



Diseño de primers para PCR de punto final relacionados con la viviparidad de la nuez pecanera (*Carya illinoensis*)

Mayela Rodríguez-González^{1*}, Jesús Guadalupe Arreola-Ávila¹, Verónica Ávila-Rodríguez², Fabian García González¹, Jesús Josafath Quezada-Rivera² y María del Socorro Mota-Ituarte¹

¹Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas de la Universidad Autónoma Chapingo. Km. 40 Carretera Torreón-Chihuahua. CP 35230 Bermejillo, Durango.

²Facultad de Ciencias Biológicas-Universidad Juárez del Estado de Durango. Frac., Universidad, Filadelfia. C.P. 35010. Gómez Palacio, Durango.

Email: mave.rodriguez@chapingo.uruza.edu.mx

INTRODUCCIÓN

El nogal pecanero corresponde a uno de los cultivos de mayor importancia económica en el Norte de México y sur de los Estados Unidos. Actualmente, se cultiva en regiones con condiciones extremas de alta temperatura y baja precipitación durante todo el año; lo que ocasiona problemas como la viviparidad que afectan el rendimiento y calidad de la nuez. Debido a la importancia económica de *Carya illinoensis*, se han realizado varias investigaciones (Dardón, 2007; Godoy *et al.*, 2005; Rodríguez, 2018) referentes al control de la viviparidad en la nuez, sin embargo, a nivel genético aún no se ha estudiado la expresión de genes relacionados a dicho fenómeno.

Las hormonas vegetales como el ácido abscísico y giberelinas se ven involucradas en diferentes procesos fisiológicos de las plantas y pueden actuar como reguladores endógenos controlando diversos procesos del desarrollo de las plantas superiores (Serrani, 2008). Sin embargo, aunque estas hormonas, tienen un papel relevante en la germinación de semillas aún se desconocen la mayoría de los mecanismos implicados en su actuación. Las rutas de biosíntesis del ABA y las GAs involucra la participación de muchas enzimas que intervienen en la síntesis de un compuesto a partir de otro, la expresión de genes que codifican para estas enzimas depende en gran parte del medio ambiente y condiciones de estrés en que se encuentre la planta. Con el empleo de diferentes técnicas como son: cromatografía, electroforesis de proteínas, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), secuenciación de genes y de transcriptomas, se ha logrado identificar muchas de las enzimas que participan en estos procesos metabólicos (Alvarenga *et al.*, 2014).

Mediante estudios genéticos es posible identificar y conocer la expresión de genes que estén relacionados con la viviparidad de la nuez, sin embargo, aún es limitada la información existente. Para analizar si estas fitohormonas están involucradas en la viviparidad de la nuez a nivel genético, es necesario realizar un correcto diseño de primers que garanticen la amplificación de fragmentos involucrados en dicho fenómeno.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue el diseño de primers para el estudio molecular cualitativo de la viviparidad en nuez, a través de la secuencia genómica de *Carya illinoensis* y el uso de herramientas bioinformáticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó la secuencia del genoma completo de *Carya illinoensis* cultivar 87MX3-2.1 (Platts *et al.*, 2021) obtenida a través del GenBank (NCBI). A partir de esto se obtuvieron un total de seis genes que codifican para las enzimas ácido abscísico y giberelinas, además del gen de referencia actina. El diseño de los primers fue a través de la plataforma online IDT (Integrated DNA Technologies). De los primers creados se seleccionaron aquellos que cumplían con las características convenientes: tamaño del producto amplificado, temperatura de alineamiento y contenido de guaninas y citosinas. Una vez elegidos, se procedió al análisis de calidad para descartar la formación de estructuras secundarias, mediante el software OligoEvaluator™. Posteriormente se realizó la validación de estos genes mediante la amplificación de DNA de nuez germinada y nuez madura. Se realizó una prueba de PCR de punto final con la enzima Taq Polymerase (Jena Bioscience) con las especificaciones del fabricante cambiando solamente la temperatura de alineamiento. Los productos amplificados obtenidos fueron separados en un gel de agarosa al 1%, teñidos con gel red, a 75 volts durante 45 minutos. Se visualizaron con luz ultravioleta en un fotodocumentador (Transiluminador UVP®).



RESULTADOS

Con base en el análisis realizado a partir del transcriptoma de *Carya illinoensis* y datos referentes a las enzimas de ABA y GAs se lograron diseñar **siete pares de primers** candidatos para el análisis de la viviparidad en nuez pecanera. De estos, cuatro corresponden a la síntesis de ácido abscísico, dos a la síntesis de giberelinas y un gen constitutivo.

De acuerdo con los resultados obtenidos de la validación se tiene la certeza de que el diseño de primer fue adecuado (Figura 1).

La amplificación de los primers diseñados muestra bandas de buena intensidad y corresponden al tamaño esperado de cada producto, presentando una alta especificidad.

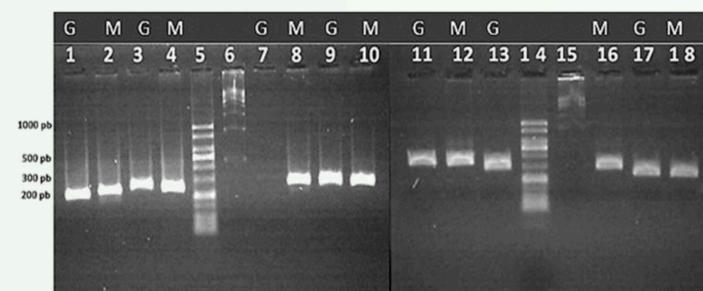


Figura 1. Amplificación de muestras de ADN de nuez pecanera germinada (G) y madura (M), con los primers ABA 8H (pocillo 1 y 2), GA2 ox2 (pocillo 3 y 4), ZEP (pocillo 7 y 8), Actina (pocillo 9 y 10), GA3ox1 (pocillo 11 y 12), ABA 2 (pocillo 13 y 16) y AOG (pocillo 17 y 18). Pocillo 5 y 14 corresponden al marcador de bajo peso molecular de 50 pb y pocillo 6 y 15 corresponden al marcador de peso molecular de 500 pb ambos de Jena Bioscience.

CONCLUSIONES

- Se logró diseñar siete pares de primers para *Carya illinoensis*, que amplifican posibles genes de enzimas relacionadas con la germinación prematura de la nuez pecanera.
- La especificidad mostrada por los primers utilizados manifiesta el diseño correcto de dichos primers.
- Ambos tipos de muestra (nuez germinada y nuez madura) lograron la amplificación esperada para cada primer diseñado, excepto en la nuez germinada para el gen ZEP relacionado con el ABA.
- La información descrita en este trabajo sirve de base para futuras investigaciones más amplias sobre la expresión de genes implicados en la germinación prematura de la nuez.

LITERATURA CITADA

- Alvarenga V. S., Hernández S. A., Valerín B. K. y García G., D. (2014). Búsqueda de Genes de Uña de Gato (*U. tomentosa*) mediante diseño bioinformático de primers basados en los datos obtenidos por microarreglos heterólogos de *A. thaliana*. CIB. C. Rica.
- Dardón Alemán, R. E., Murrieta, I., & Ángel-Asesor, P. H. D. (2007). Control de la viviparidad de la nuez pecanera mediante el uso de reguladores de crecimiento. UAAAN UL-Torreón, Coahuila. México. 73 p.
- Godoy-Ávila, C., Xopiyaxtle-Jarquín, Z., Reyes-Juárez, I., & Torres-Estrada, C. A. (2005). Comportamiento hídrico de hojas y frutos de nogal pecanero y su relación con la calidad y germinación de frutos. Terra Latinoamericana, 23(4), 505-513.
- Platts, A., Shu, S., Wright, S., Barry, K., Edger, P., Pires, J. C. and Schmutz, J. (2021). WGS assembly of *Carya illinoensis* cv. Oaxaca. Genomics, DOE Joint Genome Institute, 1 Cyclotron Road, Berkeley, CA 94720, USA.
- Rodríguez G., M. (2018). Nivel de humedad del suelo y germinación prematura en nogal pecanero [*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch] en el norte de México. Tesis de Maestría. URUZA-Universidad Autónoma Chapingo. Bermejillo, Durango
- Serrani, J. C. (2008). Interacción de Giberelinas y Auxinas en la Fructificación del Tomate. Tesis doctoral realizada en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP-UPV-CSIC).