



Análisis de expresión del gen *RhNUDX1* en pétalos de variedades de rosas de la finca “Royal Flower”, Tabacundo, Ecuador

Criollo Guallasamín, Miguel Alejandro

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Ing. Flores Flor, Francisco Javier Ph. D.

2 de septiembre del 2020

Análisis de URKUND

URKUND

Document Information

Analyzed document	TESIS_MIGUEL CRIOLLO_DEFINITIVA.docx (D80539425)
Submitted	10/2/2020 4:53:00 PM
Submitted by	
Submitter email	fjflores2@espe.edu.ec
Similarity	6%
Analysis address	fjflores2.espe@analysis.arkund.com

Firma:



FRANCISCO JAVIER FLORES FLOR Ph.D.
C.C.: 1713443479



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**Análisis de expresión del gen *RhNUDX1* en pétalos de variedades de rosas de la finca “Royal Flower”, Tabacundo, Ecuador**” fue realizado por el señor **Criollo Guallasamín, Miguel Alejandro** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 20 de septiembre del 2020



Firmado electrónicamente por:
**FRANCISCO
JAVIER FLORES
FLOR**

.....
Ing. Flores Flor, Francisco Javier Ph. D.

C. C.: 1713443479

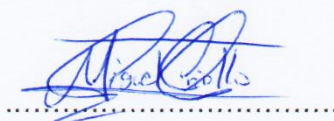


**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Criollo Guallasamín, Miguel Alejandro**, con cédula de ciudadanía N° 1720892155, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Análisis de expresión del gen *RhNUDX1* en pétalos de variedades de rosas de la finca "Royal Flower", Tabacundo, Ecuador** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 20 de septiembre del 2020



Criollo Guallasamín, Miguel Alejandro

C.C.: 1720892155

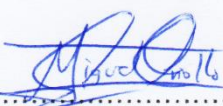


**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo **Criollo Guallasamín, Miguel Alejandro**, con cédula de ciudadanía N° 1720892155, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Análisis de expresión del gen *RhNUDX1* en pétalos de variedades de rosas de la finca "Royal Flower", Tabacundo, Ecuador** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 20 de septiembre del 2020



.....

Criollo Guallasamín, Miguel Alejandro

C.C.: 1720892155

Dedicatoria

En primer lugar, a mi familia, que siempre ha sido el pilar fundamental en mi vida, y quienes me han permitido cumplir mis metas y sueños.

A nuestro padre Dios, quien me ha dado los dones necesarios para culminar mi carrera.

A Estefanía, que ha sido una persona que ha luchado junto a mi en todo los momentos de mi vida.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas, que ha sido mi casa para llenarme de conocimiento y valores.

Agradecimientos

Agradezco en primer lugar a Dios y la Virgen, que me han dado sabiduría y fortaleza para mi vida, en especial en mis momentos de flaqueza.

Gracias a mis padres Carlos y Liliana, quienes desde mi infancia han luchado muy duro para darme los estudios y me han permitido hoy formarme como Ingeniero. A mis hermanas Karlita y Nadia, que, a pesar de las peleas de hermanos, me han acompañado en muchos momentos felices y también tristes de mi vida. A mi tío Telmo, que ha sido como un segundo padre para mí y siempre me ha motivado a ser mejor cada día.

Agradezco a mi novia Estefanía y su familia, que han sido como una segunda familia en mi vida, me han enseñado muchas cosas y me han permitido crecer como persona y como profesional.

Gracias a mi equipo de trabajo en la Universidad, en especial al Doc Francisco y Almita, que han sido más que tutores unos mentores en mi vida estudiantil, que con su generosidad y alegría por la enseñanza han hecho de mí y de muchos estudiantes unos excelentes profesionales.

Índice de contenidos

Certificación	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos	7
Índice de contenidos.....	8
Índice de Tablas	10
Índice de Figuras.....	11
Resumen	12
Abstract	13
Capítulo I: Introducción.....	14
Antecedentes	14
Justificación del problema	17
Objetivos de la investigación	17
<i>Objetivo general</i>	17
<i>Objetivos específicos</i>	18
Capítulo II: Marco Referencial.....	19
Taxonomía de la rosa.....	19
Características botánicas de la rosa.....	19
Cultivo de rosa.....	19
Fragancia en rosas	20
Análisis de genes de aroma en rosas	20
Técnicas moleculares	22
<i>Extracción de ADN vegetal</i>	22
<i>Extracción de ARN vegetal</i>	23
<i>Transcripción reversa</i>	24
<i>PCR convencional</i>	24
<i>Genes de expresión constitutiva</i>	25
<i>Gen de la subunidad 5 (nad5) de la NADH deshidrogenasa mitocondrial</i> ..	25
Hipótesis	25
Capítulo III: Materiales y métodos.....	27
Participantes	27
Zona de estudio.....	27
Período de tiempo de investigación.....	27

Procedimiento.....	27
Recolección del material vegetal	28
Preparación del material vegetal.....	28
Extracción de ADN.....	29
Cuantificación y análisis de calidad del ADN.....	30
Amplificación del gen <i>RhNUDX1</i> por PCR convencional.....	30
<i>Diseño de cebadores</i>	30
<i>Amplificación del ADN</i>	30
Extracción de RNA.....	32
<i>Método de extracción de RNA por fenol-cloroformo con Trizol®</i>	32
<i>Método de extracción de RNA mediante el mini kit de columnas GeneJET Plant RNA Purification</i>	33
Cuantificación y análisis de calidad del ARN.....	35
Síntesis de ADN complementario	35
Amplificación de genes <i>RhNUDX1</i> y <i>housekeeping</i> por PCR convencional..	36
<i>Diseño de cebadores</i>	36
<i>Control de calidad del ADNc</i>	36
<i>Amplificación de ADNc</i>	37
Capítulo IV: Resultados y discusión	40
Extracción y cuantificación de ADN	40
Diseño de cebadores.....	40
Amplificación del gen <i>RhNUDX1</i> a partir de ADN	41
Extracción y cuantificación de ARN.....	42
Análisis de transcritos.....	43
<i>Homogeneidad del gen de expresión constitutiva (housekeeping)</i>	43
<i>Amplificación del gen RhNUDX1 a partir de ADNc</i>	44
Capítulo V: Conclusiones	49
Capítulo VI: Recomendaciones	50
Capítulo VII: Referencias.....	51

Índice de Tablas

Tabla 1. Composición de una reacción de PCR basado en DreamTaq Green PCR Master Mix (2X).....	31
Tabla 2. Programa del termociclador para llevar a cabo la PCR del DNA	32
Tabla 3. Composición de una reacción de PCR para el gen constitutivo NAD5.....	36
Tabla 4. Programa del termociclador para llevar a cabo la PCR para el gen NAD5.	37
Tabla 5. Composición de una reacción de PCR del ADNc basado en DreamTaq Green PCR Master Mix (2X).....	38
Tabla 6. Características de los primers usados.....	41
Tabla 7. Características termodinámicas de los primers usados.....	41

Índice de Figuras

Figura 1. Ruta de biosíntesis de geraniol (citosol).....	22
Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos del gen NAD5 de muestras de ADNc de pétalos de rosa.....	44
Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de productos del gen ADNr 16S.....	46

Resumen

Las rosas han sido el cultivo más importante en la industria de la floricultura desde hace siglos, el género *Rosa* incluye 200 especies y más de 35 000 cultivares. Actualmente en Ecuador el área florícola se ha convertido en la segunda fuente de ingresos no petroleros. Las rosas ecuatorianas se caracterizan por ser de las más vendidas en el mundo, en especial en el mercado de Estados Unidos. Sin embargo, las expectativas y oportunidades que ha representado el mercado internacional de rosas han obligado a algunas fincas productoras ecuatorianas a rediseñar sus estrategias de producción para mejorar sus niveles de competitividad, es por ello que la presente investigación tiene por objetivo analizar la expresión del gen *RhNUDX1* en pétalos de variedades de rosas de la finca “Royal Flower”, Tabacundo, Ecuador. La hidrolasa NUDX1, es parte importante de una vía para la biosíntesis de alcoholes monoterpenos libres que contribuyen al aroma en las rosas. Se determinó la presencia del gen *RhNUDX1* en cinco variedades de rosas, para ello se extrajo el ADN con el método CTAB y se realizó un PCR convencional. Luego, se procedió a analizar la expresión del gen mediante un PCR convencional a partir de DNA complementario obtenido de RNA que se extrajo anteriormente por los métodos de fenol-cloroformo con Trizol y el mini kit de columnas *GeneJET Plant RNA Purification*. Se realizó un control interno de calidad a partir del gen de expresión constitutiva NAD5. A pesar de no haber obtenido amplicones visibles, se logró estandarizar: el proceso de extracción de ADN y ARN para pétalos de rosas, estandarizar el programa de PCR y determinar parámetros importantes para el diseño de primers específicos para el gen *RhNUDX1*.

Palabras clave:

- **GEN RHNUDX1**
- **ROSA**
- **AROMA EN ROSAS**

Abstract

Roses have been the most important crop in the floriculture industry for centuries, the genus *Rosa* includes 200 species and more than 35,000 cultivars. Currently in Ecuador the floricultural area has become the second source of non-oil income. Ecuadorian roses are characterized by being the best-selling in the world, especially in the United States market. However, the expectations and opportunities that the international rose market has represented have forced some Ecuadorian producing farms to redesign their production strategies to improve their levels of competitiveness, which is why this research aims to analyze the expression of the gene *RhNUDX1* in petals of varieties of roses from the “Royal Flower” farm, Tabacundo, Ecuador. The *NUDX1* hydrolase is an important part of a pathway for the biosynthesis of free monoterpene alcohols that contribute to the aroma in roses. The presence of the *RhNUDX1* gene was determined in five varieties of roses, for this the DNA was extracted with the CTAB method and a conventional PCR was carried out. Then, the gene expression was analyzed by means of a conventional PCR from complementary DNA obtained from RNA that was previously extracted by the phenol-chloroform with Trizol and the GeneJET Plant RNA Purification mini-column kit methods. An internal quality control was carried out from the constitutive expression gene *NAD5*. Despite not having obtained visible amplicons, it was possible to standardize: the DNA and RNA extraction process for rose petals, standardize the PCR program and determine important parameters for the design of specific primers for the *RhNUDX1* gene.

Keywords:

- **GEN RHNUDX1**
- **ECUADORIAN ROSE**
- **AROMA IN ROSES**

Capítulo I: Introducción

Antecedentes

Las rosas han sido el cultivo más importante en la industria de la floricultura desde hace siglos, el género *Rosa* incluye 200 especies y más de 35 000 cultivares (Gudin, 2000); representan un valor anual de aproximadamente 10 billones de dólares donde se comercializan principalmente como flores cortadas, plantas en macetas y plantas de jardín, además, su importancia comercial también radica en el uso de los pétalos como fuente de fragancias y saborizantes naturales (Guterman et al., 2002). La comunidad de investigadores de rosas a nivel mundial es relativamente pequeña y la demanda de rosas en el mercado es alta, por lo que el desarrollo de nueva información y herramientas para la producción y genética de rosas ha sido un paso importante en los últimos años; es así que la disponibilidad de secuencias del genoma de rosa ha permitido la identificación de genes candidatos relacionados con el aroma, número de pétalos, color, desarrollo floral, etc. (Smulders et al., 2019; Nakamura et al., 2018).

Actualmente la investigación en rosas se ha centrado en características cualitativas como la presencia/ausencia de la “doble flor” o resistencia a enfermedades, y otras características complejas que incluyen el color de la flor, emisión de olores, crecimiento de brotes, respuesta de vernalización y desarrollo floral (Spiller et al., 2010). Varios estudios se han centrado principalmente a los compuestos volátiles emitidos por los antiguos cultivares de rosa, y se han identificado cientos de compuestos diferentes entre los que destacan tres grupos principales: fenilpropanoides, derivados de ácidos grasos, y terpenoides. Por lo tanto, los pétalos de rosa representan un excelente sistema para la aplicación de tecnologías genómicas modernas en la búsqueda de nuevos genes relacionados con la producción de aroma (Channelière et al., 2002).

Desde el punto de vista biotecnológico, el pétalo de rosa es muy importante debido a su gran influencia en la mayoría de características ornamentales, por ejemplo, el inicio de la senescencia o abscisión de pétalos determina en gran medida la vida del florero, además el pétalo es el sitio principal de producción de aromas, pues en la epidermis del lado adaxial del pétalo de rosa se ubican células especializadas en forma de cono cuya función principal es la producción y secreción de moléculas aromáticas (Dudareva & Pichersky, 2000).

Los terpenoides, especialmente los alcoholes monoterpenos como el geraniol, son componentes principales de compuestos volátiles responsables del aroma típico de rosa (Tholl, 2015); en general, la biosíntesis de terpenoides en plantas se da mediante diversas terpeno sintasas, sin embargo, Smulders et al. (2019) indican que se descubrió recientemente a partir de una combinación de enfoques genéticos y transcriptómicos que la rosa usa una vía independiente de terpeno sintasa, donde es clave la enzima *RhNUDX1*, que pertenece a la familia de proteínas Nudix; también se encontró una correlación positiva entre los niveles de expresión de *RhNUDX1* y la producción del geraniol monoterpenoide determinando el papel esencial de esta proteína en la producción de aroma en rosas (Magnard et al., 2015).

Los principales países exportadores de flores en el mundo son: Holanda, Colombia, Alemania, Ecuador e Italia (Vásquez, 2018). Ecuador posee una situación geográfica favorable que le ha beneficiado en ser un gran productor de rosas, llegando a ser el cuarto mayor exportador. Las rosas ecuatorianas son exportadas principalmente a Estados Unidos, Rusia, Países Bajos, Canadá, Italia, Ucrania y España (Becerra & Changoluisa, 2018), pues son consideradas una de las mejores del mundo debido a sus características únicas, tales como: tallos gruesos y largos, botones florales grandes, colores vivos y gran aroma (Corporación Financiera Nacional, 2017).

En Ecuador la floricultura tiene sus inicios a principios de los años 80, y la producción a gran escala empieza en el año de 1994 presentando ligeras decaídas no significativas en los años 2006, 2007 y 2009 (Gómez & Egas, 2014). El cultivo de rosas ha ayudado a fortalecer la economía en el país gracias al incremento en las tasas de empleo, es así que en los registros del 2013 datan 48 000 trabajadores directos y 55 000 trabajadores indirectos; actualmente las principales florícolas se concentran en las provincias de Pichincha, Cotopaxi, Imbabura y Azuay (Clerque, 2013).

Las condiciones naturales presentes en la sierra ecuatoriana (región ecuatorial en donde se encuentra la gran mayoría de fincas) permiten que el cultivo de flores y en especial el de rosa sea exitoso; entre las ventajas se tiene: temperatura de cultivo adecuada (entre 15 y 22 °C) con una fluctuación de +/- 1°C al año, 12 horas de luz durante todo el año, cantidad de agua abundante, entre otras (Expoflores, 2014). Gracias a estas condiciones ambientales permite a las flores ecuatorianas desarrollar características importantes para los mercados florícolas, como son: tamaño del botón floral, largo del tallo, color, textura del pétalo (FLACSO, 2015).

El área de investigación en el país sobre rosas es muy limitado, se han realizado trabajos como caracterización molecular de rosas, protocolos para multiplicación de flores, control biológico de fitopatógenos, fingerprinting (Wendt & Izquierdo, 2002); pero, para estudios sobre genes de aroma en rosas no existe información hasta septiembre del presente año, es por ello que la presente investigación es pionera en dicha área y corresponde a una primera parte de un proyecto superior que se llevará a cabo por International Rose Breeders representada en Ecuador por Conectiflor S.A. para la obtención de mejores cultivares de rosas.

Justificación del problema

Actualmente en Ecuador el área florícola se ha convertido en la segunda fuente de ingresos no petroleros; la renta anual es de aproximadamente \$700 millones (Infoagro, 2014). Las rosas ecuatorianas se caracterizan por ser una de las más vendidas en el mundo, en especial al mercado de Estados Unidos, seguida en menor cantidad a Rusia, Holanda, Italia, Canadá, Ucrania y España (Expoflores, 2014). El Ecuador recibe una gran cantidad de dinero gracias a la exportación de rosas, dinero que es destinado principalmente para: obras públicas, generar mayores puestos de empleo, creación de planes de desarrollo a pequeños productores (Dirección de Inteligencia Comercial e Inversiones Ecuador, 2013). Las expectativas y oportunidades que ha representado el mercado internacional de rosas han obligado a algunas fincas productoras a rediseñar sus estrategias de producción para mejorar sus niveles de competitividad logrando así certificaciones como: Flower Label Program (FLP), Max Havelaar, FlorEcuador Certified ®, entre otras (Aparicio, 2016) (Expoflores, 2019).

Sin embargo, en la actualidad este gran ingreso de capital al país se está viendo afectado por la gran competencia que se ha desarrollado en el mercado florícola (Vásquez, 2018) y por ello es importante en Ecuador potencializar las características de sus rosas (aroma, color, tamaño de botones florales, grosor de sus tallos, etc.) mediante herramientas de investigación efectivas y actuales para tener aparte de sus certificaciones mayor competitividad dentro del mercado florícola (Clerque, 2016).

Objetivos de la investigación

Objetivo general

Analizar la expresión del gen *RhNUDX1* en pétalos de variedades de rosas de la finca "Royal Flower", Tabacundo, Ecuador.

Objetivos específicos

- Determinar la presencia del gen *RhNUDX1* en cinco variedades de rosa.
- Evaluar la expresión del gen *RhNUDX1* de forma semicuantitativa en las variedades de rosa donde el gen se encuentre presente.

Capítulo II: Marco Referencial

Taxonomía de la rosa

Las rosas pertenecen al género *Rosa* (Zambrano, 2017), el cual pertenece a la familia Rosaceae (Arzate & Bautista, 2014). El género *Rosa* comprende aproximadamente 350 especies, numerosas variedades y más de 30 000 cultivares (Esparza, 2003). Los cultivares de rosa se dan mediante métodos de hibridación a partir de las especies: *R. moschata*, *R. gallica*, *R. damascena*, *R. wichuraiana*, *R. californica* y *R. rugosa* (Vásquez, 2018).

Características botánicas de la rosa

El rosal es una planta tipo arbusto, con ramas leñosas y generalmente con espinos que alcanzan de 2 metros a 5 metros de altura; sus hojas son de tipo pinnadas, caducas, con estípulas, ovaladas y con las nervaduras del envés sobresalientes (Arzate & Bautista, 2014). Presenta unas inflorescencias en forma de corimbo o como flores solitarias, debido al gran número de hibridaciones existen diversas características y formas diferentes de la flor; por lo general son hermafroditas y con simetría radial (Britannica, 2017) (Flora Iberica, 2013).

Cultivo de rosa

Las rosas se han cultivado desde la antigüedad, la actividad de reproducción que condujo a la producción de rosas modernas solo comenzó realmente en el siglo XIX. Los cruces que involucran solo siete u ocho de las más de 120 especies del género *Rosa* han llevado a la creación de más de 35 000 cultivares de rosas y hoy las rosas se encuentran entre las plantas ornamentales más importantes del mundo (Channelière et al., 2002).

Las rosas son fáciles de propagar, generalmente se propagan de tres formas: la propagación por esquejes (es el método que resulta más sencillo), la propagación por injertos (que es la que se usa a gran escala) y la propagación a partir de semillas (genera resultados variables) (Zambrano, 2017).

El género *Rosa* contiene aproximadamente 200 especies distribuidas en el hemisferio norte, *R. hybrida* constituye aproximadamente ocho especies de *Rosa* (*R. multiflora*, *R. luciae*, *R. moschata*, *R. damascene*, *R. gallica*, *R. chinensis*, *R. gigantea* y *R. foetida*) por repetición natural y artificial hibridaciones *R. hybrida* es un tetraploide y las rosas ancestrales son diploides. Como consecuencia de la hibridación natural y artificial, las rosas cultivadas tienen varias características florales, que incluyen colores rojos, naranjas y amarillos intensos, inflorescencias cada vez mayores y más grandes con una gran cantidad de pétalos (Hirata et al., 2016).

Fragancia en rosas

La fragancia floral es una característica importante que está determinada por una mezcla compleja de moléculas volátiles de baja masa molecular. Durante muchos años, la investigación sobre fragancias florales se centró en su composición química y como resultado, se identificaron cientos de compuestos. La mayoría de estos compuestos pertenecen a tres vías biosintéticas principales: fenilpropanoides, derivados de ácidos grasos y terpenoides. Aunque las vías completas que conducen a los productos finales no se han caracterizado, se han descrito modificaciones comunes como la hidroxilación, la acetilación y la metilación (Dudareva, 2000).

Los pétalos son la fuente principal de compuestos de aroma en muchas flores, y la producción y emisión de aromas se controla en el desarrollo, es por esto que para estudios de aroma en rosas es importante recoger los botones florales en su etapa de desarrollo (Vainstein et al., 2001).

Análisis de genes de aroma en rosas

Cientos de moléculas volátiles que pertenecen a diferentes vías biosintéticas, han sido aisladas de pétalos de rosa. La combinación de estas moléculas genera el particular aroma a rosas. Las vías biosintéticas de muchos compuestos de aroma a rosa no se conocen completamente. La biosíntesis de 3,5-dimetoxitolueno,

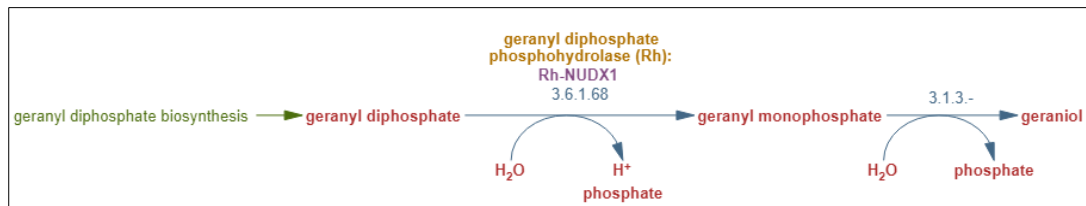
responsable del 'aroma de té' de algunos cultivares, que involucra O-metiltransferasas, fue el primero en ser descifrado (Scalliet et al., 2008).

Los terpenoides, especialmente los alcoholes monoterpenos como el geraniol, también son componentes principales de los compuestos volátiles de la flor de rosa, principalmente responsables del aroma típico de rosa (Clerque, 2016). En general, la biosíntesis de terpenoides en las plantas se logra mediante diversas terpeno sintasas; sin embargo, según Gudin (2000) con una combinación de enfoques transcriptómicos y genéticos, descubrió recientemente que la rosa usa una vía independiente de terpeno sintasa. Una enzima clave de esta vía es *RhNUDX1*, perteneciente a la familia de proteínas Nudix. Se encontró una correlación positiva entre los niveles de expresión de *RhNUDX1* y la producción del geraniol monoterpenoide, lo que indica el papel esencial de esta proteína en la producción de aroma en rosas (Gudin, 2000).

La hidrolasa NUDX1, que se localiza en el citoplasma, es parte importante de una vía para la biosíntesis de alcoholes monoterpenos libres que contribuyen al aroma en las rosas. El gen codifica una proteína de 150 aminoácidos que contienen el dominio Nudix característico y es 59% idéntico a NUDX1 de *Arabidopsis thaliana*. NUDX1 se expresa en pétalos, donde se produce el aroma, con poca o nula expresión en estambres, sépalos u hojas jóvenes, y se correlaciona con la biosíntesis de terpenos (MetaCyc, 2020). Magnard et al. (2015) describe la ruta para la producción de geraniol; la enzima clave de la vía es el geranil difosfato fosfohidrolasa, una hidrolasa de Nudix localizada en el citoplasma. La enzima produce un intermedio geranil monofosfato, que debe ser desfosforilado por una enzima diferente, que aún no se ha caracterizado.

Figura 1

Ruta de biosíntesis de geraniol (citosol)



Nota. Basado en Pathway: geraniol biosynthesis (cytosol). MetaCyc, 2020

Técnicas moleculares

Extracción de ADN vegetal

Aislar ADN del tejido vegetal generalmente representa un desafío debido a la bioquímica diversa entre especies de plantas, y es importante elegir un método de extracción óptimo (OPS Diagnostics, 2018).

Se han reportado muchas dificultades para aislar ADN de buena calidad en plantas (Novaes et al., 2009), estas dificultades se atribuyen a los niveles variables en plantas de polisacáridos, polifenoles y otros metabolitos secundarios. Estos componentes suelen obstaculizar el proceso de purificación del ADN y su uso posterior en estudios moleculares (Aboul-Maaty & Oraby, 2019).

El aislamiento de ADN de especies de rosas es complicado debido a sus grandes cantidades de polisacáridos, polifenoles y otros compuestos; para solucionar dicho problema se usa generalmente un método basado en un tampón de extracción para reducir los niveles de metabolitos secundarios. El uso de altas concentraciones de EDTA, CTAB y β-mercaptoetanol en el tampón de extracción y una alta concentración de polivinilpirrolidona y NaCl en el tampón de limpieza elimina los polifenoles y polisacáridos (Jabbarzadeh et al., 2009).

El uso de CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio), un detergente catiónico, ayuda a la separación de polisacáridos durante la extracción, mientras que otros

compuestos, como la polivinilpirrolidona, pueden ayudar a eliminar los polifenoles. El método de extracción basado en CTAB aprovecha que los polisacáridos y el ADN tienen solubilidades diferentes en CTAB (dependiendo de la concentración de cloruro de sodio u otra sal). A concentraciones de sal más altas, los polisacáridos son insolubles, mientras que a concentraciones más bajas el ADN es insoluble. Por lo tanto, ajustando la concentración de sal en los lisados que contienen CTAB, los polisacáridos y el ADN se pueden precipitar de forma diferencial (OPS Diagnostics, 2018).

Extracción de ARN vegetal

Tal como para extraer ADN, la extracción de ARN vegetal de calidad también resulta en su mayoría un proceso difícil debido a la presencia en los tejidos vegetales de metabolitos secundarios como polifenoles, carbohidratos, ligninas y aceites etéricos que se unen a los ácidos nucleicos cuando se lisan los tejidos; además la presencia de ribonucleasas en los tejidos vegetales puede resultar en una rápida degradación del ARN (Hunter & Reid, 2001).

En los tejidos vegetales la composición de metabolitos y enzimas secundarios varían en su contenido, por lo que a menudo se encuentra que los procedimientos de aislamiento que funcionan para un tejido no funcionan para otro. Esto ha dado lugar a la publicación de una serie de protocolos de aislamiento de ARN (Ouyang et al., 2014).

Muchos de los protocolos de aislamiento de ARN que se usan se basan en agentes caotrópicos altamente tóxicos tales como fenol, tiocianato de guanidina o fenol/cloroformo que rápidamente desnaturalizan las ribonucleasas endógenas en tejidos vegetales. Sin embargo, estos protocolos de aislamiento no siempre proporcionan un rendimiento y calidad adecuados de ARN. Además, hay que considerar cuestiones de seguridad y eliminación, especialmente con respecto al

fenol, que se absorbe fácilmente a través de la piel y puede causar náuseas, quemaduras y la muerte (Liu et al., 2018).

Rio et al. (2010) indica que la extracción de ARN con Trizol es un método general bastante práctico y que genera una buena calidad de ARN. El reactivo Trizol es una solución monofásica de fenol, isotiocianato de guanidina y otros componentes que facilitan el aislamiento de una variedad de especies de ARN de tamaño molecular grande o pequeño; mantiene la integridad del ARN debido a la inhibición altamente efectiva de la actividad de la ARNasa. El Trizol permite el procesamiento simultáneo de una gran cantidad de muestras y es una mejora del método de aislamiento de ARN de un solo paso desarrollado por Chomczynski y Sacchi (Chomczynski & Sacchi, 1987) (Invitrogen, 2016).

Transcripción reversa

La síntesis de ADN a partir de una plantilla de ARN mediante una transcriptasa reversa produce ADN complementario (BioLabs Inc., 2018). Las transcriptasas reversas (RT) utilizan al ARN como molde y un cebador corto al extremo 3' del ARN. Muchas transcriptasas reversas están disponibles comercialmente (Biology LibreTexts, 2019); la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV) y la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MuLV, MMLV) son RT que se utilizan comúnmente en los flujos de trabajo de biología molecular (Martín, 2020).

PCR convencional

La PCR permite obtener múltiples copias de un fragmento de ADN mediante replicación *in vitro*; el ADN de la matriz puede ser ADN genómico, ADN complementario e inclusive ADN mitocondrial (Kadri, 2020). La técnica de PCR se divide en tres fases: una fase de desnaturalización, una fase de hibridación y una fase de elongación o alargamiento (Debnath et al., 2009). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se lleva a cabo en una mezcla de ADN molde, la Taq

polimerasa, los cebadores o primers y los dNTPs en una solución tampón. Los tubos que contienen la mezcla se someten a ciclos de temperatura repetitivos varias veces en el bloque calefactor de un termociclador (Atawodi et al., 2011).

Genes de expresión constitutiva

Los genes de expresión constitutiva son genes que se requieren para el mantenimiento de las funciones celulares basales y son esenciales para la existencia de una célula, independientemente de su función específica en el tejido u organismo. Por tanto, se expresan en todas las células de un organismo en condiciones normales y fisiopatológicas, independientemente del tipo de tejido, etapa de desarrollo, estado del ciclo celular o señal externa (Basa et al., 2009). Estos genes de expresión constitutiva obtienen valor científico de dos formas. Por un lado, representan el conjunto mínimo de genes necesarios para mantener la vida. Por otro lado, los genes housekeeping se utilizan ampliamente como controles internos para estudios experimentales (Gheisari et al., 2017).

Gen de la subunidad 5 (nad5) de la NADH deshidrogenasa mitocondrial

El gen MT-ND5 produce una proteína llamada NADH deshidrogenasa 5. Esta proteína forma parte de un gran complejo enzimático conocido como complejo I, que está activo en las mitocondrias. Las mitocondrias generan energía mediante un proceso llamado fosforilación oxidativa, el cual utiliza el oxígeno y azúcares simples para crear trifosfato de adenosina (ATP), que es la principal fuente de energía de la célula. El complejo I es uno de varios complejos enzimáticos necesarios para la fosforilación oxidativa y es responsable del primer paso en el proceso de transporte de electrones, la transferencia de electrones de una molécula llamada NADH a otra molécula llamada ubiquinona (Genetics Home Reference, 2020).

Hipótesis

Nula: el nivel de expresión del gen *RhNUDX1* es el mismo para las diez variedades de rosas analizadas.

Alternativa: el nivel de expresión del gen *RhNUDX1* es distinto para las diez variedades de rosas analizadas.

Capítulo III: Materiales y métodos

Participantes

El presente Proyecto de titulación contó con el financiamiento de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE (Laboratorio de Microbiología), como también de International Rose Breeders representada en Ecuador por Conectiflor S.A. quien proporcionó los kits para: extracción de RNA, extracción de DNA, síntesis de DNAc e insumos para llevar a cabo las PCR.

El alumno responsable del desarrollo de este proyecto de titulación es el señor Miguel Alejandro Criollo Guallasamín, egresado de la carrera de Ingeniería en Biotecnología. Los profesionales colaboradores y asesores del trabajo de titulación fueron: Dr. Francisco Flores, Ph.D., en calidad de director del proyecto de titulación; Lic. Alma Koch, Mgs., jefa del Laboratorio de Microbiología; Ing. Andrea Rodríguez, técnico del Laboratorio de Docencia; todos pertenecientes a la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE.

Zona de estudio

El presente proyecto de titulación se desarrolló en los laboratorios de docencia y microbiología de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, Matriz Sede Sangolquí, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha. Una parte importante de la experimentación también se realizó en el laboratorio de diagnóstico molecular IDgen, ubicado en Quito, provincia de Pichincha.

Período de tiempo de investigación

El presente proyecto de titulación tuvo una duración de 8 meses, desde su planteamiento en enero del 2020 hasta su presentación en septiembre del 2020.

Procedimiento

Inicialmente se determinó la presencia del gen *RhNUDX1* en pétalos de cinco variedades de rosas de la Finca “Royal Flower” (que eran de importancia

comercial para la florícola), para ello se extrajo el ADN con el método CTAB, se analizó calidad, pureza e integridad y se realizó una PCR convencional. De las muestras que se obtuvo la presencia del gen *RhNUDX1* se procedió a analizar su expresión mediante un PCR convencional a partir de DNA complementario obtenido de RNA que se extrajo anteriormente por los métodos de fenol-cloroformo con Trizol y el mini kit de columnas *GeneJET Plant RNA Purification*. Los resultados fueron posteriormente analizados mediante herramientas de estadística inferencial. Los métodos de: disrupción mecánica, extracción de RNA, síntesis de DNAc a partir del RNA extraído, electroforesis, amplificación del DNAc mediante PCR convencional y análisis densitométrico de los productos de PCR, se basaron en el proyecto de titulación denominado “Análisis transcripcional de genes PR (Pathogenesis related) en hojas de *Vasconcellea stipulata* infectadas con *Fusarium oxysporum*”, realizado por la señorita Mayra Heredia (2018).

Recolección del material vegetal

El material vegetal para el desarrollo del proyecto fue tomado de la finca “Royal Flower”, ubicada en Tabacundo, Cantón Pedro Moncayo, de la Provincia de Pichincha, Latitud: 0.053194, Longitud: -78.199408, Altura: 2800 msnm. La recolección del material vegetal consistió en cortar tallos de rosas (este corte lo realizaron los trabajadores de la finca) que contenían botones florales en desarrollo; una vez recolectados se conservaron a temperatura ambiente en un balde con agua hasta su posterior uso (es importante conservar la muestra en un período máximo de 24 horas en el balde con agua para obtener resultados óptimos en la investigación) (Dubois et al., 2011).

Preparación del material vegetal

Para la disrupción mecánica del material vegetal se colocaron los pétalos de rosa (aproximadamente dos botones florales) en un mortero de porcelana previamente refrigerado, se colocó nitrógeno líquido y se trituroó con un pistilo de

porcelana hasta obtener un polvo fino. Se recogió el tejido triturado en un tubo Falcon estéril diferente para cada muestra. Se conservaron los tubos Falcon en un ultracongelador a -80°C hasta su posterior uso.

Extracción de ADN

El protocolo para la extracción de ADN del material vegetal se basó en Weising et al. (2005), donde se usó el método CTAB. Inicialmente se preparó 500 mL del buffer de extracción que contenía: SDS (concentración final=140 mM), Tris HCl (220 mM, pH=8), EDTA (22 mM), NaCl (800 mM), Sarkosyl (1%), CTAB (0.8 % v/v) y β -mercaptoetanol (0.2 % v/v). El β -mercaptoetanol se colocó en una alícuota del buffer de extracción justo antes de ser usado de acuerdo al número de muestras (por cada 0.5 mL de buffer se debe colocar 1 μL de β -mercaptoetanol). Una vez preparado el buffer se procedió a la extracción del material vegetal, para ello se colocaron de 100 a 200 mg de muestra de pétalo de rosa triturado en un tubo Eppendorf de 2 mL. Se añadió 500 μL del buffer de extracción y se mezcló con un micropistilo por 2 minutos, se agregó otros 500 μL de buffer y se mezcló nuevamente. Luego se agregó 500 μL de cloroformo: isoamilalcohol (24:1) y se invirtió levemente hasta homogeneizar la muestra y se incubó a 55°C durante 30 minutos en un termobloque (agitando el tubo manualmente cada 10 minutos). Una vez transcurrido este tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente se centrifugó a 14500 rpm por 15 minutos, se extrajo el sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo estéril. Se añadió 750 μL de isopropanol frío (aproximadamente de 1 a 1.5 veces el volumen del sobrenadante) y se mezcló suavemente, se colocó a -20°C durante 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se centrifugó a 14500 rpm por 15 minutos y se descartó el sobrenadante. Se lavó el pellet con 1 mL de etanol al 75%, se centrifugó a 14500 rpm por 7 minutos y se repitió el lavado. Luego, se dejó secar el tubo con la tapa abierta durante 20 minutos dentro de una cámara de flujo. Finalmente, se resuspendió el pellet en 100 μL de

agua ultrapura más 3 uL de RNAsa y se incubó a 55°C por 15 minutos. El DNA extraído se almacena a -20°C hasta su posterior uso.

Cuantificación y análisis de calidad del ADN

Para determinar la concentración y calidad del ADN se utilizó el espectrofotómetro de microplacas UV/Vis Multiskan Sky, el cual genera los valores de concentración y calidad de ADN de forma directa en la computadora. La integridad del ADN se verificó a través de electroforesis en gel de agarosa al 1% con *SYBR Safe- DNA Gel Stain* y TBE 1X. Para la corrida se cargó 4 µL de muestra de ADN con 2 µL de buffer de carga *Blue Juice 10X* y se utilizó una fuente de poder a 90V y 300 mA durante 35 minutos. El resultado se visualizó en un transiluminador de luz UV (Makovets, 2013).

Amplificación del gen *RhNUDX1* por PCR convencional

Diseño de cebadores

Se diseñó dos pares de primers. El diseño de primers para el gen *RhNUDX1* se realizó mediante la herramienta bioinformática *SnapGene* y el análisis de sus características se realizó con *OligoAnalyzer* donde se verificaron las energías de Gibbs para la formación de homodímeros, heterodímeros y bucles (*hairpin*). Los criterios seleccionados para el diseño del primer, fueron: longitud (18-24 pb), temperatura de melting (55-65°C), concentración de G-C (45-55 %) (PREMIER Biosoft, 2019) (Dieffenbach, Lowe, & Dveksler, 2013). La especificidad de los primers se verificó en Primer-BLAST.

Amplificación del ADN

La amplificación del ADN extraído de los pétalos de rosa se realizó mediante PCR convencional. Para la reacción de PCR se utilizó *DreamTaq Green PCR Master Mix 2X*®. Las cantidades de reactivos requeridos para la reacción de PCR se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Composición de una reacción de PCR basado en DreamTaq Green PCR Master Mix (2X).

Reactivo	Concentración Stock	Concentración Final	Volumen de adición
DreamTaq Green PCR Master Mix	2x	1x	12.5 uL
Cebador-Forward	100 uM	1 uM	1 uL
Cebador-Reverse	100 uM	1 uM	1uL
ADN	-	50 ug/mL	1 uL
Agua DEPC	-	-	9.5 uL
		Volumen final:	25 uL

Nota. Basado en User Guide: DreamTaq Green PCR Master Mix (2X). Thermo Fisher Scientific Inc., 2016.

La temperatura de hibridación óptima fue determinada a partir de la temperatura de melting teórica (T_m) de los cebadores (bajo la regla general de comenzar con una temperatura de hibridación 3-5 °C menor que la T_m más baja de los cebadores) (ThermoFisher, 2019) (BioLabs Inc., 2019). El número de ciclos óptimos para la obtención de productos en la fase exponencial de la curva de PCR se determinó entre 25-35 (Sipos et al., 2007). Las demás condiciones de termociclado para el PCR se basó en la Guía de uso de *DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)*.

Las condiciones del programa del termociclador para llevar a cabo la PCR del DNA extraído de los pétalos de rosa se detallan en la Tabla 2. Las PCR no se realizaron con un control positivo, pues al ser un estudio inicial no se encontraba disponible.

Tabla 2

Programa del termociclador para llevar a cabo la PCR del DNA

Paso	Temperatura [°C]	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	95	30 s	
Hibridación	Tm-5	30 s	35
Extensión	72	1 min	
Extensión Final	72	5 min	1

Nota. Basado en User Guide: DreamTaq Green PCR Master Mix (2X). Thermo Fisher Scientific Inc., 2016 y Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. Sipos et al., 2007

Los productos de la PCR se corrieron en gel de agarosa al 1% con *SYBR Safe- DNA Gel Stain* y TBE 1X. Para la corrida se cargó 4 µL de muestra de los productos de PCR y se utilizó una fuente de poder a 90V y 300 mA durante 35 minutos. El resultado se visualizó en un transiluminador de luz UV (Makovets, 2013).

Extracción de RNA

Para la extracción de RNA total de los pétalos de rosa se utilizó el método fenol-cloroformo con Trizol® y el mini kit de columnas *GeneJET Plant RNA Purification®* (Thermo Scientific) y se evaluó el mejor método de acuerdo a la cantidad y calidad de muestra obtenida.

Método de extracción de RNA por fenol-cloroformo con Trizol®

Se colocó 100-150 mg de muestra de pétalos de rosa triturada en un microtubo cónico de 1.5 mL (previamente colocado en nitrógeno líquido para mantenerse frío) y se colocó en nitrógeno líquido por 15 segundos. Se agregaron 500 µL de *Trizol* y se homogeneizó con un micropistilo Eppendorf. Se agregaron

otros 500 uL de *Trizol* (se debe colocar 1 mL de *Trizol* por cada 100 mg de muestra), se agitó la mezcla en un agitador Vortex y se incubó por 5 minutos en hielo.

Transcurrido este tiempo se agregó 250 uL de cloroformo (por cada mililitro de *Trizol* se debe agregar 250 uL de cloroformo), se agitó durante 15 segundos en un agitador Vortex y se incubó por 10 minutos en hielo.

Posteriormente, se centrifugó el tubo a 14800 rpm por 25 minutos a 4°C, luego se separó el sobrenadante (aproximadamente 500 uL) y se colocó en un nuevo microtubo cónico estéril. A continuación, se adicionó 500 uL de isopropanol frío (previamente refrigerado) (por cada mililitro de *Trizol* se debe agregar 500 uL de isopropanol) y se dejó a -20°C por 30 minutos.

Se centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos, se descartó el sobrenadante y se adicionó 1 mL de etanol al 70%. Se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos, se repitió el lavado con etanol y se dejó secar en una cámara de flujo laminar con la tapa del tubo abierta.

Finalmente, se resuspendió en 30 uL de agua DEPC, se incubó en baño maría a 55°C por 15 minutos (para solubilizar el ARN) y se almacenó en un ultracongelador a -80°C hasta su posterior uso.

Método de extracción de RNA mediante el mini kit de columnas GeneJET Plant

RNA Purification

El método de extracción se basó en la guía de uso de *GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit* (ThermoFisher Scientific, 2014).

Inicialmente se prepararon los frascos de soluciones madre de *Wash Buffer 1* (WB1) y *Wash Buffer 2* (WB2), añadiendo 2.1 mL y 30 mL de etanol al 96% respectivamente. Luego, se complementó la solución de lisis añadiendo 10 uL de DTT 2M por cada 500 uL de *Plant RNA Lysis Solution* en un microtubo de 1.5 mL.

Para la extracción de RNA, se colocó 100 mg del tejido triturado de pétalos de rosa en un microtubo que contenía 500 uL de la solución de lisis de RNA vegetal y se agitó en un Vortex por 15 segundos.

Se incubó por 3 minutos a 56°C y se centrifugó a 13000 rpm por 6 minutos. Se recogió el sobrenadante (aproximadamente 450-550 uL) y se transfirió a un nuevo tubo de microcentrífuga estéril. Se añadió 250 uL de etanol al 96% y se mezcló por pipeteo.

A continuación, se transfirió la mezcla a una columna de purificación insertada en un tubo colector. Se centrifugó la columna por 1 minuto a 11000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se volvió a montar la columna de purificación y el tubo colector.

Se añadió 700 uL de *Wash Buffer 1* a la columna de purificación y se centrifugó a 11000 rpm por 1 minuto. Se descartó el sobrenadante y el tubo colector.

Se colocó la columna de purificación en un tubo colector de 2 mL, se añadió 500 uL de *Wash Buffer 2* a la columna y se centrifugó por 1 minuto a 11000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se remontó la columna y el tubo colector. Se repitió el lavado y se centrifugó a 14000 rpm por 1 minuto.

Se descartó el tubo colector que contenía el sobrenadante y se transfirió la columna de purificación a un tubo de recolección de 1.5 mL libre de RNasas.

Para diluir el ARN se agregó 50 uL de agua libre de nucleasas al centro de la membrana de la columna de purificación y se centrifugó durante 1 minuto a 11000 rpm. Finalmente, se desechó la columna de purificación y se almacenó el RNA a -80°C hasta su posterior uso.

Cuantificación y análisis de calidad del ARN

Para determinar la concentración y calidad del ARN se utilizó el espectrofotómetro de microplacas UV/Vis Multiskan Sky., el cual genera los valores de concentración y calidad de ARN de forma directa en una computadora. La integridad del ARN se verificó a través de electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Para la corrida se cargó 4 µL de muestra de ARN con 2 µL de buffer de carga *Blue Juice 10X* y se utilizó una fuente de poder a 100V y 300 mA durante 40 minutos. El resultado se visualizó en un transiluminador de luz UV (Makovets, 2013).

Síntesis de ADN complementario

Primero, se sometió al ARN a un tratamiento con *DNase I*, para ello se colocó en un microtubo de 0.2 mL el volumen de ARN equivalente a 1 ug/uL (para llevar a cabo una reacción de 10 uL), 1 uL de *DNase I Amplification Grade* y agua DEPC hasta completar 10 uL. Se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente para que la enzima actúe. Transcurrido el tiempo, se colocó 1 uL de EDTA 25 mM (pH=8.0) para detener la reacción. Luego, se incubó a 65°C por 10 minutos en el termociclador para inactivar la enzima *DNasa I*. Al final, se obtuvo un volumen de 11 uL conteniendo 1 ug de ARN tratado con DNasa.

Para la síntesis de ADNc (a partir del ARN tratado con RNasas) se añadió agua DEPC hasta alcanzar un volumen de 12 uL. Luego, se añadió 1 µL de *Oligo dT Primer* (0.5 ug/uL) y 1 µL de dNTPs (10 mM). Se incubó la mezcla en el termociclador a 65°C por 5 min para facilitar la hibridación del *Oligo dT* con la cola poli(A) del ARN mensajero; transcurrido el tiempo las muestras se colocaron en hielo por 1 min.

Se añadió 4 µL de *First Strand Buffer (5X)*, 1 µL de DTT (0.1 M) y 1 µL de *Superscript III Reverse transcriptase* (200 U/uL). Finalmente, se incubó en el termociclador a: 50°C por 60 min, 55°C por 15 min y 70°C por 15 min. El ADNc obtenido se conservó a -20°C hasta su posterior uso.

Amplificación de genes *RhNUDX1* y *housekeeping* por PCR convencional

Diseño de cebadores

Los dos pares de primers diseñados inicialmente para el gen *RhNUDX1* para ADN se usaron también para el ADNc. El par de primers usado para el gen NAD5 se obtuvo en el estudio *Multiplex RT-PCR detection of two orchid viruses with an internal control of plant nad5 mRNA* (Chuan Lee & Chang, 2006).

Control de calidad del ADNc

La calidad del ADNc se comprobó mediante un PCR convencional bajo el gen *housekeeping* NAD5.

Las cantidades de reactivos requeridos para la reacción de PCR del gen constitutivo NAD5 se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Composición de una reacción de PCR para el gen constitutivo NAD5

Reactivo	Concentración Stock	Concentración Final	Volumen de adición
DreamTaq Green PCR Master Mix	2x	1x	12.5 uL
mt-F2	100 uM	1 uM	1.25 uL
mt-R1	100 uM	1 uM	1.25 uL
ADNc	50 ng/uL	50 ng	3.5 uL
Agua DEPC	-	-	6.5 uL
		Volumen final:	25 uL

Nota. Basado en *Multiplex RT-PCR detection of two orchid viruses with an internal control of plant nad 5 mRNA*. Chuan Lee & Chang, 2006

Las condiciones del programa del termociclador para llevar a cabo la PCR para el gen NAD5 se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4

Programa del termociclador para llevar a cabo la PCR para el gen NAD5

Paso	Temperatura [°C]	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	96	5 min	1
Desnaturalización	96	30 s	
Hibridación	52	30 s	30
Extensión	72	30 s	
Extensión Final	72	7 min	1

Nota. Basado en Multiplex RT-PCR detection of two orchid viruses with and internal control of plant nad 5 mRNA. Chuan Lee & Chang, 2006

Los productos de la PCR se corrieron en gel de agarosa al 2% con *SYBR Safe- DNA Gel Stain* y TBE 1X. El resultado se visualizó en un transiluminador de luz UV.

Amplificación de ADNc

Para la amplificación del ADNc obtenido a partir del ARN de pétalos de rosa, se realizó PCR convencional basado en los parámetros de termociclado y cantidades de reactivos usados para el ADN.

Las cantidades de reactivos que se utilizaron para la reacción de PCR convencional del ADNc se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Composición de una reacción de PCR del ADNc basado en DreamTaq Green PCR Master Mix (2X).

Reactivo	Concentración Stock	Concentración Final	Volumen de adición
DreamTaq Green PCR Master Mix	2x	1x	12.5 uL
Cebador-Forward	100 uM	1 uM	1 uL
Cebador-Reverse	100 uM	1 uM	1uL
ADNc	50 ng/uL	50 ng	2 uL
Agua DEPC	-	-	8.5 uL
		Volumen final:	25 uL

Nota. Basado en User Guide: DreamTaq Green PCR Master Mix (2X). Thermo Fisher Scientific Inc., 2016.

Las condiciones del programa del termociclador para llevar a cabo la PCR del DNAc es el mismo usado para el ADN, como se detalló en la Tabla 2.

Los productos de la PCR del ADNc se corrieron en gel de agarosa al 1% con SYBR Safe- DNA Gel Stain y TBE 1X. Para la corrida se cargó 4 µL de muestra de los productos de PCR y se utilizó una fuente de poder a 90V y 300 mA durante 35 minutos. El resultado se visualizó en un transiluminador de luz UV (Makovets, 2013).

Las PCR se realizaron en presencia de tres tipos de controles: el control sin retrotranscripción (NRTC), que se realiza con el ARN después del tratamiento con DNAsas y así verificar que el tratamiento ha sido eficaz; el segundo es el *plateau* control (PTC), que se consigue amplificando el gen con la concentración estándar de una mezcla de todas las muestras de ADNc a 45 ciclos (cuando el PCR ha alcanzado la fase tardía o *plateau*), este control permite confirmar que las bandas de los resultados semicuantitativos se encuentran en la fase logarítmica de la PCR y el

blanco (B) donde se adiciona agua en lugar de las muestras. No se contó con control positivo en presente estudio.

Capítulo IV: Resultados y discusión

Extracción y cuantificación de ADN

Se han reportado muchas dificultades para aislar ADN de buena calidad en plantas (Novaes et al., 2009), estas dificultades se atribuyen a los niveles variables en plantas de polisacáridos, polifenoles y otros metabolitos secundarios. Estos componentes suelen obstaculizar el proceso de purificación del ADN y su uso posterior en estudios moleculares (Aboul-Maaty & Oraby, 2019).

Para solucionar dicho problema se usa generalmente un método basado en un tampón de extracción para reducir los niveles de metabolitos secundarios. El uso de altas concentraciones de EDTA, CTAB y β -mercaptoetanol en el tampón de extracción y una alta concentración de polivinilpirrolidona y NaCl en el tampón de limpieza elimina los polifenoles y polisacáridos (Jabbarzadeh et al., 2009).

Para el estudio, se utilizó 5 variedades de rosas, nombradas como: Rosa 1, Rosa 2, Rosa 3, Rosa 4 y Rosa 5 (ya que debido a las leyes de confidencialidad que se maneja la florícola “Royal Flower” no se colocó los nombres y códigos de cada variedad de rosa).

Se extrajo ADN de las 5 variedades de rosas con el método CTAB, obteniendo un valor medio de ratio de pureza 260/280 de 1.87 y una concentración media de 501.6 [ug/mL], ambos valores óptimos para poder trabajar con las muestras de ADN extraído.

Diseño de cebadores

Las secuencias utilizadas como base para el diseño de los pares de primers se obtuvieron de la base de datos del NCBI para el gen *RhNUDX1*. Los primers utilizados para el gen NAD5 provienen de *Malus domestica* (Manzana) (Chuan Lee & Chang, 2006). Basado en las consideraciones mencionadas en la Sección 3.9.1 para el diseño de primers, se obtuvieron las secuencias presentadas en la Tabla 6; se

verificaron además en la Tabla 7 algunas características de los primers, tales como: temperatura de *melting* y la energía de Gibbs para la formación de horquillas, homodímeros o heterodímeros de los cebadores mediante Oligoanalyzer.

Tabla 6

Características de los primers usados

Gen	Nombre	Secuencia 5´ - 3´	Tamaño del producto
RhNUDX1	secNudx1_F	GAGGCCAAAACGTGCTCTTG	339 bp
	secNudx1_R	CCAAAGGCCAAAAGAGTGGC	
RhNUDX1	aliNudx1_F	GCTCAAACCTCTCTCTCGAA	1200 bp
	aliNudx1_R	TATGAGTGGGACAATCTCCC	
NAD5	nad5_F	GCTTCTTGGGGCTTCTTGTTTCGATA	185 bp
	nad5_R	ATCTCCAGTCACCAACATTGGCAT	

Tabla 7

Características termodinámicas de los primers usados

Gen	Nombre	T° melting [°C]	Horquillas*	Homodímeros*	Heterodímeros*
RhNUDX1	secNudx1_F	57	0.08	-6.3	-9.28
	secNudx1_R	57.2	-2.6	-9.28	
RhNUDX1	aliNudx1_F	54.1	1.32	-6.76	-5.13
	aliNudx1_R	53.5	-2.39	-7.71	
NAD5	nad5_F	59.2	0.3	-6.76	-6.97
	nad5_R	58.8	-1.91	-6.97	

Nota: * Los valores de horquillas, homodímeros y heterodímeros están en unidades de [kcal/mol]

Amplificación del gen *RhNUDX1* a partir de ADN

La temperatura de hibridación óptima fue determinada a partir de la temperatura de melting teórica (T_m) de los cebadores (ThermoFisher, 2019) (BioLabs Inc., 2019); se escogió una temperatura de annealing entre 53-55°C para el par de primers secNudx1_F y secNudx1_R (se hicieron múltiples PCRs

individuales en el rango de temperatura), y una temperatura de annealing de 51-52°C para el par de primers aliNudx1_F y aliNudx1_R (se hicieron igualmente múltiples PCRs en el rango de temperatura). Se analizó además la temperatura de annealing de cada par de primers, mediante el software online *Tm calculator* de New England BioLabs Inc., permitiendo así corroborar los datos de la temperatura de annealing anteriormente escogidos. El número de ciclos óptimos para la obtención de productos en la fase exponencial de la curva de PCR se determinó en 35 (Sipos et al., 2007).

Los productos de PCR se corrieron en gel de agarosa al 1% con *SYBR Safe-DNA Gel Stain* y TBE 1X, y no se pudo observar amplicones en el gel.

Extracción y cuantificación de ARN

Se extrajo ARN de las 5 variedades de rosas con el método basado en fenol-cloroformo con Trizol, obteniendo un valor medio de ratio de pureza 260/280 de 1.93 y una concentración media de 408.6 [ug/mL], ambos valores óptimos para poder trabajar con las muestras de ARN extraído. Se extrajo además ARN mediante el mini kit de columnas *GeneJET Plant RNA Purification*, obteniendo un valor medio de ratio de pureza 260/280 de 2.03 y una concentración media de 349.6.6 [ug/mL].

En los tejidos vegetales la composición de metabolitos y enzimas secundarios varían en su contenido, por lo que a menudo se encuentra que los procedimientos de aislamiento que funcionan para un tejido no funcionan para otro. Esto ha dado lugar a la publicación de una serie de protocolos de aislamiento de ARN (Ouyang et al., 2014).

Muchos de los protocolos de aislamiento de ARN que se usan se basan en agentes caotrópicos altamente tóxicos tales como fenol, tiocianato de guanidina o fenol/cloroformo que rápidamente desnaturalizan las ribonucleasas endógenas en tejidos vegetales. Sin embargo, estos protocolos de aislamiento no siempre

proporcionan un rendimiento y calidad adecuados de ARN. Además, hay que considerar cuestiones de seguridad y eliminación, especialmente con respecto al fenol, que se absorbe fácilmente a través de la piel y puede causar náuseas, quemaduras y la muerte (Liu et al., 2018).

A partir de los datos de ratio de pureza 260/280 y concentración de ambos métodos utilizados para la extracción de RNA, se puede concluir que ambos métodos son factibles para la extracción de RNA de pétalos de rosa; sin embargo, el método basado en el mini kit de columnas *GeneJET Plant RNA Purification* es mucho más rápido (en 20 minutos se completa una extracción, mientras que con el método de fenol-cloroformo con Trizol se demora aproximadamente 120 minutos) y además, evita el uso de agentes caotrópicos.

Análisis de transcritos

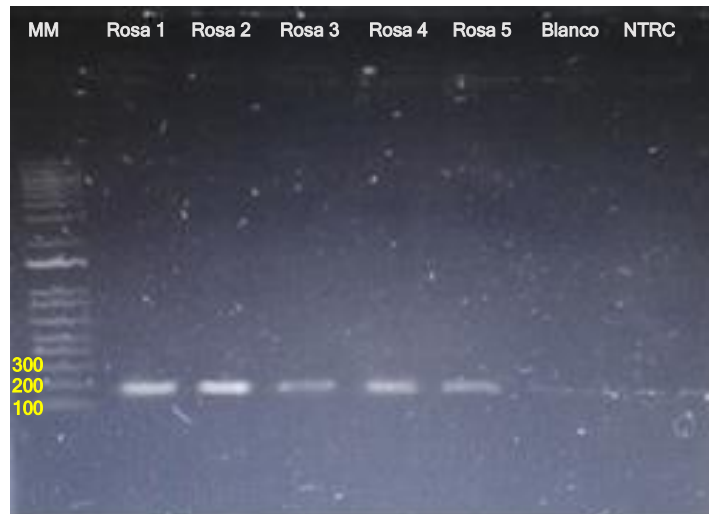
Homogeneidad del gen de expresión constitutiva (housekeeping)

Los genes de expresión constitutiva son genes que se requieren para el mantenimiento de las funciones celulares basales y son esenciales para la existencia de una célula, independientemente de su función específica en el tejido u organismo. Por tanto, se expresan en todas las células de un organismo en condiciones normales y fisiopatológicas, independientemente del tipo de tejido, etapa de desarrollo, estado del ciclo celular o señal externa (Basa et al., 2009). Estos genes de expresión constitutiva obtienen valor científico de dos formas. Por un lado, representan el conjunto mínimo de genes necesarios para mantener la vida. Por otro lado, los genes housekeeping se utilizan ampliamente como controles internos para estudios experimentales (Gheisari et al., 2017).

La calidad del ADNc se comprobó mediante un PCR para el gen constitutivo NAD5. Como se muestra en la Figura 2, todas las muestras generaron un amplicón del tamaño esperado (185 bp), concluyendo que la calidad del ADN complementario es óptima.

Figura 2

Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos del gen NAD5 de muestras de ADNc de pétalos de rosa



Nota. MM: marcador molecular TrackIt 1kb; NTRC: control sin retrotranscripción reversa

Amplificación del gen RhNUDX1 a partir de ADNc

Para la amplificación del ADNc obtenido a partir del ARN de pétalos de rosa, se realizó PCR convencional basado en los parámetros y metodología usados para el ADN.

La temperatura de hibridación óptima de cada par de primers fue la misma usada para el ensayo en ADN. El número de ciclos óptimos para la obtención de productos en la fase exponencial de la curva de PCR se determinó en 35 (Sipos et al., 2007).

Las condiciones del programa del termociclador para llevar a cabo la PCR del DNAc es el mismo usado para el ADN, como se detalló en la Tabla 2.

Los productos de la PCR del ADNc se corrieron en gel de agarosa al 1% con SYBR Safe- DNA Gel Stain y TBE 1X y no se pudo observar amplicones en el gel.

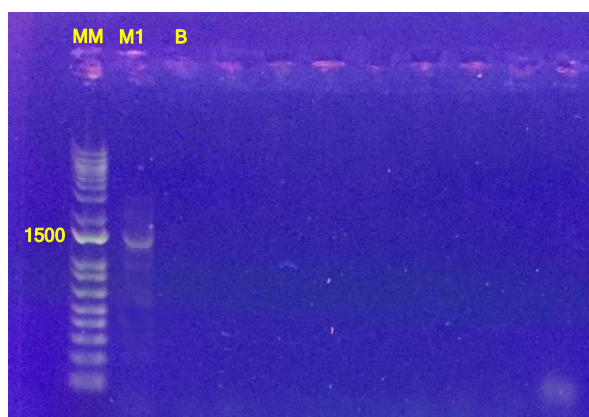
Con los amplicones, se estimaba realizar un análisis densitométrico con las densidades de cada banda; además para el análisis de la expresión del gen *RhNUDX1* en pétalos de rosas se pensaba emplear un diseño de bloques al azar. Tras haber verificado que los datos sigan una distribución normal, se realizaría un análisis estadístico ANOVA de las densidades absolutas calculadas y una prueba de comparaciones múltiples de Tukey para observar diferencias significativas entre las medias.

Según GenScript (2002), en la clonación molecular, después de la síntesis de ADNc a partir de moldes de moléculas de ARNm, se debe diseñar un programa de PCR para amplificar el gen de interés, así como agregar elementos adicionales como sitios de restricción o etiquetas de detección y purificación. Las propiedades intrínsecas de las secuencias de genes, como el alto contenido de GC, los tramos largos del mismo polinucleótido y las secuencias que codifican estructuras de bucle en horquilla, pueden obstaculizar la eficacia de la PCR. Además, Schrick & Nitsche (2016) indican que para una correcta PCR se debe tener en cuenta ciertos parámetros, tales como: buena calidad del templado, diseño correcto de los cebadores, buena especificidad del cebador, correcta temperatura de annealing y temperatura de extensión, correcta programación del termociclador, concentración de reactivos óptima, buena calidad de los reactivos. Para resolver los problemas antes mencionados se realizaron múltiples pruebas en el laboratorio para así ir descartando los posibles parámetros que resultan en una nula amplificación del gen *RhNUDX1*. La calidad del ADN y ARN extraído de los pétalos de rosa se cuantificaron y se obtuvieron ratios de pureza y concentración óptimas dentro del rango para poder utilizarlas sin problema. Para el caso del ADN se obtuvo un ratio de pureza 260/280 de 1.87, donde según Hirata et al. (2016) indica que la relación 260/280 es estable y es considerada óptima con un valor entre 1.8 a 2.0. El ARN tuvo una relación 260/280 de 1.93, donde según Dieffenbach, Lowe & Dveksler

(2013) indican que la relación de absorbancias 260/280 con un valor de 2.0 a 2.2 se considera un ARN de pureza óptima. La concentración y calidad de los reactivos fue puesta a prueba al amplificar el gen ADNr 16S de una muestra de *Bacillus subtilis* mediante PCR convencional y el set de primers universales 1492R y 27-F, donde se obtuvo un amplicón esperado de aproximadamente 1500 pb, tal como se puede observar en la Figura 3. Por lo tanto, el diseño y la buena especificidad de los cebadores son los parámetros que se deben considerar el más adecuado a analizar a más profundidad para una siguiente investigación, los cuales podrían ser los que están causando una ausencia del amplicón en el gel. Según Bustin et al. (2019) se puede trabajar con primers degenerados o se puede diseñar primers que amplifiquen en regiones conservadas que contemplen más nucleótidos (mayor longitud).

Figura 3

Electroforesis en gel de agarosa de productos del gen ADNr 16S



Nota. MM: marcador molecular TrackIt 1kb; M1: muestra de *B. subtilis*; B: blanco

Además de los parámetros antes mencionados para una óptima PCR, existen otros factores moleculares que se deben tomar en cuenta para este estudio. Según Baudino et al. (2019) las rosas que no presentan aroma no han perdido por completo su capacidad de producir moléculas aromáticas, pero emiten cantidades

muy pequeñas; la hipótesis actualmente favorecida para explicar la ausencia de olor en rosas se refiere al mal funcionamiento de las vías biosintéticas de los compuestos volátiles. Desde 2002, la identificación de las enzimas responsables de la síntesis de los principales compuestos aromáticos de la rosa se ha convertido en un objetivo principal de la investigación. Una investigación pionera sobre *Clarkia breweri* y *Antirrhinum majus* ha demostrado que la producción y emisión de aromas a menudo se regulan a nivel de transcripción (Dudareva y Pichersky, 2000).

Los terpenoides son uno de los grupos de productos naturales más grandes, con mayor diversidad estructural y son moléculas cruciales para el típico aroma de rosas (Tholl, 2015). Las vías que conducen a la biosíntesis de compuestos terpénicos están bien documentadas en docenas de plantas. En rosa, la información sobre genes implicados en la vía terpenoide es muy escasa y actualmente solo se han aislado unos pocos genes. Recientemente se ha identificado un gen clave, cuya expresión está fuertemente correlacionada con la presencia de terpenoides en diferentes cultivares de rosas (Magnard et al., 2015; Sun et al., 2020).

En un estudio realizado por Baudino et al. (2019), se comparó los transcriptomas de dos cultivares de rosas que tienen aromas muy diferentes: *R. x hybrida* "Papa Meilland" muy fragante y *R. x hybrida* "Rouge Meilland" sin perfume; se encontró que el gen con la expresión diferencial más alta codificaba una nudix hidrolasa citosólica, este gen se expresa específicamente en pétalos donde se produce el olor. En los cultivares de rosas modernos, su expresión se correlaciona con la presencia de geraniol, un monoterpeneo muy importante para el aroma de rosas. La función de *RhNUDX1* según Baudino et al. (2019) finalmente se descifró utilizando enfoques complementarios que llevaron a las siguientes conclusiones: Las flores de rosa utilizan una ruta alternativa para producir geraniol mediante el empleo de una enzima difosfohidrolasa de la familia Nudix, *RhNUDX1* se localiza en el citosol, aunque en todas las demás plantas, los monoterpeneos se sintetizan

principalmente en plástidos. En las plantas, las hidrolasas de Nudix están poco caracterizadas, aunque se han identificado hasta 29 genes en el genoma de *Arabidopsis* (Kraszewska, 2008).

En un estudio realizado por Sun et al. (2020), se buscó homólogos de *RhNUDX1* en dos especies de rosas diploides: *R. chinensis* cv. 'Old Blush' (OB, planta materna) y *R. x wichurana* (Rw, planta paterna). Se describieron tres genes a partir de OB (*RcNUDX1-1a*, *RcNUDX1-1b* y *RcNUDX1-2*) y dos genes a partir de Rw (*RwNUDX1-1* y *RwNUDX1-2*). Aunque se encontraron tres genes NUDX1 en OB y dos en Rw, solo un gen se expresó altamente en pétalos OB y Rw, los cuales fueron, *RcNUDX1-1a* y *RwNUDX1-2*, respectivamente. El nivel de expresión varió entre los individuos F1 de un cruce entre OB x Rw y se correlacionó con el nivel de diferentes compuestos aromáticos en estos individuos. De hecho, la expresión del gen *RcNUDX1-1a* se correlacionó con la producción de geraniol, mientras que la de *RwNUDX1-2* se correlacionó con la producción de E, E-farnesol. Con ello se puede corroborar, que las muestras analizadas en esta tesis no generaron un amplicón en el gel de electroforesis ya que la forma del gen presente en las muestras de rosas probablemente no estaría asociada al aroma.

La comprensión de los mecanismos moleculares que controlan los rasgos de aroma en rosas puede permitir la identificación de marcadores moleculares y genéticos para ayudar a la selección. Esta técnica no se ha aplicado a la rosa, aunque es muy utilizada en animales y cultivos (Baudino et al., 2019). Los estudios de asociación de todo el genoma también ayudarían a estudiar la herencia de la fragancia en la rosa, como ya se hizo para el contenido de pigmentos. Además, estos estudios sobre el aroma de las rosas también podrían utilizarse para establecer un vínculo entre el aroma y otros parámetros de la calidad de la flor, como el color y el desarrollo (Schulz et al., 2016).

Capítulo V: Conclusiones

1. Se logró extraer ADN de los pétalos de cinco variedades de rosa por el método CTAB, obteniendo un valor medio de ratio de pureza 260/280 de 1.87 y una concentración media de 501.6 [ug/mL], ambos valores óptimos para poder trabajar con las muestras de ADN extraído.
2. No se observó la presencia del gen *RhNUDX1* en ninguna de las variedades de rosa a partir de la muestra de ADN.
3. Se extrajo ARN de las 5 variedades de rosas con el método basado en fenol-cloroformo con Trizol, obteniendo un valor medio de ratio de pureza 260/280 de 1.93 y una concentración media de 408.6 [ug/mL]. Se extrajo además ARN mediante el mini kit de columnas *GeneJET Plant RNA Purification*, obteniendo un valor medio de ratio de pureza 260/280 de 2.03 y una concentración media de 349.6.6 [ug/mL].
4. El ADNc obtenido a partir del ARN extraído de pétalos de las cinco variedades rosa es de óptima calidad, al cumplir el control interno a partir del gen de expresión constitutiva NAD5.

Capítulo VI: Recomendaciones

1. La recolección de los botones florales para evaluar la expresión del gen *RhNUDX1* se lo debe hacer en la etapa de desarrollo floral.
2. Los análisis de transcritos deben realizarse con la presencia de un control positivo.
3. Realizar un diseño de los primers más exhaustivo. Se puede trabajar con primers degenerados.
4. Realizar un análisis más completo de los primers con todos los homólogos descritos del gen hasta el momento, para verificar que los primers sean específicos.

Capítulo VII: Referencias

- Aboul-Maaty, N., & Oraby, H. (2019). Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. *Bulletin Of The National Research Centre*, 43(1). <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0066-1>
- Aparicio, M. (2016). Programa de asistencia de plantaciones de flores. *Corsedi*, 50(7), 88-106.
- Arzate, A., & Bautista, M. (2014). *Técnicas tradicionales y biotecnológicas en el mejoramiento genético del rosal (Rosa spp.)*. Toluca: UAEMEX.
- Atawodi, S., Atawodi, J., & Dzikwi, A. (2011). Polymerase chain reaction: Theory, practice and application: A review. *Sahel Medical Journal*, 13(2). <https://doi.org/10.4314/smj2.v13i2.64834>
- Basa, B., Solti, Á., Sárvári, É., & Tamás, L. (2009). Housekeeping gene selection in poplar plants under Cd-stress: comparative study for real-time PCR normalisation. *Functional Plant Biology*, 36(12), 1079. <https://doi.org/10.1071/fp09073>
- Baudino, S., Sun, P., Caissard, J., Nairaud, B., Moja, S., & Magnard, J. et al. (2019). Rose floral scent. *Acta Horticulturae*, (1232), 69-80. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2019.1232.12>
- Becerra, J., & Changoluisa, A. (2018). *Análisis comparativo de la exportación de rosas Ecuador-Colombia*. Sangolquí: Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.
- BioLabs Inc. (2018). *Reverse Transcription (cDNA Synthesis)*. Obtenido de <https://international.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/dna-preparation/reverse-transcription-cdna-synthesis>

- BioLabs Inc. (2019). *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Obtenido de [https://international.neb.com/applications/dna-amplification-pcr-and-qpcr/polymerase-chain-reaction-pcr#:~:text=The%20annealing%20temperature%20\(typically%20between,for m%20a%20nascent%20DNA%20strand.](https://international.neb.com/applications/dna-amplification-pcr-and-qpcr/polymerase-chain-reaction-pcr#:~:text=The%20annealing%20temperature%20(typically%20between,for m%20a%20nascent%20DNA%20strand.)
- Biology LibreTexts. (2019). *Reverse Transcription*. Obtenido de [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Biochemistry/Book%3A_Biochemistry_Free_For_All_\(Ahern_Rajagopal_and_Tan\)/08%3A_Basic_Techniques/8.08%3A_Reverse_Transcription](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Biochemistry/Book%3A_Biochemistry_Free_For_All_(Ahern_Rajagopal_and_Tan)/08%3A_Basic_Techniques/8.08%3A_Reverse_Transcription)
- Britannica. (2017). *Characteristic Morphological Features*. Obtenido de <https://www.britannica.com/plant/Rosales/Characteristic-morphological-features>
- Bustin, S., Mueller, R., & Nolan, T. (2019). Parameters for Successful PCR Primer Design. *Methods In Molecular Biology*, 5-22. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9833-3_2
- Clerque, K. (2013). La industria de las Rosas en Ecuador. Recuperado a partir de <http://puceae.puce.edu.ec/efi/index.php/economia-internacional/14-competitividad/171-laindustria-de-las-rosas-en-el-ecuador.>
- Clerque, K. (2016). *El mercado florícola en el mundo y en Ecuador*. Quito: EFI.
- Channelière, S., Rivière, S., Scalliet, G., Szecsi, J., Jullien, F., & Dolle, C. et al. (2002). Analysis of gene expression in rose petals using expressed sequence tags. *FEBS Letters*, 515(1-3), 35-38. doi: 10.1016/s0014-5793(02)02413-4
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156-159. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2)

- Chuan Lee, S., & Chang, Y. (2006). Multiplex RT-PCR detection of two orchid viruses with an internal control of plant nad5 mRNA, *15*, 187-196.
- Corporación Financiera Nacional. (2017). *Ficha sectorial: cultivo de flores*. Quito: CFN.
- Debnath, M., Prasad, G., & Bisen, P. (2009). Polymerase Chain Reaction. *Molecular Diagnostics: Promises And Possibilities*, 129-152. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3261-4_9
- Dieffenbach, C., Lowe, T., & Dveksler, G. (2013). *General Concepts for PCR Primer Design*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Dirección de Inteligencia Comercial e Inversiones Ecuador. (2013). Análisis del mercado florícola en Ecuador. Obtenido de: https://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/07/PROEC_AS2013_FLORES.pdf
- Dubois, A., Remay, A., Raymond, O., Balzergue, S., Chauvet, A., & Maene, M. et al. (2011). Genomic Approach to Study Floral Development Genes in *Rosa* sp. *Plos ONE*, *6*(12), e28455. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028455>
- Dudareva, N., & Pichersky, E. (2000). Biochemical and Molecular Genetic Aspects of Floral Scents. *Plant Physiology*, *122*(3), 627-634. doi: 10.1104/pp.122.3.627
- Esparza, H. (2003). *Costos de producción y Comercialización de Rosa bajo condiciones de invernadero en la Carbonera, Arteaga Coahuila*. Buenavista: UAA.
- Expoflores. (2014). Exportación general de flores enero-febrero 2014. Quito, Pichincha, Ecuador.
- Expoflores. (2019). Certificación Flor Ecuador. Quito, Pichincha, Ecuador.

- FLACSO (2015). Análisis de exportación de Rosas ecuatorianas. Obtenido de <https://www.flacso.edu.ec/portal/pnTemp/PageMaster/k23wo5fko3cq1nhkc0mqf8bd8jutu5.pdf>
- Flora Iberica. (2013). *Rosa*. Obtenido de http://www.floraiberica.es/floraiberica/texto/pdfs/06_087_13%20Rosa.pdf
- Genetics Home Reference. (2020). MT-ND5 gene. Recuperado de <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MT-ND5>
- GenScript. (2002). *PCR troubleshooting guide*. Obtenido de <https://www.genscript.com/pcr-troubleshooting-guide.html>
- Gheisari, Y., Moein, S., Javanmard, S., Abedi, M., & Izadpanahi, M. (2017). Identification of Appropriate Housekeeping Genes for Gene Expression Analysis in Long-term Hypoxia-treated Kidney Cells. *Advanced Biomedical Research*, 6(1), 15. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.200790>
- Gómez, C., y Egas, A. (2014). Análisis histórico del sector florícola en el Ecuador y estudio del mercado para determinar su situación actual. Recuperado a partir de <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/3323/1/110952.pdf>
- Gudin, S. (2000). *Rose: Genetics and breeding*. *Plant Breeding*, 159-189.
- Guterman, I., Shalit, M., Menda, N., Piestun, D., Dafny-Yelin, M., & Shalev, G. et al. (2002). Rose Scent. *The Plant Cell*, 14(10), 2325-2338. <https://doi.org/10.1105/tpc.005207>
- Heredia, M. (2018). *Análisis transcripcional de genes PR (Pathogenesis related) en hojas de Vasconcellea stipulata infectadas con Fusarium oxysporum* [Tesis de pregrado, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. Repositorio Institucional - Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE.

- Hirata, H., Ohnishi, T., Tomida, K., Ishida, H., Kanda, M., & Sakai, M. et al. (2016). Seasonal induction of alternative principal pathway for rose flower scent. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep20234>
- Hunter, D., & Reid, M. (2001). A simple and rapid method for isolating high quality RNA from flower petals. *Acta Horticulturae*, (543), 147-152. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2001.543.18>
- Infoagro. (2014). El cultivo de las rosas para corte. Quito, Pichincha, Ecuador.
- Invitrogen. (2016). *TRizol Reagent User Guide*. Obtenido de http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf
- Jabbarzadeh, Z., Khosh-khui, M., Salehi, H., & Saberivand, A. (2009). Optimization of DNA extraction for ISSR studies in seven important rose species of Iran. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 3, 639-642.
- Kadri, K. (2020). Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86491>
- Kraszewska, E. (2008). The plant Nudix hydrolase family. *Acta Biochim. Pol.* 55 (4), 663–671. PubMed
- Liu, L., Han, R., Yu, N., Zhang, W., Xing, L., Xie, D., & Peng, D. (2018). A method for extracting high-quality total RNA from plant rich in polysaccharides and polyphenols using *Dendrobium huoshanense*. *PLOS ONE*, 13(5), e0196592. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196592>
- Magnard, J., Rocchia, A., Caissard, J., Vergne, P., Sun, P., & Hecquet, R. et al. (2015). Biosynthesis of monoterpene scent compounds in roses. *Science*, 349(6243), 81-83. doi: 10.1126/science.aab0696

- Makovets, S. (2013). *DNA Electrophoresis: Methods and Protocols*. Humana Press Incorporated.
- Martín, K. (2020). *Reverse Transcriptase & cDNA Overview & Applications*. Obtenido de <https://www.goldbio.com/articles/article/Reverse-Transcriptase-cDNA-Overview-Applications>
- Nakamura, N., Hirakawa, H., Sato, S., Otagaki, S., Matsumoto, S., Tabata, S., & Tanaka, Y. (2018). Genome structure of *Rosa multiflora*, a wild ancestor of cultivated roses. *DNA research: an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, 25(2), 113–121.
doi:10.1093/dnares/dsx042
- Novaes, R., Rodrigues, J., & Lovato, M. (2009). An efficient protocol for tissue sampling and DNA isolation from the stem bark of Leguminosae trees. *Genetics And Molecular Research*, 8(1), 86-96.
<https://doi.org/10.4238/vol8-1gmr542>
- OPS Diagnostics. (2018). *CTAB Protocol for Isolating DNA from Plant Tissues*. Obtenido de [https://opsdiagnostics.com/notes/protocols/ctab_protocol_for_plants.htm#:~:text=The%20use%20of%20CTAB%20\(cetyl,purifying%20DNA%20from%20plant%20tissues](https://opsdiagnostics.com/notes/protocols/ctab_protocol_for_plants.htm#:~:text=The%20use%20of%20CTAB%20(cetyl,purifying%20DNA%20from%20plant%20tissues).
- Ouyang, K., Li, J., Huang, H., Que, Q., Li, P., & Chen, X. (2014). A simple method for RNA isolation from various tissues of the tree *Neolamarckia cadamba*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 28(6), 1008-1013.
<https://doi.org/10.1080/13102818.2014.981086>
- PREMIER Biosoft. (2019). *PCR Primer Design Guidelines*. Obtenido de http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html

- Rio, D., Ares, M., Hannon, G., & Nilsen, T. (2010). Purification of RNA Using TRIzol (TRI Reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(6), pdb.prot5439-pdb.prot5439. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5439>
- Scalliet, G., Piola, F., Douady, C., Rety, S., Raymond, O., & Baudino, S. et al. (2008). Scent evolution in Chinese roses. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 105(15), 5927-5932. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711551105>
- Schrick, L., & Nitsche, A. (2016). Pitfalls in PCR troubleshooting: Expect the unexpected. *Biomolecular Detection And Quantification*, 6, 1-3. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.11.001>
- Schulz, D.F., Schott, R.T., Voorrips, R.E., Smulders, M.J., Linde, M., and Debener, T. (2016). Genome-wide association analysis of the anthocyanin and carotenoid contents of rose petals. *Front Plant Sci*, 37(14). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01798>.
- Sipos, R., Székely, A., Palatinszky, M., Révész, S., Márialigeti, K., & Nikolausz, M. (2007). Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 60(2), 341-350. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00283.x>
- Smulders, M., Arens, P., Bourke, P. M., Debener, T., Linde, M., Riek, J., Foucher, F. (2019). In the name of the rose: a roadmap for rose research in the genome era. *Horticulture research*, 6, 65. doi:10.1038/s41438-019-0156-0
- Spiller, M., Linde, M., Hibrand-Saint Oyant, L., Tsai, C., Byrne, D., & Smulders, M. et al. (2010). Towards a unified genetic map for diploid roses. *Theoretical and Applied Genetics*, 122(3), 489-500. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1463-x>

- ThermoFisher Scientific. (2014). *Product information: GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit*. Obtenido de https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012668_GeneJET_Plant_RNA_Purification_UG.pdf
- ThermoFisher Scientific. (2016). *User Guide DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)*. Obtenido de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1081#/K1081>
- ThermoFisher Scientific. (2019). *PCR Cycling Parameters Six Key Considerations for Success*. Obtenido de <https://www.thermofisher.com/ec/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-cycling-considerations.html#:~:text=PCR%20cycle%20number%20determination,-PCR%20steps%20of&t>
- Tholl, D. (2015). Biotechnology of Isoprenoids. *Springer International Publishing*, 56(4),63–106.
- Vainstein, A., Lewinsohn, E., Pichersky, E., and Weiss, D. (2001). Floral fragrance: New inroads into an old commodity. *Plant Physiol.* 127, 1383–1389.
- Vásquez, C. (2018). *Cultivo de rosas en Ecuador*. Quito: Economía y Finanzas Internacionales.
- Weising, K., Nybom, H., & Wolff, K. (2005). *DNA fingerprinting in plants* (2nd ed., pp. 100-102). Boca Raton: Taylor & Francis.
- Wendt, J., & Izquierdo, J. (2002). Manejo y gestión de la biotecnología agrícola apropiada para pequeños productores: estudio de caso Ecuador. *Santiago de Chile*: FAO.

Zambrano, P. (2017). *Rosas: características, clasificación, aspectos a considerar en el cultivo de rosas en jardinería*. Obtenido de <https://naturaleza.paradise-sphinx.com/plantas/rosas-caracteristicas-clasificacion.htm>