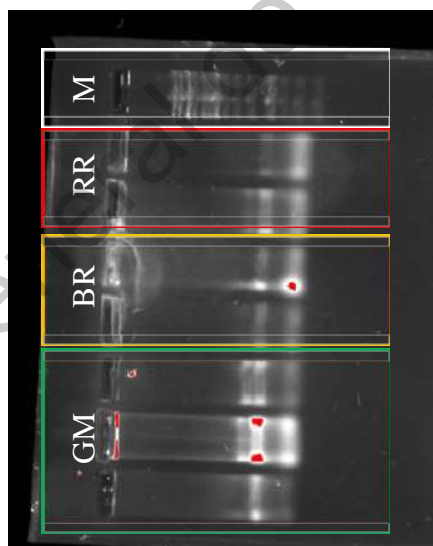


Figura 15. Extracción de RNA para análisis miRNA-mRNA.

Se muestra electroforesis correspondiente a GM (carril 1-3), BR (4-5), RR (6-7) y marcador de peso molecular de 1 kb (carril 8).

6.4.2 Evaluación de las condiciones para el análisis de expresión miR1917-CTR4sv3

Las muestras de RNA fueron normalizadas a $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ para la síntesis de cDNA y posterior qPCR. Se realizó el análisis en términos relativos utilizando el método $\Delta\Delta\text{C}_T$ (Livak and Schmittgen, 2001), donde se usó el estado GM como calibrador para la expresión de miR1917 y CTR4sv3, usando U6 y Actina como gen de referencia, respectivamente.

Primero se evaluó la expresión de miR1917 utilizando dos diseños de oligonucleótidos para la retrotranscripción y posterior qPCR, los cuales correspondían a los publicados por Wang et al. (2018) y el diseño de este trabajo. Utilizando el estado de maduración BR, se realizó una matriz de oligonucleótidos para variar la concentración del adelantado y reversa, de cada diseño. En la Figura 16 se muestra un ejemplo del gráfico de fluorescencia detectada para la expresión de miR1917 usando los oligonucleótidos reportados previamente, donde no se logró la amplificación.

Por otro lado, en la Figura 17 se muestran los gráficos correspondientes al uso oligonucleótidos diseñados para este trabajo, con temperatura de alineamiento de 60°C y concentración final de 450 nM y 150 nM para el adelantado y reversa, respectivamente. Se logro la amplificación y en valor de T_m de 75°C , además el producto resultante fue de aproximadamente 53 pb , cuando el esperado era de 55 pb , como se muestra en el gel de electroforesis de la misma figura.

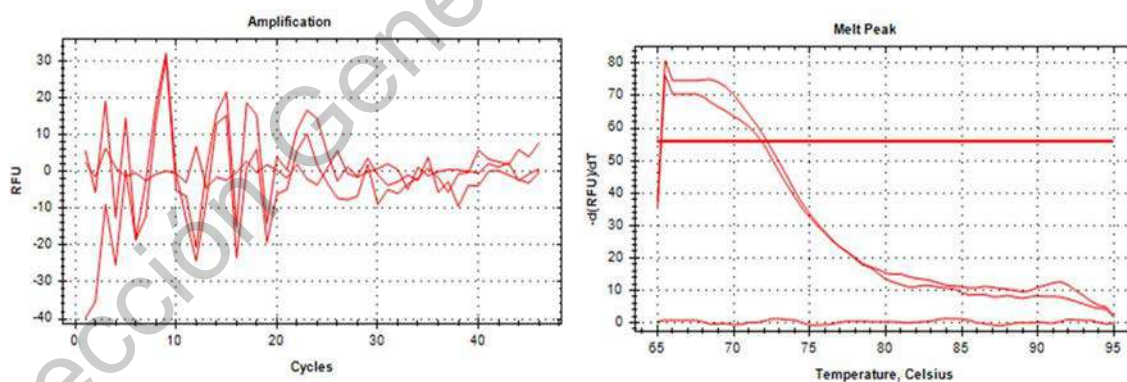


Figura 16. Amplificación no exitosa de miR1917 por qPCR
Fluorescencia detectada usando oligonucleótidos reportados por Wang et al. (2018). Izquierda, curva de amplificación y a la derecha, de temperatura de fusión.

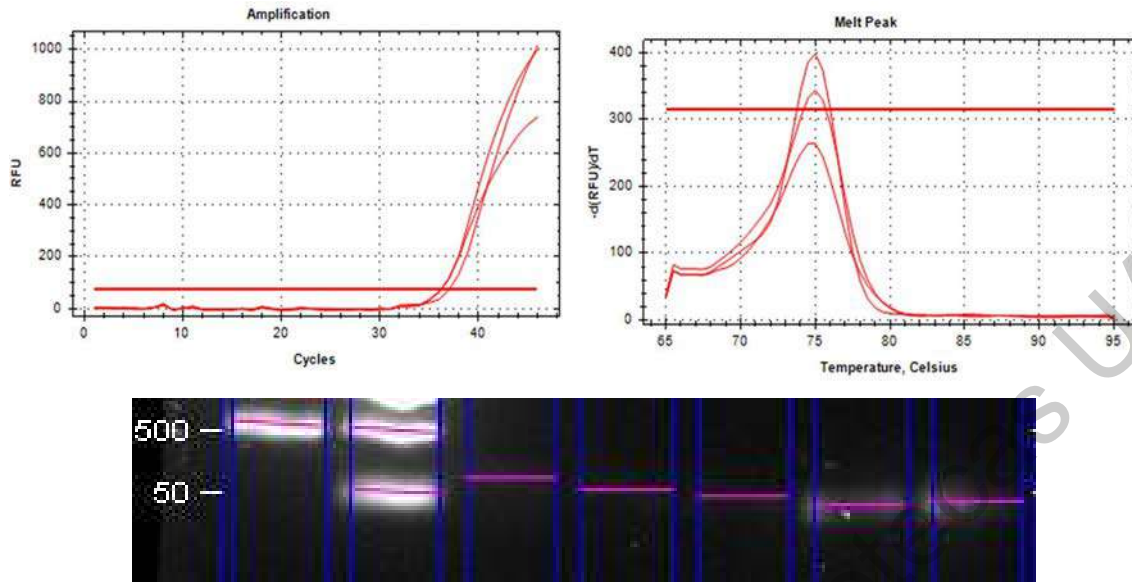


Figura 17. Amplificación exitosa de miR1917 por qPCR.

Arriba: Fluorescencia detectada usando oligonucleótidos diseñados y validados en este trabajo. Abajo: Producto de aproximadamente 53 pb.

Para el transcrito blanco CTR4sv3 también se realizó una matriz oligonucleótidos. En la Figura 18 se muestran los gráficos de fluorescencia para la amplificación usando una temperatura de alineamiento de 53.7 °C y concentración final de 900 nM para cada oligonucleótido, el adelantado y reversa. Se logro la amplificación y en valor de 79 °C.

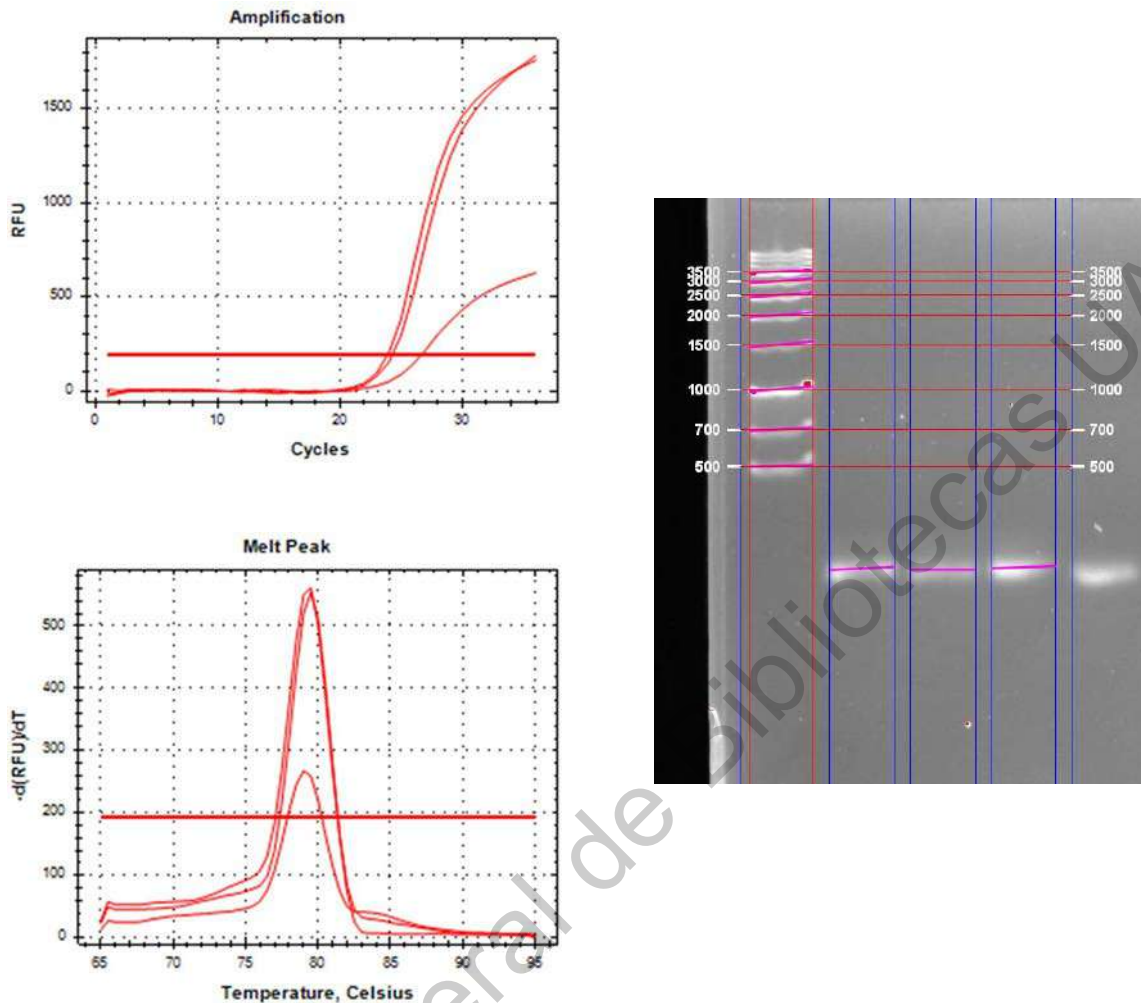


Figura 18. Amplificación exitosa de CTR4sv3 por qPCR.
Izquierda: Fluorescencia detectada usando oligonucleótidos diseñados y validados en este trabajo.

Se obtuvieron las condiciones óptimas para el análisis de expresión para miR1917 utilizando los oligonucleótidos nuevos, diseñados para este trabajo (temperatura de alineamiento de 60°C y concentración final de 450 nM y 150 nM para el adelantado y reversa, respectivamente), así como para CTR4sv3 (temperatura de alineamiento de 537 °C y concentración final de 900 nM para cada oligonucleótido, el adelantado y reversa). Así, fue posible usar dichas condiciones para conocer la dinámica de expresión del par miR1917-CTR4sv3 en tres estados de maduración de MT.

6.4.3 Análisis de expresión miR1917-CTR4sv3 durante la maduración de fruto de MT

En el análisis de expresión de miR1917, no se encontró diferencia significativa entre el estado GM y BR, pero sí con RR. Respecto al blanco CTR4sv3, éste se expresó con la misma intensidad durante los estados de desarrollo. Mientras la expresión del blanco coincide con lo reportado previamente, el pico de expresión de miR1917 fue muy agudo en RR mientras que en trabajos previos se manifiesta ese pico en BR (Wang et al., 2018), lo cual probablemente se deba a que en aquel estudio se trabajó con tomate Zhongshu 6 mientras que en el presente se usó MT, o bien, a que el criterio de selección del fruto en ambos casos fue visual, lo cual puede conducir a errores en la categorización del momento fisiológico en la toma de muestra.

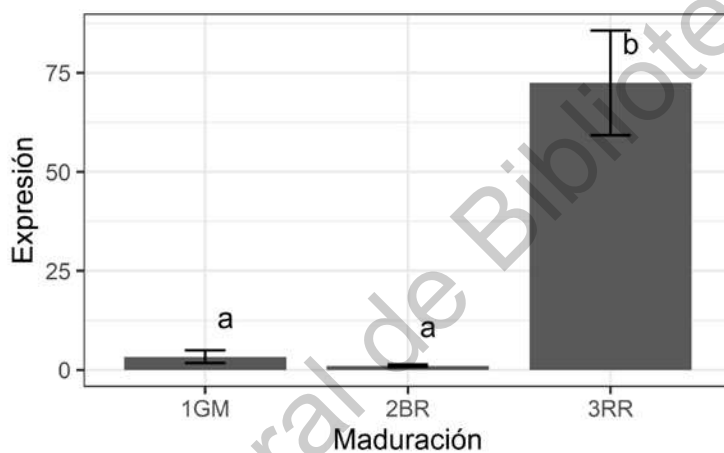


Figura 19. Análisis de expresión de miR1917 en tomate ($p < 0.001$)

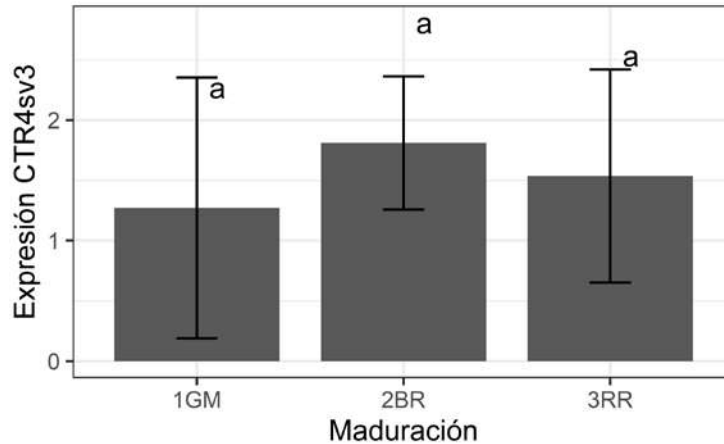


Figura 20. Análisis de expresión de CTR4sv3 en tomate ($p < 0.05$)

Hasta aquí, queda caracterizada la expresión del par miR1917-CTR4sv3, durante el proceso de maduración de fruto, lo cual confirma la presencia de ambas secuencias en MT. En el caso de miR1917, existe diferencia significativa en el nivel de su expresión en la madurez RR (valor $p < 0.001$). Sin embargo, la expresión de su blanco CTR4sv3 no es estadísticamente diferente durante la maduración del fruto, lo que significa que el nivel de expresión endógena de miR1917 no es suficiente para inducir el silenciamiento de su blanco. La sobreexpresión endógena de miR1917 durante la maduración de fruto de tomate que resulta insuficiente para el silenciamiento de su blanco es consistente con lo reportado por Wang et al. (2018), quienes posteriormente realizaron la transformación genética para lograr la sobreexpresión de miR1917 que si resultó en el silenciamiento de CTR4sv3, por ello se prosiguió a diseñar la estrategia para aplicación de sRNA con potencial interferente, mediante la mimesis del proceso de silenciamiento miR1917.

6.5 Diseño de RNA bicatenario con potencial interferente.

6.5.1 Criterios de diseño para las propuestas de RNA con potencial interferente: cantidad de nucleótidos (técnico)

El mecanismo de incorporación de RNA ambiental dentro de las células de plantas es un fenómeno poco dilucidado (Dubrovina y Kiselev, 2019), sin embargo, se conoce que la absorción debida a aplicaciones exógenas de RNA interferente sucede con oligonucleótidos

tan cortos como 21 (Dalakouras et al., 2016) y hasta 1483 nt (Tenllado y Díaz-Ruíz, 2001). De tal manera que existe versatilidad para trabajar con diferentes tamaños, desde sRNA hasta RNA largo no codificante (conocido como *long non-coding RNA*). En ese sentido y considerando la secuencia de miR1917 como molécula base para el diseño, se usó la longitud de 21 nt con coincidencia al sitio de interacción con su blanco, CTR4sv3.

6.5.2 Criterios de diseño para las propuestas de RNA con potencial interferente: cantidad de nucleótidos (económico)

Sin considerar costos por manejo de producto, envío, importación y otros cargos aduanales, el costo de la síntesis de RNA aumenta con la longitud del oligonucleótido en una razón aproximada de 10 dólares por nt para una concentración final de 160 nM de RNA, sin considerar los costos de manejo del producto (dato estimado para septiembre de 2020 con GenScript Hong Kong Limited). En consecuencia, la cantidad de nt es un valor que debería ser tomado en cuenta no solo con fines técnicos sino económicos en el desarrollo de tecnología.

6.5.3 Criterios de diseño para las propuestas de RNA con potencial interferente: modificaciones químicas

Se incluyeron modificaciones químicas con un monofosfato en el extremo 5' y 2'-O-metil en el extremo 3', las cuales no solo mimetizan el producto de la biogénesis de miRNAs en plantas (Bologna y Voinnet, 2014), sino que cuando se trabaja en solución acuosa neutra, les confieren estabilidad térmica para la dimerización de las moléculas de sRNA bicatenarias (Szabat y Kierzek, 2017).

6.5.4 Criterios de diseño para las propuestas de RNA con potencial interferente: empalme en moléculas bicatenarias

Las propuestas de diseño para la conformación de sRNA bicatenarios contaron con 2 nt protuberantes debido a que Ghosh et al. (2009) reportan que se requiere menor concentración de oligonucleótidos para inducir silenciamiento, en comparación con diseños de extremos romos, los cuales necesitan 1.5 veces más de moléculas, posiblemente debido a la velocidad de ensamble de sRNA en el complejo RISC.

6.5.5 Propuestas de diseño de RNA bicatenario con potencial interferente

Con estas consideraciones, se realizaron 4 diseños definidos aquí con números romanos del I al IV. En ese sentido, el II es la opción bicatenaria del I y el IV es la bicatenaria del III. Aunque el propósito de esta tesis es aplicar secuencias bicatenarias, aquí se presenta el análisis que incluye a las secuencias monocatenarias para enfatizar las potenciales desventajas que suponen estas últimas. Las características conceptuales para cada propuesta son las siguientes:

- I. sRNA monocatenario con secuencia idéntica a miR1917.
- II. Caso I bicatenario, que incluye hebra complementaria con dos nucleótidos protuberantes en el extremo 3'.
- III. sRNA monocatenario complementario al sitio interacción miR1917-CTR4sv3 con corrección de empalme en 21/21 nt.
- IV. Caso III bicatenario, que incluye hebra complementaria con dos nucleótidos protuberantes en el extremo 3'

6.5.6 Análisis de dimerización de sRNA

Se analizó la energía libre de Gibbs utilizando el software *RNAfold* para conocer la estabilidad de los dímeros de RNA (Mathews et al., 2004; Bernhart et al., 2006). En el caso de las secuencias monocatenarias I y III, se analizó el potencial de homodimerización (aa) y auto plegamiento (a); para las secuencias bicatenarias también se analizó el potencial de heterodimerización (ab), así como la homodimerización y auto plegamiento de la secuencia complementaria (bb y b, respectivamente).

Los resultados se muestran en la Tabla 13, en los que se destaca que para II y IV se presentan los valores más negativos, y por lo tanto, que tienen mayor estabilidad en la heterodimerización (ab) correspondiente al complejo bicatenario que deja sin unión a los 2 nt extremos, lo cual es similar a la estructura de siRNA (*small interfering RNA*; Lück et al., 2019).

Tabla 13. Secuencias y energía libre de Gibbs para homo y heterodimerización de RNA.

Diseño	Secuencias 5' → 3'	Energía libre en posible plegamiento de RNA (kcal mol ⁻¹)				
		ab	aa	bb	a	b
I	A: AUUAAUAAAGAGUGCUAAAGU	NA	-5.69¹	NA	-0.08	NA
II	A: AUUAAUAAAGAGUGCUAAAGU B: UUUAGCACUCUUUAUUAUUU	-24.20¹	-5.69	-2.10	-0.08	-0.03
III	C: AUUAAUAAAGAAUGCCAAAGA	NA	-1.66¹	NA	-0.02	NA
IV	C: AUUAAUAAAGAAUGCCAAAGA D: CUUGGCAUUCUUUAUUAUUU	-23.34¹	-1.66	-2.98	-0.02	-0.03

NA: No aplica

¹ plegamiento de RNA más estable.

De tal manera que en las opciones monocatenarias (I y III) existe la posibilidad de formar homodímeros, mientras que en las secuencias bicatenarias (II y IV) la dimerización más espontánea corresponde a la heterodimerización esperada desde diseño. De tal manera que si la dimerización más probable es la más negativa, en las secuencias bicatenarias el empalme provocaría un impedimento estérico en otras posibles dimerizaciones. En concordancia con este argumento, en la Figura 21 se muestra la predicción de los ensamblajes correspondientes a la dimerización más estable termodinámicamente (Mathews et al., 2004).

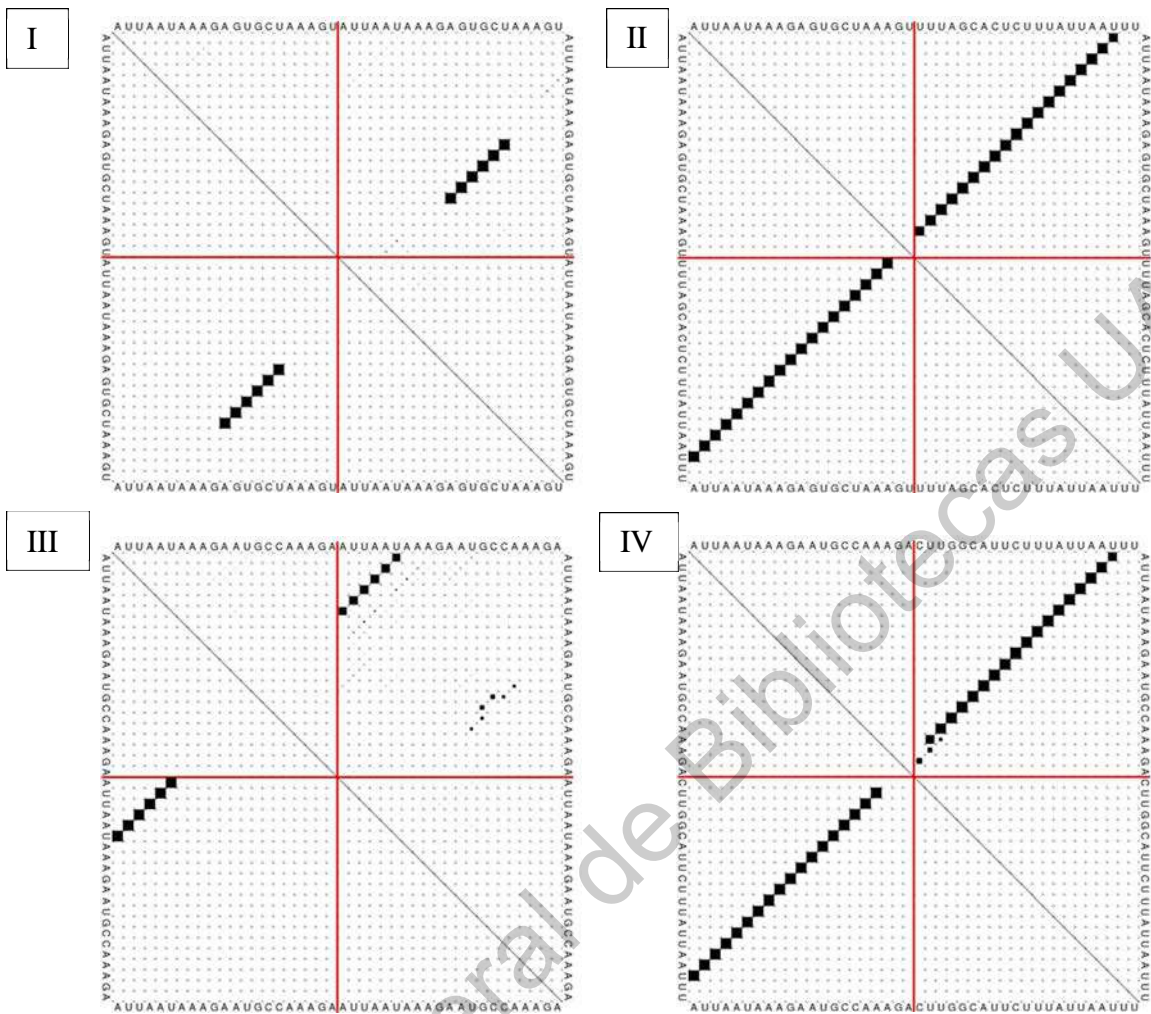


Figura 21. Predicción de la interacción de nucleótidos de acuerdo con la dimerización más estable estimada por *RNAfold*.

El uso de moléculas bicatenarias de sRNA reduce la posibilidad de generar plegamientos no deseados. En ese sentido, Dubrovina et al. (2020) han reportado un mayor efecto de silenciamiento en aplicación exógena de sRNA bicatenario que monocatenario en *Arabidopsis thaliana*, lo cual probablemente se deba a una mejora en la absorción o en la carga de la hebra guía en el complejo RISC.

6.5.7 Predicción de blancos y transcritos *off-target* por aplicación de sRNAs

Se analizó la posibilidad de que la o las secuencias de sRNA sintético provoquen silenciamiento sobre otros transcritos que no fueron considerados, mejor conocidos como *off-target* (Lück et al., 2019).

Para conocer las interacciones potenciales de esta naturaleza, se realizó un análisis de predicción de blancos usando el software *PsRNATarget V2* (Dai et al., 2018), con el cual se seleccionó la librería de cDNA de transcritos ITAG3.1 y se usaron los parámetros predeterminados (0.5 por par G:U, factor 1.5 de peso extra en la región semilla y máximo 2 emparejamientos discordantes en la misma región, 2 de penalidad por huecos en emparejamiento, 1 de penalidad por otros emparejamientos discordantes), únicamente con la variación del parámetro “Expectation” ≤ 2 . Esta modificación se debió a que el valor predeterminado es ≤ 4 resulta en la validación del 100% de las predicciones, pero con un costo de 50% de falsos positivos; sin embargo, al reducir el valor a 2, se detectaron 82.6 % de los blancos validados y un 26.9 % de potencial falsos positivos.

En la Tabla 14 se reportan los blancos detectados para cada construcción de sRNA. En todos los casos de sRNA con potencial interferente, no se detectaron transcritos *off-target*, sin embargo, en el límite del valor de expectativa (Expect. = 2) se encontró un potencial blanco no deseado para la hebra complementaria.

Tabla 14. Predicción de blancos para las secuencias para sRNAs.

Tipo de sRNA	Diseño	Expect.	Descripción	Función blanco
Interferente	I y II	1.0	CTR4	Transducción señal de etileno
		1.5	CTR3	
Complementario	II	2.0	Proteína NOD26-like 7.1 ¹	Canal de agua

Interferente	III y	0.0	CTR4	Transducción señal de etileno
	IV	0.5	CTR3	
Complementario	IV	2.0	Proteína SGT1	⁻²

¹ proteína anotada computacionalmente, existencia no validada
² sin función conocida ni estimada

De acuerdo con Sol Genomics Network, [CTR4](#) está relacionada con la transducción de señal de etileno, posee variantes corte-empalme y se expresa particularmente en hojas y frutos, lo cual corresponde con lo expuesto en este trabajo. Por otra parte, [CTR3](#) se expresa más en hoja que en fruto y, particularmente, durante la senescencia de la flor en anthesis. Luego, la función biológica de NOD26-like 7.1 ([SINIP7.1](#)) ha sido aproximada por métodos bioinformáticos, como parte de la familia de proteínas transmembrana con una posible función como acuaporina, sin embargo, su existencia y función no ha sido validada. Finalmente, mientras que SGT1 ([Solyc11g010660](#)) no tiene ninguna actividad estimada.

Por ello, existe fuerte evidencia de la interacción específica entre los blancos seleccionados y las secuencias propuestas. Por cuestión de economía, este trabajo se enfocó en el estudio del silenciamiento de un gen endógeno en tomate mediante la aplicación exógena de sRNA con potencial interferente. Así, las siguientes consideraciones quedaron fuera del alcance de esta tesis y será importante que se aborden en futuros estudios:

1. No se evaluaron las cuatro opciones de diseño, sino solo el IV, de acuerdo con la argumentación que se presenta más adelante.
2. No se evaluó la eficiencia de absorción ni la estabilidad de las secuencias sobre la superficie del tejido vegetal.
3. No se evaluó la diferencia en el efecto de silenciamiento entre una aplicación monocatenaria contra una bicatenaria.
4. No se analizó el transcrito Proteína SGT1 ni se evaluó la posible alteración de este por la interacción con el sRNA complementario.

La opción III y IV fueron las más favorables debido a que la hebra de sRNA con potencial interferente tiene el valor más favorable para silenciar CTR4. Aunque la opción III tendría menor potencial de silenciamiento *off-target* al no incluir otra secuencia de sRNA, el hecho de que esta sea una opción monocatenaria podría complicar su estabilidad ante la degradación e incluso su potencial de absorción, como lo han reportado Das y Sherif (2020), quienes describen que ésta es más eficiente cuando la secuencia se encuentra en cadena bicatenaria.

La opción IV tiene el valor de energía libre de Gibbs más negativo para la heterodimerización, lo que sugiere mayor posibilidad de generar una molécula bicatenaria de sRNA con potencial interferente, cuya estructura le conferiría mayor estabilidad y, como se describió previamente, mayor posibilidad de absorción en planta.

Por lo tanto, se seleccionó esta opción de diseño para su síntesis y evaluación en el proceso de silenciamiento postranscripcional. Así, en lo sucesivo, la secuencia de sRNA interferente se abrevia como R1 y si hebra complementaria, como R1*.

6.6 Síntesis y caracterización de R1, R1* y R1-R1*

6.6.1 Síntesis *in vitro* y características de R1 y R1*

Se sintetizaron aproximadamente 160 nmol de cada uno de los oligonucleótidos *in vitro* por GenScript USA, Inc. (agosto 2020), donde la purificación se realizó por HPLC y la identidad se analizó por espectrometría de masas (Figura 22 y Tabla 15).

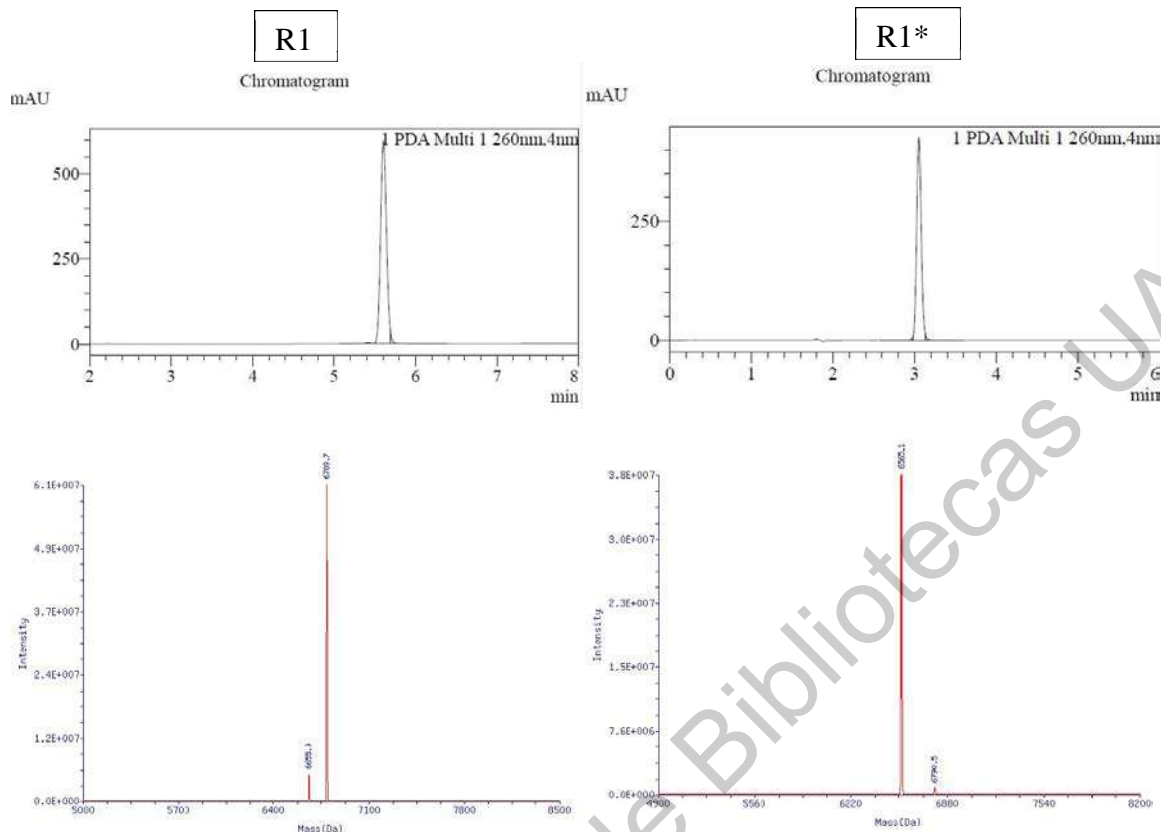


Figura 22. Cromatograma y espectro de masas de las secuencias de RNA sintético. Panel superior: área correspondiente a R1 con 97.838% de pureza reportada y a R1*, con 98.429%. Panel inferior: R1 con 6789.7 g mol⁻¹ y R1* con 6565.1 g mol⁻¹.

Tabla 15. Resumen de las características principales del RNA sintetizado *in vitro*.¹

Nombre	Secuencia	Pureza (%)	Peso molecular (g mol ⁻¹)	
			Teórico	Espectroscopia de masas
R1 (U2955FG150_7*)	5-rA*rUrU rArArU rArArA rGrArA rUrGrC rCrArA rArGmA -3	97.838	6789.26	6789.7
R1* (U2955FG150_8*)	5-rC*rUrU rGrGrC rArUrU rCrUrU rUrArU rUrArA rUrUmU-3	98.429	6564.91	6565.1

¹Ver Apéndice “Apéndice C: Certificado de Análisis por proveedor para RNA sintético.”

6.6.2 Preparación de soluciones de R1 y R1* con potencial interferente

Para la preparación de RNA en este trabajo, se siguió la metodología de Dubrovina et al. (2020), sin embargo se hace la corrección sobre la concentración de su trabajo. Los autores mencionados reportaron la hidratación individual de sRNA 1 y, en otro vial, de sRNA complementario, para alcanzar una concentración de $50 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$ en cada vial y luego, las soluciones se mezclaron en volúmenes iguales.

Este efecto es de dilución, por lo que la concentración final de cada hebra de sRNA resultó dividida en 2, es decir, de $25 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$ y no de $100 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$ que es lo que los autores reportan. Dicha solución de trabajo, donde se contienen $25 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$ de cada una de las dos secuencias de sRNAs, fue aplicada en un gradiente de concentración del 10-100% en un volumen de $100 \mu\text{L}$. Es decir que se aplicó un intervalo de concentración entre 250-2500 pmol de cada sRNA.

En el sistema que se propone en este trabajo, se consideró el estudio de un fruto cuya estructura esférica y cutícula supone complicaciones para la absorción, que son distintas a la del estudio en hojas de Dubrovina et al. (2020). Así, la introducción de un volumen de solución fue evaluado mediante inyección en el fruto y se encontró que los frutos de MT no pueden retener más de $5 \mu\text{L}$ (ver Apéndice D: Pruebas de retención de solución en fruto)

Para que el volumen que puede retener el fruto fuera igual a 2500 pmol, fue necesario hidratar el liofilizado a $500 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$. En la Tabla 16 se muestran las absorbancias y la concentración de la solución de trabajo, después de hidratar oligonucleótidos sintetizados por proveedor externo.

Tabla 16. Evaluación de la concentración de las soluciones de R1 y R1*

Oligo-nucleótido	ng μL^{-1}	Absorbancia					Concentración ($\text{pmol } \mu\text{L}^{-1}$)	
		260	280	230	260/280	260/230	Esperada	Real
R1	2644.00	3.31	2.99	2.96	1.11	1.12	500.00	389.41

R1* 2642.40 3.30 2.94 2.51 1.12 1.32 500.00 402.49

La concentración resultó por debajo del valor esperado, provocando que para una aplicación de 5 μL habría aproximadamente 1947 pmol, lo cual se encuentra dentro del intervalo validado en experimentos similares (Tabla 17).

Tabla 17. Comparación del rango de la masa de RNA aplicada

Oligonucleótido	Masa (pmol)	Vol. Aplicado (μL)
Dubrovina et al. (2020) concentración máx.	2500	100
Objetivo	2500	5
R1	1947.07	5
R1*	2012.46	5
Dubrovina et al. (2020) concentración min.	250	100

Con estos cálculos y consideraciones, se procedió a producir las condiciones y evaluar la estructura bicatenaria R1-R1* para concentración final es $389.41 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$ para liberar 1947 pmol de cada hebra de sRNA.

6.6.3 Evaluación de formación de sRNA bicatenario

Se evaluó el empalme de hebras en una molécula de sRNA bicatenario usando una curva de temperatura de fusión entre R1 y R1*, con SYBR Gold como colorante. Para ello, R1 y R1* se llevaron a una concentración de $100 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ cada uno, por separado y luego se preparó una solución 1:1 de ambas secuencias. Se utilizaron 10 μL de esta última solución y se

agregaron 5 μL de SYBR Gold 1x para ser evaluada en CFX Manager BioRad, comprobando la dimerización.

De acuerdo con el procedimiento de formación de la molécula bicatenaria, se debe calentar la mezcla a 90°C y en el descenso de temperatura las secuencias de sRNA se alinean y empalman. En la Figura 23A se muestra el pico en 89°C , lo que sugiere que el tratamiento de empalme es suficiente para la dimerización del complejo bicatenario R1-R1*. Por otro lado, en la Figura 23B se observan diferentes intensidades cuando se tiene una mezcla de R1, R1* y R1-R1*.

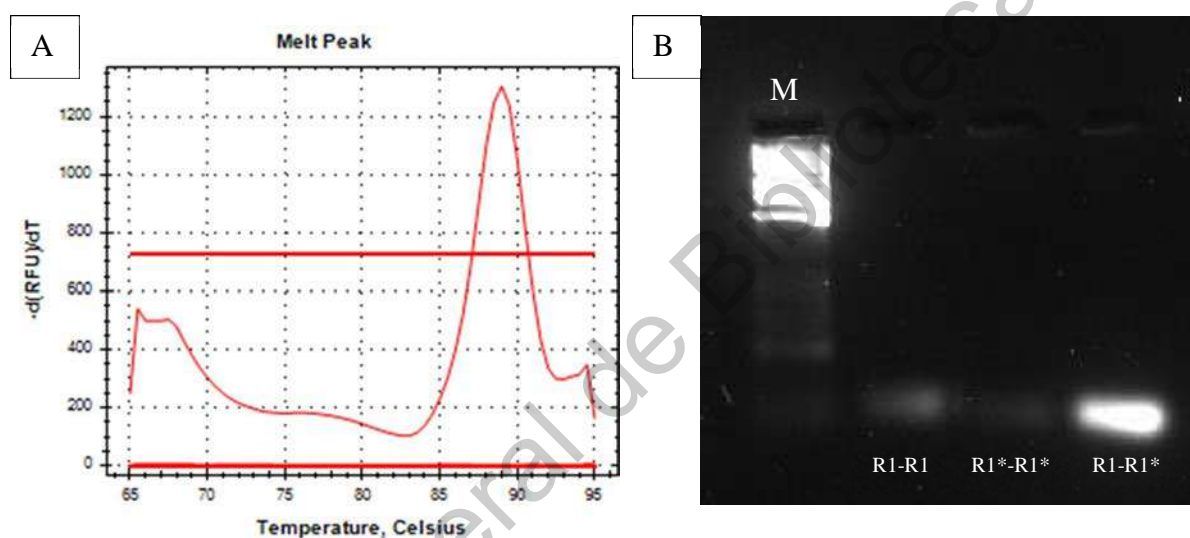


Figura 23. Dimerización de complejo bicatenario R1-R1*.

A: curva de temperatura de fusión iniciando a 65°C e incrementando 0.5°C por minuto hasta alcanzar los 95°C en un equipo CFX96. **B:** Electroforesis en gel al 4% de agarosa para detectar RNA de aproximadamente 21 nt. M. marcador de peso molecular con la banda más ligera de 500 pb. R1-R1. homodimerización de energía libre $-1.66\text{ kcal mol}^{-1}$. R1*-R1*. Homodimerización, $-1.66\text{ kcal mol}^{-1}$. R1-R1*. Heterodimerización $-23.34\text{ kcal mol}^{-1}$.

6.7 Aplicación de sRNA bicatenario y potencial acción interferente en fruto

6.7.1 Evaluación del silenciamiento de CTR4sv3 24 horas postratamiento.

Se seleccionaron frutos en tres diferentes estados de maduración, de aproximadamente el mismo diámetro, para la aplicación de $5\ \mu\text{L}$ que contenían 1947 pmol de una molécula bicatenaria de sRNA, formada por las secuencias R1-R1*, por inyección directa. Como

tratamiento control se aplicó el mismo volumen de agua estéril y libre de nucleasas. El análisis se hizo por triplicado.

Después de 24 h de la aplicación del tratamiento, se realizó la extracción de RNA y los rangos de las relaciones de absorbancia se reportan en la Tabla 18 y los resultados completos están en el Apéndice B: Absorbancias y concentración de todos de todos los experimentos.

Tabla 18. Extracción de RNA, 24 h postratamiento: rango del diámetro y relaciones de absorbancia

Maduración	Aplicación	Diámetro	Abs.	Abs.	ng μL^{-1}
			260/230	260/280	
GM	Agua	17.3-18.1	1.78-1.83	0.81-0.95	268-424
GM	dsRNA	18.6-19.2	1.84-1.92	0.88-1.61	388.8-492
BR	Agua	14.3-14.5	1.83-1.89	0.18-0.88	128.8-157.6
BR	dsRNA	15.1-17.8	1.81-2.01	0.45-0.66	200.8-257.6
RR	Agua	17.2-19.7	1.56-1.69	0.24-0.29	309.6-322.4
RR	dsRNA	14.2-16.8	1.79-1.93	0.33-0.64	212.8-257.6

Para el análisis de expresión del transcrito blanco, es decir de CTR4sv3, para lo cual se utilizó como calibrador el tratamiento con agua para cada nivel de maduración. En la Figura 24 se presenta el resultado gráfico de la expresión con su correspondiente desviación estándar. Se realizó la prueba de ANOVA y se obtuvo un valor $p = 0.309$, por lo que no se encontró diferencia significativa por la aplicación de sRNA bicatenario en los diferentes estados de maduración de fruto.

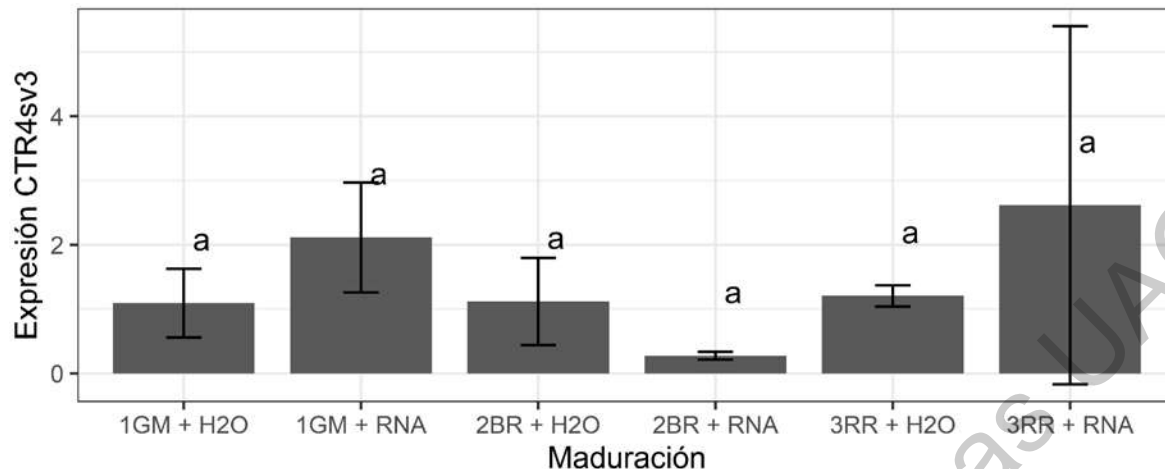


Figura 24. Expresión de CTR4sv3 por la inyección de sRNA o H2O, en fruto GM, BR y RR.

Desde esta perspectiva, no hay justificación estadística para analizar las medias, pero si la desviación estándar. El simple efecto de la inyección como daño mecánico pudo generar un estrés, que habría sucedido en todas los frutos, pues la diferencia fue la sustancia con la cual se inyectó. En ese sentido, se realizó ANOVA únicamente para los tratamientos con agua y se obtuvo un valor $p = 0.960$, y para únicamente los tratamientos con sRNA se obtuvo un valor $p = 0.274$.

Otra posible fuente de variación es el método de aplicación, ya que al ser por inyección podría haber diferencias considerables entre cada una de las aplicaciones, provocando estrés distinto. La experiencia de quien aplica es importante para mantener con la menor fuente de variación el tratamiento en el que se tiene que hacer un daño mecánico: la velocidad de introducción de la jeringa, la profundidad en la que se mantiene la jeringa dentro del fruto, la fuerza con la que se introduce ante diferente turgencia en el tejido.

Otra posibilidad es que la difusión del sRNA bicatenario y su efecto de silenciamiento sucedan con diferente velocidad en tejidos con madurez distinta.

De tal manera que se realizó un nuevo experimento donde se realizó la misma aplicación con agua y sRNA bicatenario, pero se mantuvo el tratamiento por 72 h, momento en que se realizó la extracción de RNA. Debido a la cantidad de sRNA sintético disponible, únicamente se

trabajó con el estado de maduración GM. El motivo de la selección de este nivel de maduración se debió a que, si se espera que la aplicación de sRNA bicatenario promueva la maduración, en GM se tendría mayor confianza de que se debió al tratamiento y no a un error en la selección del fruto y que este pudiera estar en un grado más avanzado de maduración.

6.7.2 Evaluación del silenciamiento de CTR4sv3 en GM, 72 horas postratamiento.

Se seleccionaron frutos en maduración GM, de aproximadamente el mismo diámetro, para la aplicación de 5 μ L que contenían 1947 pmol de una molécula bicatenaria de sRNA, formada por las secuencias R1-R1*, por inyección directa. Como tratamiento control se aplicó el mismo volumen de agua estéril y libre de nucleasas. El análisis se hizo por triplicado y se mantuvo en condiciones controladas, como se describe en metodología, por 72 h.

Para este experimento se analizó la pérdida de peso, la cual resultó de un 7.72% para el tratamiento con inyección de agua y de 8.12% para el tratamiento de sRNA bicatenario. Al realizar la prueba ANOVA se encontró que no existía diferencia significativa en esta variable (valor $p = 0.939$, Figura 25).

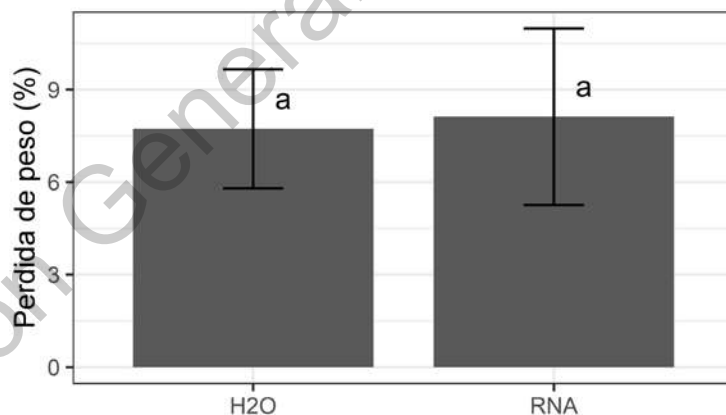


Figura 25. Pérdida de peso en tratamiento por 72 h

Después de obtener medir la masa final, se realizó la extracción de RNA con una diferencia relevante en el protocolo, pues se sometió a un proceso de purificación adicional usando cloruro de litio para una concentración final de 3M, lo cual mejoró de manera muy importante en la calidad del material genético. Los rangos de las relaciones de absorbancia se reportan en la Tabla 19 y los resultados completos están en el Apéndice B: Absorbancias y concentración de todos de todos los experimentos.

Tabla 19. Extracción de RNA, 72 h postratamiento: rango del diámetro y relaciones de absorbancia

Tratamiento	Diámetro (mm)	Abs. 260/230	Abs. 260/280	ng μL-1
Agua	16.5-17.0	2.15-2.26	2.10-2.12	435.84-560.72
dsRNA	16.8-17.0	1.62-2.34	1.93-2.11	66.64-781.04

Para el análisis de expresión del transcrito blanco, es decir de CTR4sv3, para lo cual se utilizó como calibrador el tratamiento con agua para cada nivel de maduración. En la Figura 24 se presenta el resultado gráfico de la expresión con su correspondiente desviación estándar. Se realizó la prueba de ANOVA y se obtuvo un valor $p = 0.0188$, por lo que se encontró diferencia significativa por la aplicación de sRNA bicatenario en 72 h para GM. Al realizar la prueba de Tukey se obtuvo el valor $p = 0.0188$ para la diferencia de sus medias, lo cual se puede observar en la Figura 26.

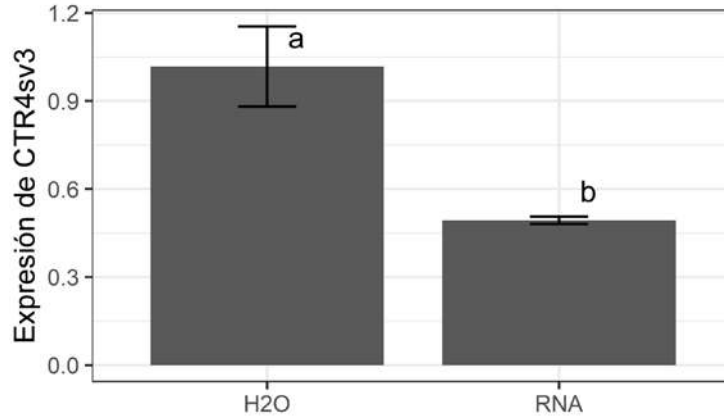


Figura 26. Expresión de CTR4sv3 debido a la aplicación de sRNA bicatenario, en GM 72 h
Las barras representan el error estándar y los valor a y b, corresponden a la prueba de Tukey con un
valor de corte $p < 0.05$

En comparación con el experimento en donde se dejaron los frutos en reposo 24 h posterior a la aplicación de agua o sRNA bicatenario, en 72 h sí se encontró diferencia significativa con una reducción de 48% en la expresión de CTR4sv3. Debido a que el tiempo del tratamiento fue triplicado con respecto a la prueba previa, probablemente en este periodo atenuó del estrés inducido por la inyección, lo cual podría resultar en reducir una especie de efecto de enmascaramiento, del estrés sobre el tratamiento. Además, probablemente en este periodo incremento la posibilidad de absorción de la moléculas de sRNA bicatenario y posterior carga en el complejo RISC para silenciar el blanco correspondiente. Sin embargo, se deberán conducir nuevos estudios sobre el tiempo necesario para detectar silenciamiento del blanco correspondiente y así, encontrar si hay un periodo necesario para disparar el mecanismo de silenciamiento, así como indagar sobre las condiciones para mejorar la absorción.

Ju et al. (2012) indican que en *A. thaliana*, cuando no hay etileno presente a nivel celular, CTR1 fosforila EIN2; sin embargo, cuando esta fitohormona se presenta, CTR1 se inactiva y EIN2 sufre un corte que se trasloca al núcleo donde activa genes respuesta a etileno (Figura 27). De acuerdo Wang et al. (2018), principal referencia en este trabajo, tomate transgénico sobre expresante de miR1917 resulta en el silenciamiento de CTR4sv3. Este fenómeno

coincide con los resultados reportados en este trabajo, sin embargo, aquí se presenta otra metodología para lograr dicho silenciamiento sin necesidad de hacer una planta transgénica. De acuerdo con los autores mencionados, el silenciamiento de CTR4sv3 resulta en la sobreexpresión de genes relacionados con la percepción de etileno, incluido EIN2; también de genes de la ruta de biosíntesis de etileno.

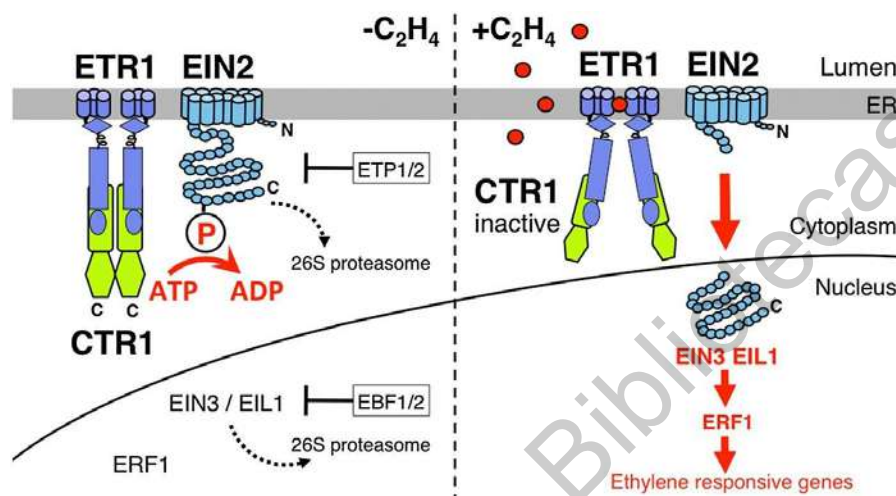


Figura 27. Modelo de señalización por etileno.
Imagen tomada de Ju et al. (2012)

Por otro lado, Li et al. (2019) indica que la síntesis de etileno sucede en dos sistemas, el sistema I es autoinhibitoria mientras que el el II es autocatalítica, es decir que su biosíntesis se ve retroalimentado de manera positiva. Para que suceda la síntesis de etileno en el sistema II, es necesaria la participación de genes como ACS2 y 4, así como ACO1 y ACO3 (Figura 28) aunque Liu et al. (2015) se señala ACO1 como los principales genes de producción de etileno asociado a la maduración de fruto.

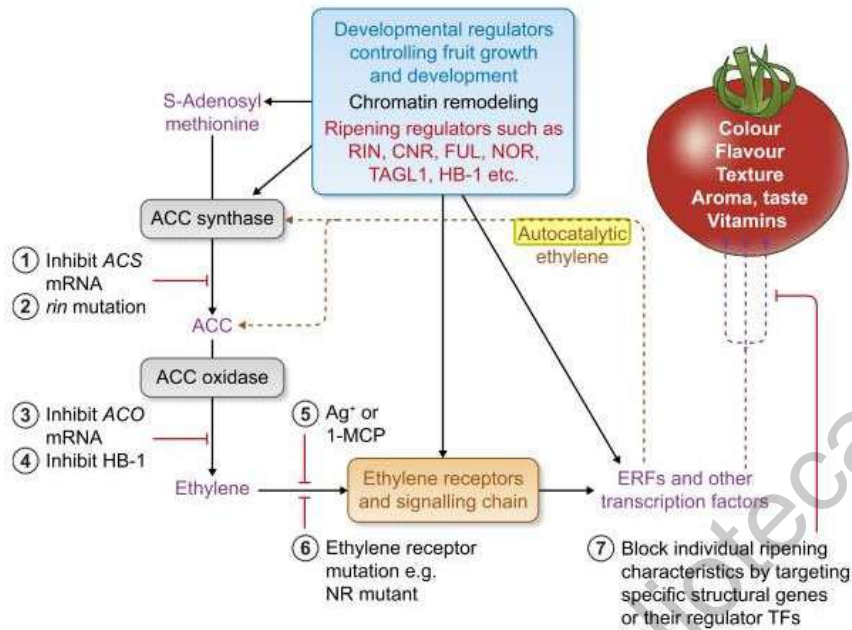


Figura 28. Regulación de la maduración de fruto de tomate.
Imagen tomada de Li et al. (2019)

De tal manera que para conocer si el silenciamiento de CTR4sv3 por la aplicación de sRNA bicatenario tendría repercusión en otros genes relacionados con la percepción de etileno y principalmente, si tendría un efecto sobre la síntesis de etileno debido a genes relacionados específicamente con el sistema 2. Así que se seleccionaron los genes EIN2 y ACO1.

En la prueba ANOVA para la expresión de EIN2 se obtuvo un valor $p = 0.0984$ por lo que la diferencia entre los tratamientos no fue significativa (valor de corte de $p < 0.05$) por la aplicación de sRNA bicatenario en 72 h para GM (Figura 29).

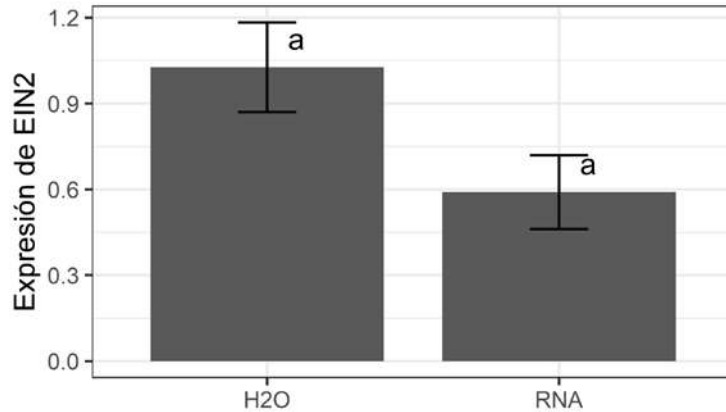


Figura 29. Expresión de EIN2 por la aplicación de sRNA bicatenario, en GM 72 h
Las barras representan el error estándar. Valor de corte $p < 0.05$

En la prueba ANOVA para la expresión de ACO1 resultó que la expresión fue estadísticamente diferente entre los tratamientos para GM 72 h (valor $p = 0.0388$), incrementando más de 4 veces la expresión del transcrito.

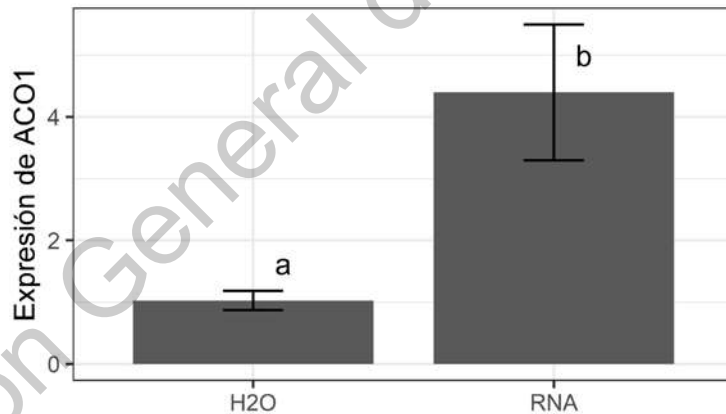


Figura 30. Expresión de ACO1 por la aplicación de sRNA bicatenario, en GM 72 h
Las barras representan el error estándar. Valor de corte $p < 0.05$

Si bien, el silenciamiento de CTR4sv3 no provocó un aumento significativo en la expresión de EIN2, sí tuvo un efecto muy importante en la sobreexpresión de ACO1. Lo anterior sugiere

que conceptualmente, el diseño de unas moléculas bicatenarias con potencial interferente si provocan el silenciamiento de un gen endógeno e incluso, que corriente abajo pueden generar cambios sensibles en una ruta molecular.

7. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se logró generar el silenciamiento de un gen relacionado con la síntesis de etileno en una planta de tomate. Los resultados coinciden con otros reportados previamente, en los cuales se utilizaron plantas transgénicas para generar un cambio similar, usando la sobreproducción del precursor de miR1917. Aquí, se diseñó una estrategia mediante la mimesis del fenómeno que sucede en plantas de tomate, que se ha logrado agudizar usando tecnología transgénica y que se confirmó como un proceso similar en el silenciamiento de genes endógenos, sin el uso de material vegetal transgénico.

Es necesario indagar sobre varias preguntas en el fenómeno estudiado, por ejemplo, el efecto dosis respuesta, el tiempo necesario para generar cambios en la dinámica molecular, los mecanismos de absorción, el efecto en la aplicación en planta, los métodos de exposición al sRNA bicatenario, la posibilidad de generar cambios visibles e identificables con la maduración, la estabilidad de la molécula en el tiempo, el efecto que tendría en animales por su ingesta y las posibles repercusiones al medio ambiente.

Aunque quedan muchas interrogantes, se tienen elementos para aceptar la hipótesis, pues la aplicación exógena de RNA bicatenario, sintético y complementario a CTR4sv3, que es un transcrito relacionado con la biosíntesis de etileno en tomate, produce cambios en la expresión de ACO1, que es indispensable para el desarrollo y maduración de fruto. Además, en este trabajo queda presente una línea de investigación, pues se presentan diferentes miRNAs en tomate y sus blancos relacionados, así como el fenotipo que se espera por la sobreexpresión de estos.

8. REFERENCIAS

Bartel, D. P. 2004. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*. 116:281–297. doi:10.1016/S0092-8674(04)00045-5.

Bi, F., X. Meng, C. Ma, and G. Yi. 2015. Identification of miRNAs involved in fruit ripening in Cavendish bananas by deep sequencing. *BMC Genomics*. 16:776. doi:10.1186/s12864-015-1995-1. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/16/776>

Budak, H., and B. A. Akpinar. 2015. Plant miRNAs: biogenesis, organization and origins. *Funct. Integr. Genomics*. 15:523–531. doi:10.1007/s10142-015-0451-2.

Budak, H., R. Bulut, M. Kantar, and B. Alptekin. 2016. MicroRNA nomenclature and the need for a revised naming prescription. *Brief. Funct. Genomics*. 15:65–71. doi:10.1093/bfgp/elv026.

Cao, D., J. Wang, Z. Ju, Q. Liu, S. Li, H. Tian, D. Fu, H. Zhu, Y. Luo, and B. Zhu. 2016. Regulations on growth and development in tomato cotyledon, flower and fruit via destruction of miR396 with short tandem target mimic. *Plant Sci*. 247:1–12. doi:10.1016/j.plantsci.2016.02.012. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.02.012>

Carra, A., E. Mica, G. Gambino, M. Pindo, C. Moser, M. E. Pè, and A. Schubert. 2009. Cloning and characterization of small non-coding RNAs from grape. *Plant J*. 59:750–763. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03906.x.

Cherian, S., C. R. Figueroa, and H. Nair. 2014. ‘Movers and shakers’ in the regulation of fruit ripening: a cross-dissection of climacteric versus non-climacteric fruit. *J. Exp. Bot*. 65:4705–4722. doi:10.1093/jxb/eru280.

Crick, F. 1970. Central Dogma of Molecular Biology. *Nature*. 227:561–563. doi:10.1038/227561a0. Available from: <https://doi.org/10.1038/227561a0>

Dubrovina, A. S., O. A. Aleynova, A. R. Suprun, Z. V. Ogneva, and K. V. Kiselev. 2020. Transgene suppression in plants by foliar application of in vitro-synthesized small interfering RNAs. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 104:2125–2135. doi:10.1007/s00253-020-10355-y. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-020-10355-y>

Gallusci, P., C. Hodgman, E. Teyssier, and G. B. Seymour. 2016. DNA Methylation and

Chromatin Regulation during Fleshy Fruit Development and Ripening. *Front. Plant Sci.* 7:807. doi:10.3389/fpls.2016.00807.

Guo, L., J. Yu, H. Yu, Y. Zhao, S. Chen, C. Xu, and F. Chen. 2015. Evolutionary and Expression Analysis of miR-#-5p and miR-#-3p at the miRNAs/isomiRs Levels. *Biomed Res. Int.* 2015. doi:10.1155/2015/168358.

Ha, M., and V. N. Kim. 2014. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15:509–524. doi:10.1038/nrm3838. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25027649>

He, D., J. Wang, Y. Lu, Y. Deng, C. Zhao, L. Xu, Y. Chen, Y.-C. Hu, W. Zhou, and Q. R. Lu. 2017. lncRNA Functional Networks in Oligodendrocytes Reveal Stage-Specific Myelination Control by an lncOL1/Suz12 Complex in the CNS. *Neuron.* 93:362–378. doi:<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.11.044>. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627316309126>

He, Q., Y. Liu, and W. Sun. 2018. Statistical analysis of non-coding RNA data. *Cancer Lett.* 417:161–167. doi:<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.12.029>. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383518300028>

Jagadeeswaran, G., P. Nimmakayala, Y. Zheng, K. Gowdu, U. K. Reddy, and R. Sunkar. 2012. Characterization of the small RNA component of leaves and fruits from four different cucurbit species. *BMC Genomics.* 13:329. doi:10.1186/1471-2164-13-329. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3431224&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Ju, C., G. Mee, J. Marie, D. Y. Lin, Z. I. Ying, J. Chang, W. M. Garrett, M. Kessenbrock, G. Groth, M. L. Tucker, B. Cooper, and J. J. Kieber. 2012. CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in *Arabidopsis*. doi:10.1073/pnas.1214848109/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1214848109.

Kim, D.-H., Y. Xi, and S. Sung. 2017. Modular function of long noncoding RNA,

COLDAIR, in the vernalization response. *PLOS Genet.* 13:e1006939. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006939>

Koch, A., D. Biedenkopf, A. Furch, L. Weber, O. Rossbach, E. Abdellatef, L. Linicus, J. Johannsmeier, L. Jelonek, A. Goesmann, V. Cardoza, J. McMillan, T. Mentzel, and K.-H. Kogel. 2016. An RNAi-Based Control of *Fusarium graminearum* Infections Through Spraying of Long dsRNAs Involves a Plant Passage and Is Controlled by the Fungal Silencing Machinery. S. P. Dinesh-Kumar, editor. *PLOS Pathog.* 12:e1005901. doi:10.1371/journal.ppat.1005901. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1005901>

Lee, R. C., R. L. Feinbaum, and V. Ambros. 1993. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell.* 75:843–854. doi:10.1016/0092-8674(93)90529-Y.

Li, H., Z. Zhang, F. Huang, L. Chang, and Y. Ma. 2009. MicroRNA expression profiles in conventional and micropropagated strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.) plants. *Plant Cell Rep.* 28:891–902. doi:10.1007/s00299-009-0693-3.

Li, S., K. Chen, and D. Grierson. 2019. A critical evaluation of the role of ethylene and MADS transcription factors in the network controlling fleshy fruit ripening. *New Phytol.* 1724–1741. doi:10.1111/nph.15545.

Liu, M., J. Pirrello, C. Chervin, J.-P. Roustan, and M. Bouzayen. 2015. Ethylene Control of Fruit Ripening: Revisiting the Complex Network of Transcriptional Regulation. *Plant Physiol.* 169:2380–2390. doi:10.1104/pp.15.01361. Available from: <http://www.plantphysiol.org/content/169/4/2380>

Liu, Y., L. Wang, D. Chen, X. Wu, D. Huang, L. Chen, L. Li, X. Deng, and Q. Xu. 2014. Genome-wide comparison of microRNAs and their targeted transcripts among leaf, flower and fruit of sweet orange. *BMC Genomics.* 15:695. doi:10.1186/1471-2164-15-695. Available from: <http://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-15-695>

Liu, Z., and R. G. Franks. 2015. Molecular basis of fruit development. *Front. Plant Sci.* 6:1–3. doi:10.3389/fpls.2015.00028.

Liu, Z., Y. Zhang, L. Ou, L. Kang, Y. Liu, J. Lv, G. Wei, B. Yang, S. Yang, W. Chen, X. Dai, X. Li, S. Zhou, Z. Zhang, Y. Ma, and X. Zou. 2017. Identification and characterization of novel microRNAs for fruit development and quality in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). *Gene*. 608:66–72. doi:10.1016/j.gene.2017.01.020. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28122266> <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111917300422>

Lück, S., T. Kreszies, M. Strickert, P. Schweizer, M. Kuhlmann, and D. Douchkov. 2019. siRNA-Finder (si-Fi) Software for RNAi-Target Design and Off-Target Prediction. *Front. Plant Sci.* 10:1–12. doi:10.3389/fpls.2019.01023.

Palma, J. M., F. J. Corpas, and L. A. del Río. 2011. Proteomics as an approach to the understanding of the molecular physiology of fruit development and ripening. *J. Proteomics*. 74:1230–1243. doi:10.1016/j.jprot.2011.04.010. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2011.04.010>

Rosas-Cárdenas, F. D. F., J. Caballero-Pérez, X. Gutiérrez-Ramos, N. Marsch-Martínez, A. Cruz-Hernández, and S. de Folter. 2015. miRNA expression during prickly pear cactus fruit development. *Planta*. 241:435–448. doi:10.1007/s00425-014-2193-0. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00425-014-2193-0>

Seymour, G. and epigenetics of fruit development and ripening, M. Poole, K. Manning, and G. J. King. 2008. Genetics and epigenetics of fruit development and ripening. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11:58–63. doi:10.1016/j.pbi.2007.09.003.

Seymour, G. B., L. Østergaard, N. H. Chapman, S. Knapp, and C. Martin. 2013. Fruit Development and Ripening. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64:219–241. doi:10.1146/annurev-arplant-050312-120057. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-arplant-050312-120057>

Taiz, L., and E. Zeiger. 2002. *Plant Physiology*. Third edit. Sinauer Associates, Inc.,

Publisher, Sunderland, Massachusetts.

Vaz, C., H. M. Ahmad, R. Bharti, P. Pandey, L. Kumar, R. Kulshreshtha, and A. Bhattacharya. 2013. Analysis of the microRNA transcriptome and expression of different isomiRs in human peripheral blood mononuclear cells. *BMC Res. Notes.* 6:390. doi:10.1186/1756-0500-6-390. Available from:

<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84884627102&partnerID=tZOtx3y1>

Visser, M., A. P. van der Walt, H. J. Maree, D. J. G. Rees, and J. T. Burger. 2014. Extending the sRNAome of apple by next-generation sequencing. S. Maas, editor. *PLoS One.* 9:1–10. doi:10.1371/journal.pone.0095782. Available from:

<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0095782>

Wang, M., and H. Jin. 2017. Spray-Induced Gene Silencing: a Powerful Innovative Strategy for Crop Protection. *Trends Microbiol.* 25:4–6. doi:10.1016/j.tim.2016.11.011. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2016.11.011>

Wang, M., N. Thomas, and H. Jin. 2017. Cross-kingdom RNA trafficking and environmental RNAi for powerful innovative pre- and post-harvest plant protection. *Curr. Opin. Plant Biol.* 38:133–141. doi:10.1016/j.pbi.2017.05.003. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2017.05.003>

Wang, Yunxiang, L. Gao, J. Li, B. Zhu, H. Zhu, and Y. Luo. 2018. Analysis of long-non-coding RNAs associated with ethylene in tomato. *Gene.* 674:151–160. doi:10.1016/j.gene.2018.06.089. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.06.089>

Wang, Yanling, W. Zou, Y. Xiao, L. Cheng, Y. Liu, S. Gao, and Z. Shi. 2018. MicroRNA1917 targets CTR4 splice variants to regulate ethylene responses in tomato. *J. Exp. Bot.* 69:1011–1025. doi:10.1093/jxb/erx469.

Waterhouse, P. M., and R. P. Hellens. 2015. Coding in non-coding RNAs. *Nature.* 520:41. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature14378>

Wu, J., D. Wang, Y. Liu, L. Wang, X. Qiao, and S. Zhang. 2014. Identification of miRNAs

involved in pear fruit development and quality. *BMC Genomics*. 15:953. doi:10.1186/1471-2164-15-953. Available from:

<http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-15-953>

Yu, H., C. Song, Q. Jia, C. Wang, F. Li, K. K. Nicholas, X. Zhang, and J. Fang. 2011. Computational identification of microRNAs in apple expressed sequence tags and validation of their precise sequences by miR-RACE. *Physiol. Plant*. 141:56–70. doi:10.1111/j.1399-3054.2010.01411.x. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-3054.2010.01411.x>

Zhang, B., X. Pan, G. P. Cobb, and T. A. Anderson. 2006. Plant microRNA: A small regulatory molecule with big impact. *Dev. Biol*. 289:3–16. doi:10.1016/j.ydbio.2005.10.036.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

9. Apéndices

9.1 Apéndice A: Resumen de oligonucleótidos utilizados

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Referencia
Actina	Adelantado CTTTGCCGCATGCCATTCTT	Nuevo ¹
	Retrasado CGGAACCTCTCAGCACCAAT	
U6	Adelantado CATCCGATAAAATTGGAACGA	Wang et al. (2016)
	Retrasado TTTGTGCGTGTCATCCTTGCG	
miR1917	Retrotranscripción GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCG ACCAGAGCCAACAACCTTTA	Nuevo ²
	Adelantado GTTGGGGATTAATAAAGAGTG Retrasado GTGCAGGGTCCGAGGT	
CTR4sv3	Adelantado AGGGTATGAGGCTTGAAATTCC	Wang et al. (2016)
	Retrasado TATGAGCGGTTTCAACATATCCAT	
EIN2	Adelantado CTCAACCGTCTTCAGGGCATAG	Wang et al. (2016)
	Retrasado GTGGCGGCAAGTTTCCATTAG	
ACO1	Adelantado ACAAACAGACGGGACACGAA	Wang et al. (2016)
	Retrasado CTCTTTGGCTTGAACTTGA	

1 Primer-BLAST específico para secuencia de actina de MT Ref seq: FJ532351.1

9.2 Apéndice B: Absorbancias y concentración de todos de todos los experimentos

Tabla 20. Resultados de absorbancia a 230, 260 y 280 nm para análisis de expresión de miR1917-CTR4sv3

Madurez	A230	A260	A280	Abs. 260/280	Abs. 260/230	ng μL^{-1}
GM	10.28	2.3316	1.66	1.404578	0.226809	93.264
GM	12.46	7.3	4.3	1.697674	0.585875	292
GM	15.18	10.36	5.64	1.836879	0.682477	414.4
BR	18.02	6.38	4.32	1.476852	0.354051	255.2
BR	15.04	6.18	3.92	1.576531	0.410904	247.2
BR	16.7	7.42	3.95	1.878481	0.444311	296.8
RR	12.3	5.92	3.64	1.626374	0.481301	236.8
RR	52.76	7.64	5.3	1.441509	0.144807	305.6
RR	3.16	1.98	2.04	0.970588	0.626582	79.2


Tabla 21. Diámetro y resultados de absorbancia de la extracción de RNA en el tratamiento de 24 h

Maduración	Aplicación	Diámetro	Absorbancia					ng μL^{-1}
			260	230	280	260/230	260/280	
GM	Agua	17.3	10.6	5.78	11.1	1.83	0.95	424
GM	Agua	18.1	6.7	3.76	8.3	1.78	0.81	268
GM	dsRNA	19.2	9.72	5.28	11.02	1.84	0.88	388.8
GM	dsRNA	18.6	12.3	6.4	7.66	1.92	1.61	492
BR	Agua	14.3	3.94	2.08	4.48	1.89	0.88	157.6
BR	Agua	14.5	3.22	1.76	17.46	1.83	0.18	128.8
BR	dsRNA	15.1	6.44	3.56	14.4	1.81	0.45	257.6
BR	dsRNA	17.8	5.02	2.5	7.58	2.01	0.66	200.8
RR	Agua	19.7	7.74	4.58	26.26	1.69	0.29	309.6
RR	Agua	17.2	8.06	5.16	34.2	1.56	0.24	322.4
RR	dsRNA	16.8	5.32	2.98	16.32	1.79	0.33	212.8
RR	dsRNA	14.2	6.44	3.34	10.08	1.93	0.64	257.6

Tabla 22. Diámetro y resultados de absorbancia de la extracción de RNA en el tratamiento de 72 h

Maduración	Aplicación	Diámetro	Absorbancia					ng μL^{-1}
			260	230	280	260/230	260/280	
GM	Agua	17.0	10.90	5.06	5.16	2.15	2.11	435.84
GM	Agua	16.8	14.02	6.21	6.60	2.26	2.12	560.72
GM	Agua	16.5	12.01	5.46	5.72	2.20	2.10	480.56
GM	dsRNA	16.8	1.67	1.03	0.86	1.62	1.93	66.64
GM	dsRNA	17.0	20.26	8.66	9.58	2.34	2.12	810.40
GM	dsRNA	16.8	19.53	8.34	9.33	2.34	2.09	781.04

9.3 Apéndice C: Certificado de Análisis por proveedor para RNA sintético.



Confidential and Privileged

GenScript Custom RNA Oligonucleotide Certificate of Analysis

Product information

Oligo Name	miRmodif
Item No	U2955FG150_7
Sequence	5- rA*rUrU rArArU rArArA rGrArA rUrGrC rCrArA rArGmA -3
Modification	Phosphorothioated 2'O-Methyl RNA
Synthesis Scales	200 nmol
Length	21 Bases
Theoretical MW	6789.26
nmol /OD ₂₆₀	4.24
µg/OD ₂₆₀	28.81
Molar Extinction Coefficient	e=235700 L/(mole·cm)
Volume for 100 µM per tube:	1600.00 ul
Package	160.00nmol * 1 tube
Storage	Store at - 20 °C

Quality Control

Test Items	Specifications	Results
Molecular Weight	Consistent to theoretical molecular weight by Mass Spectrum	Passed
Purification Method	RNase free HPLC	Qualified
Purity	≥88% by HPLC	Qualified
Total Quantity	Test by A260nm with the packing amount 160.00nmol	Passed

Base Notations
 DNA = A, C, G, T and U, I Phosphorothioated DNA = A*, G*, C*, T*
 RNA = rA, rG, rC, rU Phosphorothioated RNA = rA*, rG*, rC*, rU*
 2'O-Methyl RNA = mA, mG, mC, mU Phosphorothioated 2'O-Methyl RNA = mA*, mG*, mC*, mU*

Caution
 For laboratory or further manufacturing use only. If you have any questions about the Certificate of Analysis, please contact our customer service representative at 1-877-436-7274 (Toll-Free), or Email: oligo@genscript.com

Prepared by: Q-CXT	Date: 08/25/2020
Approved by: Q-SSY	Date: 08/25/2020

GenScript USA, Inc.
 860 Centennial Ave. Piscataway, NJ 08854 Tel: 1-732-885-0188

**GenScript Custom RNA Oligonucleotide
Certificate of Analysis**

Product information

Oligo Name	miRmodif*
Item No	U2955FG150_8
Sequence	5'-rC*rUrU rGrGrC rArUrU rCrUrU rUrArU rUrArA rUrUmU -3
Modification	Phosphorothioated 2'O-Methyl RNA
Synthesis Scales	200.00 nmol
Length	21 Bases
Theoretical MW	6564.91
nmol /OD ₂₆₀	4.82
µg/OD ₂₆₀	31.64
Molar Extinction Coefficient	e=207500 L/(mole·cm)
Volume for 100 µM per tube	1600.00 ul
Package	160.00nmol * 1 tube
Storage	Store at - 20 °C

Quality Control

Test Items	Specifications	Results
Molecular Weight	Consistent to theoretical molecular weight by Mass Spectrum	Passed
Purification Method	RNase free HPLC	Qualified
Purity	≥88% by HPLC	Qualified
Total Quantity	Test by A260nm with the packing amount 160.00nmol	Passed

Base Notations

DNA = A, C, G, T and U, I

RNA = rA, rG, rC, rU

2'O-Methyl RNA = mA, mG, mC, mU

Phosphorothioated DNA = A*, G*, C*, T*

Phosphorothioated RNA = rA*, rG*, rC*, rU*

Phosphorothioated 2'O-Methyl RNA = mA*, mG*, mC*, mU*

Caution

For laboratory or further manufacturing use only. If you have any questions about the Certificate of Analysis, please contact our customer service representative at 1-877-436-7274 (Toll-Free), or Email: oligo@genscript.com

Prepared by: Q-CXT Date: 08/25/2020

Approved by: Q-SSY Date: 08/25/2020

GenScript USA, Inc.

860 Centennial Ave. Piscataway, NJ 08854

Tel: 1-732-895-9188

9.4 Apéndice D: Pruebas de retención de solución en fruto

Trabajar con diferentes estados de maduración de fruto supone trabajar con diversidad de tamaños y turgencia, lo cual es un reto para introducir un volumen por la vía de inyección. En la Figura 31 se muestran algunos frutos con los cuales se practicó la inyección para mejorar el control de pulso, profundidad de inyección y manipulación del embolo.



Figura 31. Prueba de retención en fruto por inyección de solución acuosa

Además, esta práctica manual dio pauta para conocer el volumen que puede absorber y retener una población diversa de frutos, donde encontramos que el volumen que pueden retener todos los frutos es 5 μL (Tabla 23)

Tabla 23. Prueba de retención de solución en fruto

Volumen	Madurez (diámetro)	Resultado de prueba
100 μL	RR (1.8-2.3 cm)	Inviabile
	GM (1.2-2.0 cm)	Inviabile
	Vario (0.4-0.6 cm)	Inviabile
50 μL	RR (1.8-2.3 cm)	Inviabile

	GM (1.2-2.0 cm)	Inviabile
	Vario (0.4-0.6 cm)	Inviabile
	RR (1.8-2.3 cm)	Retención
10 μ L	GM (1.2-2.0 cm)	Goteo
	Vario (0.4-0.6 cm)	Inviabile
	RR (1.8-2.3 cm)	Retención
5 μ L	GM (1.2-2.0 cm)	Retención
	Vario (0.4-0.6 cm)	Goteo
