

CONTENIDO

RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
DEDICATORIA	V
AGRADECIMIENTOS	VI
CONTENIDO	VII
LISTA DE CUADROS	X
LISTA DE FIGURAS	XII
I. INTRODUCCIÓN	14
II. REVISIÓN DE LITERATURA	16
2.1. Biocombustibles	16
2.1.1 Biocombustibles de primera generación	17
2.1.2 Biocombustibles de segunda generación	17
2.1.3 Biocombustibles de tercera generación	18
2.2. Proceso de obtención de los biocombustibles	18
2.3. Bioetanol	19
2.4.1 Agave como fuente de fibras	25
2.5. Pared celular como una fuente de celulosa y lignina	27
2.6. Biosíntesis de celulosa en <i>Arabidopsis thaliana</i> Lynch	29
2.6.1 Genes involucrados en la biosíntesis de celulosa en <i>Arabidopsis thaliana</i> y su función biológica en el desarrollo vegetal	30
2.7. Biosíntesis de lignina en <i>Arabidopsis thaliana</i> Lynch	34
2.8. Regulación transcripcional de las rutas de formación de la pared celular en plantas	38
2.8.1. Regulación transcripcional en <i>Arabidopsis thaliana</i>	38
2.8.2. Regulación transcripcional en plantas monocotiledóneas	39
2.9. Importancia de las ciencias ómicas en el estudio de <i>Agave tequilana</i>	42
2.9.1. Aplicaciones de las ciencias ómicas en <i>Agave spp.</i>	42
2.10. Clasificación de los genes homólogos	43
III. OBJETIVO	45

3.1	Objetivo general	45
3.2	Objetivos particulares	45
IV.	Hipótesis	45
4.1	Hipótesis general.....	45
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	46
5.1	Metodología general usada en este trabajo	46
5.2	Descarga de los reads de los transcriptomas de <i>Agave tequilana</i> y <i>Agave deserti</i>	49
5.3	Filtrado y preensamblado de secuencias	50
5.4	Ensamblado de los transcriptomas.....	51
5.5	Identificación de las regiones codificantes	51
5.6	Identificación de genes ortólogos en <i>Agave tequilana</i> y <i>Agave deserti</i>	52
5.7	Análisis de similitud e identidad en los genes ortólogos identificados en <i>A. tequilana</i> y <i>A. deserti</i>	52
5.8	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos y análisis filogenético de CESA y CAD en <i>A. tequilana</i> y <i>A. deserti</i>	53
5.9	Generación de la matriz de los perfiles de expresión.....	53
5.10	Análisis de expresión de genes involucrados en pared celular en raíz, piña, meristemo y hoja de <i>A. tequilana</i>	54
5.10.1	Colecta del material	54
5.10.2	Extracción RNA total.....	57
5.10.3	Electroforesis	57
5.11	Análisis de expresión de genes involucrados en pared celular en tejido proximal a fibras.....	59
5.11.1	Colecta del material	59
5.11.2	Extracción de RNA total y electroforesis.....	59
5.12	Diseño de oligonucleótidos para ensayos tipo RT-PCR	61
5.13	Análisis de expresión por RT-PCR punto final.....	62
5.13.1	Síntesis de DNA complementario (cDNA)	62
5.13.2	Reacciones de la Polimerasa en Cadena (PCRs)	63
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	64
6.1	Identificación <i>in silico</i> de los genes ortólogos involucrados en las rutas de biosíntesis de celulosa y lignina que están relacionadas con la formación de la pared celular en <i>A. tequilana</i> Weber y <i>A. deserti</i>	64
6.1.1	Ensamblado <i>de novo</i> : Anotación y categorización funcional del	

transcriptoma de <i>Agave tequilana</i> y <i>Agave deserti</i>	64
6.1.2 Genes ortólogos en <i>A. tequilana</i> y <i>A. deserti</i> involucrados en la biosíntesis de celulosa.....	66
6.1.3 Motivos funcionales y estructurales de los genes <i>CESA</i> en <i>A. tequilana</i> Weber y <i>A. deserti</i>	73
6.1.4 Análisis filogenético de los genes <i>CESA</i> de <i>Agave</i>	76
6.1.5 Genes ortólogos en <i>A. tequilana</i> y <i>A. deserti</i> involucrados en la biosíntesis de lignina.....	80
6.1.6 Conservación del gen <i>CAD</i> en <i>Agave</i> respecto a plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas.....	83
6.1.7 Motivos funcionales y estructurales de los genes <i>CAD</i> en <i>A. tequilana</i> Weber y <i>A. deserti</i>	84
6.1.8 Análisis filogenético de los genes <i>CAD</i> de <i>Agave</i>	85
6.2. Análisis del perfil transcriptómico <i>in silico</i> de los genes identificados en los diferentes órganos de <i>A. tequilana</i> Weber y <i>A. deserti</i>	88
6.2.2 Perfil transcriptómico de los genes involucrados en la biosíntesis de lignina en <i>A. tequilana</i> Weber y <i>A. deserti</i>	91
6.3. Modificaciones menores al protocolo estándar de la extracción de RNA total.....	95
6.4 Análisis de expresión de los genes <i>SUS2</i> , <i>CESA1</i> , <i>CESA7</i> , <i>CCR2</i> y <i>CAD5</i> en raíz, piña, meristemo y hoja de <i>A. tequilana</i>	99
6.4.1 Identificación de genes endógenos como controles de carga.....	99
6.4.2 Expresión de <i>SUS2</i> , <i>CESA1</i> y <i>CESA7</i>	99
6.4.3 Expresión de <i>CCR2</i> y <i>CAD5</i>	100
6.5 Análisis de expresión de los genes <i>SUS2</i> , <i>CESA1</i> , <i>CESA7</i> , <i>CCR2</i> y <i>CAD5</i> en tejido adyacente a las fibras.....	103
VII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	105
7.1 Conclusiones.....	105
7.2 Perspectivas.....	106
VIII. LITERATURA CITADA.....	107
IX. ANEXOS.....	116

IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS GENES INVOLUCRADOS EN LAS RUTAS BIOSINTÉTICAS DE CELULOSA Y LIGNINA EN *Agave tequilana* Weber

Luis Fernando Maceda López, M.C.

Colegio de postgraduados, 2020

RESUMEN

Las rutas biosintéticas y de regulación génica para los compuestos estructurales de la pared celular primaria y secundaria han sido principalmente caracterizadas en plantas dicotiledóneas, especialmente para la planta herbácea *Arabidopsis thaliana*. Muy pocos elementos y las interacciones de tales rutas se han reportado para plantas monocotiledóneas. El objetivo de este estudio fue identificar y caracterizar los genes ortólogos involucrados en las rutas de biosíntesis de celulosa y lignina, dos compuestos principales que conforman la pared celular en *Agave tequilana* Weber y *Agave deserti*. Para esto, se utilizó un enfoque de minería de datos de transcriptomas de *A. tequilana* Weber y análisis de expresión para algunos genes seleccionados. Se utilizaron datos previamente publicados y sin reportar (J. Simpson, CINVESTAV Irapuato), de órganos y/o tejidos con pared celular primaria y/o secundaria. La expresión de algunos de los genes seleccionados fue validada experimentalmente. Los resultados de ortología permitieron identificar genes que codifican enzimas de cada uno de los pasos de la biosíntesis de celulosa y lignina. Los análisis filogenéticos y de motivos conservados para genes clave de ambas rutas mostraron un alto grado de conservación evolutiva respecto a otras monocotiledóneas como maíz y arroz, lo cual sugiere además un rol funcional en la conformación de la pared celular en agaves. Los ensayos de expresión tipo RT-PCR punto final mostraron expresión enriquecida en tejidos adyacentes a fibras para genes involucrados en la formación de celulosa y lignina, similar a lo que se ha reportado para otros tejidos de soporte como xilema.

Palabras claves: transcriptoma, genes ortólogos, celulosa, lignina.