

**UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE  
MENDOZA DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRÓNOMA**

**PROYECTO DE TESIS PARA OBTENER**

**EL TÍTULO PROFESIONAL DE**

**INGENIERO AGRÓNOMO**

**CARACTERIZACIÓN DE LA PÉRDIDA DE FUNCIÓN DE LOS GENES QUE  
CODIFICAN ENZIMAS DE LA VÍA DE ISOPRENOIDES DE MEVALONATO  
(MVA) EN (*Arabidopsis thaliana*)**

**Autor:**

**Gimena Vega Chavez**

**Asesor:**

**Dr. Juan Carlos Guerrero Abad**

**Código: (.....)**

**CHACHAPOYAS - PERÚ**

**2025**

## **1. Título**

Caracterización de la pérdida de función de los genes que codifican enzimas de la vía de isoprenoides de mevalonato (MVA) en *Arabidopsis thaliana*

## **2. Problema de la investigación**

La vía de mevalonato (MVA) es fundamental para la biosíntesis de isoprenoides, compuestos esenciales para el crecimiento, desarrollo y adaptación de plantas. En *Arabidopsis thaliana*, se desconoce en grandes detalles el impacto que tiene la pérdida de función de los genes que codifican las enzimas de esta vía molecular, fisiológicos y fenotípicos de las plantas. Con ello nos podemos preguntar ¿Cómo afecta la pérdida de función de estos genes la expresión genética asociada a la vía de mevalonato (MVA)? ¿Qué cambios fenotípicos se manifiestan en líneas mutantes homocigotas? ¿Cuáles son las características genotípicas de estos mutantes?

## **3. Objetivos**

### **3.1. Objetivo General**

Caracterizar de la pérdida de función de los genes que codifican enzimas de la vía de isoprenoides de mevalonato (MVA) en *Arabidopsis thaliana*

### **3.2. Objetivos Específicos**

Genotipar mutantes de los de genes que codifican enzimas de la vía de isoprenoides de mevalonato (MVA) en *Arabidopsis thaliana*

Evaluar el perfil de expresión génica de mutantes que codifican enzimas de la vía de isoprenoides de mevalonato (MVA) en *Arabidopsis thaliana*

Fenotipar líneas mutantes homocigotas de los de genes que codifican enzimas de la vía de isoprenoides de mevalonato (MVA) en *Arabidopsis thaliana*

## **4. Antecedentes de la investigación**

Tholl y Lee (2011) tienen un punto de vista acerca del metabolismo especializado en los terpenos en *Arabidopsis thaliana*, está siendo una de las plantas modelos más

estudiadas a nivel de la biología vegetal, cuyo representa un papel fundamental para la producción de diversos metabolitos secundario, incluyendo los terpenos, los cuales son esenciales para brindar defensa a la planta y también con su interacción con el medio ambiente. Estos que incluyen compuestos como los monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos, los cuales cumplen con roles en la señalización celular, la protección contra estrés oxidativo y la comunicación entre plantas. En este estudio se enfoca en los mecanismos moleculares detrás de la biosíntesis de terpenos, proporcionando una visión precisa y claro frente al impacto de estos compuestos en la fisiología de las plantas. Y no solo haciendo un énfasis en conocimiento sobre la biosíntesis de terpenos en *Arabidopsis*, sino asimismo la mejora de la producción de compuestos bioactivos en plantas mediante biotecnología.

El trabajo de Vranová, Coman y Gruissem (2013), realiza un enfoque en dos principales vías de biosíntesis de isoprenoides en las plantas; la vía de mevalonato (MVA) y la vía de metileritritol fosfato (MEP). El estudio que tiene el enfoque en estas dos rutas se ve que son responsables de la producción de compuestos cruciales como los terpenos, los carotenoides y las hormonas vegetales. Se muestra como estas rutas metabólicas no solo producen compuestos esenciales para la planta, sino también que hay una interacción entre sí, con ello afectando su eficiencia y la regulación de los metabolitos secundarios. Se puede ver como esta interconexión de las vías puede influir en cuanto al rendimiento de las plantas y a al rendimiento de las plantas. Nos da a conocer como las plantas pueden establecer una coordinación de sus procesos metabólicos para poder sintetizar isoprenoides, con implicaciones para la ingeniería metabólica.

La vía mevalónica (MVA) y la vía de deoxi-xilulosa-5-fosfato (DXP), presentan una comparación entre las dos rutas, recalcando sus orígenes evolutivos en diferentes dominios de la vida. La vía del mevalonato se encuentra en arqueobacterias y algunos eucariotas, mientras que la vía de DXP está presente en la mayoría de las eubacterias y en plastidios de eucariotas fotosintéticos. Estas vías no solo son cruciales para la producción de compuestos esenciales como esteroides, terpenos y carotenoides, sino que también revelan un interesante caso de transferencia horizontal de genes entre eubacterias y eucariotas. Se proponen que las diferencias entre estas rutas reflejan los procesos evolutivos de la vida celular temprana y cómo las plantas adquirieron las capacidades para producir estos compuestos esenciales a lo largo de su evolución. El estudio es valioso para la comprensión de la biogénesis de isoprenoides y su relevancia en la evolución de los organismos, con implicaciones para la biotecnología agrícola y la mejora de cultivos mediante la manipulación de estas rutas (Lange et al., 2000).

Miziorko (2011) proporciona una revisión detallada de las enzimas que intervienen en la vía del mevalonato (MVA), una ruta biosintética clave para la formación de isoprenoides en organismos eucariotas y algunas eubacterias. Los aspectos funcionales y estructurales de las enzimas principales de esta vía, incluyendo HMG-CoA reductasa, que

es un objetivo terapéutico importante para la regulación del colesterol en humanos, y la mevalonato quinasa. Mizioroko también analiza las diferencias entre las enzimas de la vía MVA en bacterias, plantas y animales, proporcionando información sobre cómo las mutaciones en estas enzimas pueden alterar la producción de isoprenoides. Además, discute el impacto de las enzimas de la vía MVA en la formación de compuestos bioactivos esenciales como los esteroides y los terpenos, que son cruciales para la defensa de las plantas y su adaptación a factores ambientales. Se puede apreciar la gran utilidad para aquellos interesados en la ingeniería metabólica y la mejora de cultivos, ya que ofrece una base sólida para comprender cómo los isoprenoides pueden ser manipulados para optimizar el rendimiento de las plantas.

En su estudio, Rodríguez-Concepción et al. (2004) investigan cómo las vías mediadas por la luz regulan la biosíntesis e intercambio de precursores de isoprenoides durante el desarrollo de *Arabidopsis thaliana* en la fase de plántula. Los investigadores identifican que la luz no solo influye en la fotosíntesis, sino que también regula la producción de compuestos esenciales para la planta, como los carotenoides y los terpenos, que juegan roles cruciales en la defensa frente a patógenos y en la respuesta a estrés ambiental. Los autores discuten cómo la luz activa distintas rutas metabólicas que, a su vez, modulan la expresión génica de las enzimas que participan en la biosíntesis de estos compuestos. Este artículo resalta la complejidad de la regulación metabólica en las plantas, mostrando cómo las señales ambientales como la luz pueden integrar las respuestas metabólicas que afectan el crecimiento y la adaptación de las plantas. Los hallazgos de este trabajo son significativos tanto para la biología básica como para la mejora de cultivos mediante manipulación genética.

## **5. Hipótesis**

La pérdida de función de los genes que codifican las enzimas de la vía de mevalonato (MVA) en *Arabidopsis thaliana* provoca un cambio significativo en el perfil de expresión génica, alterando la regulación de genes relacionados con el metabolismo de isoprenoides y otros metabolitos secundarios.

## **6. Metodología**

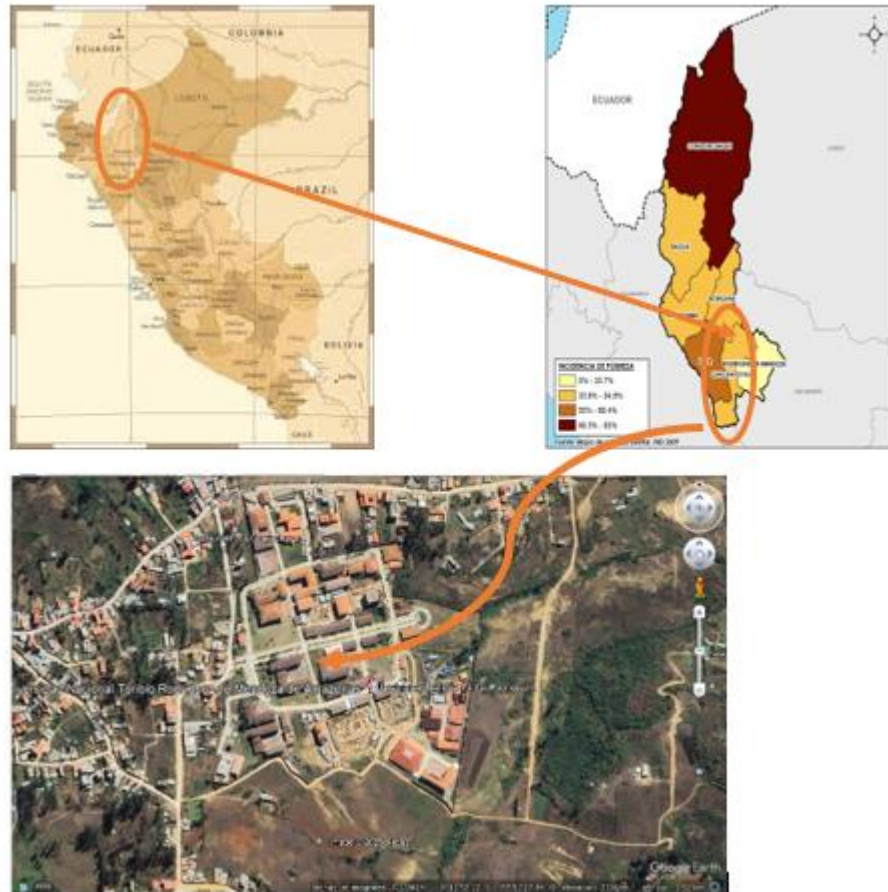
### **6.1. Área de estudio**

El estudio se llevará a cabo en la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza-Chachapoyas, en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas (LBMP), que forma parte del Instituto de Investigación, Innovación y Desarrollo para el Sector Agrario y Agroindustrial (IIDA). Este laboratorio está

especializado en la investigación genética y molecular de plantas, lo que permite realizar experimentos controlados y análisis precisos sobre la genética.

**Figura 1.**

Ubicación geográfica del área de estudio.



## 6.2. Población, muestra y muestreo

**Población:** La población del estudio está compuesta por plantas de *Arabidopsis thaliana* en diferentes etapas de crecimiento (plántulas, roseta, y plantas adultas) que presentan mutaciones en los genes de la vía de mevalonato (MVA). Estas líneas mutantes están disponibles en la base de datos de mutantes de *Arabidopsis* o serán generadas mediante técnicas de edición genética.

**Muestra:** La muestra estará compuesta por líneas mutantes homocigotas de *Arabidopsis thaliana*, así como de plantas silvestres o de tipo salvaje (control). Se seleccionarán mutantes en los genes clave de la vía de mevalonato, como

HMG-CoA reductasa, mevalonato quinasa, y mevalonato diphosphate decarboxylase.

**Muestreo:** El muestreo será aleatorio dentro de las líneas mutantes y las plantas control, seleccionando plántulas homogéneas para asegurar representatividad. Se tomarán al menos 25 plantas de cada grupo para cada fase experimental, garantizando que la muestra sea lo suficientemente grande para la evaluación de las características fenotípicas y genéticas.

6.3. Variable del estudio

6.3.1. Variable independiente

Mutación en los genes que codifican las enzimas de la vía de mevalonato (MVA): Esto incluye las mutaciones inducidas por CRISPR/Cas9 o por mutantes disponibles en la base de datos.

6.3.2. Variable dependiente

Expresión génica de las enzimas de la vía MVA: La cantidad de ARN y proteínas de los genes de la vía de mevalonato se analizarán en función de la presencia o ausencia de las mutaciones.

Fenotipos morfológicos y fisiológicos: Incluye medidas de crecimiento (altura de planta, número de hojas, longitud y número de raíces, diámetro del tallo), tolerancia a estrés (estrés hídrico o salino), y producción de metabolitos secundarios (isoprenoides).

6.3.3. Operacionalización de variables

Cuadro 1

Variables evaluadas a lo largo del experimento.

Variab le	Definici ón concept ual	Definición operativa	Indicadore s	Instrum ento de medició n	Unid ad de medi da	Tipo de variab le	Méto do de análisis
Altura de planta	Longitu d total de la planta desde la	Medida de la altura desde la base al punto más alto	Altura (cm)	Regla métrica	cm	Cuanti tativa contin ua	ANO VA

	base al ápice						
Número de hojas	Total, de hojas visibles en la planta	Conteo directo de hojas por planta	N° de hojas	Observación directa	Unidad	Cuantitativa discreta	ANO VA
Longitud de raíz	Extensión total de la raíz principal	Medición desde la base hasta la punta de la raíz	Longitud (cm)	Regla metálica	cm	Cuantitativa continua	ANO VA
Diámetro del tallo	Grosor del tallo a una altura específica	Medición a 2 cm sobre el nivel del suelo	Diámetro (mm)	Calibrador digital	mm	Cuantitativa continua	ANO VA
Tolerancia al estrés salino	Capacidad de la planta para resistir salinidad	Observación de síntomas bajo solución salina	Clasificación (buena/media/pobre)	Observación directa	Categoría	Cualitativa ordinal	Chi-cuadrado
Tolerancia al estrés hídrico	Resistencia fisiológica a la falta de agua	Evaluación bajo condiciones de sequía	Clasificación (buena/media/pobre)	Observación directa	Categoría	Cualitativa ordinal	Chi-cuadrado
Mutación del gen MVA	Alteración genética inducida o natural en genes de la vía de	Identificación de mutaciones por PCR y secuenciación	Presencia/ausencia	PCR y electroforesis	Binaria (Sí/No)	Cualitativa nominal	Frecuencia y análisis cuali

mevalonato								
Presencia de marcador genético	Detección de genes marcados asociados a la mutación	Confirmación mediante amplificación genética	Presente/Ausente	PCR + Electroforesis	Binaria (Sí/No)	Cualitativa nominal	Frecuencia	
Nivel de ARNm	Cantidad relativa de ARN mensajero transcrito por los genes de la vía MVA	Cuantificación por qPCR normalizada con genes de referencia	Nivel de expresión relativa	qPCR + análisis Excel	Relativa (fold change)	Cuantitativa continua	ANOVA + correlación	
Nivel de proteína	Concentración relativa de proteína codificada por los genes de interés	Análisis mediante técnicas inmunológicas o espectrofotométricas	Expresión proteica relativa	Western blot / ELISA	Relativa	Cuantitativa continua	ANOVA	
Tipo de línea	Clasificación según origen genético de la planta	Identificación de si es mutante o silvestre	Silvestre / Mutante	Registro de semillas	Categórica nominal	Cualitativa nominal	Análisis descriptivo	



Etapas de desarrollo	Fase fenológica en la que se encuentra la planta	Determinación según calendario de desarrollo de <i>Arabidopsis</i>	Plántula, roseta, adulto	Observación fenológica	Categórica	Cualitativa ordinal	Descriptivo
----------------------	--	--	--------------------------	------------------------	------------	---------------------	-------------

Tipo de mutación	Método por el cual se generó la mutación	Identificación documental o por técnica usada	CRISPR/ T-DNA / Espontánea	Registro de origen genético	Categórica nominal	Cualitativa nominal	Descriptivo
------------------	--	---	----------------------------	-----------------------------	--------------------	---------------------	-------------

Cantidad de isoprenoides (HPLC)	Concentración de isoprenoides presentes en hojas/raíces medidas por cromatografía líquida	Extracción, purificación y cuantificación por HPLC	mg/g materia fresca	Cromatografía líquida HPLC	mg/g	Cuantitativa continua	ANOVA
---------------------------------	---	--	---------------------	----------------------------	------	-----------------------	-------

Cantidad de isoprenoides (MS)	Cuantificación precisa de isoprenoides y sus derivados mediante espectrometría	Medición de compuestos volátiles y no volátiles	mg/g materia fresca	Espectrometría de masas (MS)	mg/g	Cuantitativa continua	ANOVA
-------------------------------	--	---	---------------------	------------------------------	------	-----------------------	-------

de  
masas

## **6.4. Métodos**

### **6.4.1. Tipo y nivel de investigación**

La investigación será de tipo experimental, ya que se buscará manipular las condiciones genéticas de las plantas mediante la inducción de mutaciones específicas en los genes de la vía MVA y evaluar los resultados.

El nivel de la investigación será descriptivo y experimental. Se describirán los cambios fenotípicos y transcriptómicos inducidos por las mutaciones y se realizará un análisis causal mediante el diseño experimental.

### **6.4.2. Diseño de la investigación**

El diseño experimental será de Bloques completos aleatorios (BCA), ya que permite realizar comparaciones entre plantas mutantes y de control bajo las mismas condiciones experimentales. Este diseño será ideal para minimizar las variables externas y asegurar que los resultados sean atribuibles a la mutación en los genes de la vía de mevalonato.

Grupo experimental: Plantas de *Arabidopsis thaliana* con mutaciones en los genes clave de la vía MVA (mutantes homocigotos).

Grupo control: Plantas silvestres de tipo salvaje, que servirán como comparación para observar los efectos de la mutación.

### **6.4.3. Métodos, técnicas e instrumentos para la recopilación de datos**

#### **a) Genotipado**

- PCR para la amplificación de los genes de interés.
- Secuenciación de ADN para identificar mutaciones en los genes seleccionados.
- Electroforesis en gel de agarosa para visualizar productos amplificados y determinar la presencia de mutaciones.

#### b) Expresión génica

- Extracción de ARN total mediante kits comerciales (por ejemplo, RNeasy Plant Kit de Qiagen).
- Síntesis de cDNA utilizando reversa transcriptasa.
- qPCR (PCR en tiempo real) con sondas específicas para los genes de la vía MVA y genes de referencia.
- Análisis de expresión utilizando software como excel para la normalización de los resultados de expresión relativa.

#### c) Fenotipado

- Mediciones morfológicas: Se utilizarán reglas y calibres para medir la altura de las plantas, el número de hojas, el diámetro del tallo y la longitud de las raíces.
- Evaluación de tolerancia al estrés: Para someter las plantas a condiciones de estrés hídrico o salino, y observar la aparición de síntomas como el amarillamiento de las hojas, el marchitamiento y la caída de hojas.

#### d) Recopilación de datos de metabolitos secundarios

- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la cuantificación de isoprenoides y otros metabolitos secundarios en hojas y raíces.
- Espectrometría de masas (MS) para identificar y cuantificar metabolitos secundarios.

### 6.4.4. Evaluación de variables

Las variables dadas serán evaluadas sistemáticamente a lo largo de todo el año de implementación y estudio, conforme al cronograma experimental elaborado, las variables morfológicas, como la altura de planta, número de hojas, diámetro de tallo y longitud de raíz, se van a registrar cada quince días con ayuda de herramientas métricas. Las fisiológicas, como la tolerancia a estrés salino o hídrico, serán observadas bajo tratamientos controlados y categorizados cualitativamente en (buena, media, pobre).

En caso de las variables moleculares incluirán la presencia de mutaciones confirmadas por PCR/secuenciación, tipo de mutación (CRISPR, T-DNA, espontánea) y el tipo de línea ya sea (mutante o silvestre). Las variables de expresión genética (niveles de ARNm y proteínas) se evaluarán con qPCR y técnicas inmunológicas.

Por último, las variables bioquímicas, como la cantidad de isoprenoides, que serán determinadas a través de análisis instrumentales (HPL y MS). Mencionando dichas mediciones serán analizadas fenológicas (plántula, roseta, adulto), lo cual nos va a permitir la interpretación integral del efecto funcional de la mutación.

#### 6.4.5. Cronograma

Actividades	Se p	O ct	No v	Di c	En e	Fe b	Ma r	Ab r	Ma y	Ju n	J ul	Ag o	Sep (final)
Revisión bibliográfica	●	●											
Adquisición y preparación de semillas	●	●											
Siembra experimental		●											
Genotipificación inicial		●	●										
Evaluaciones morfológicas			●	●	●	●	●	●	●	●	●		
Evaluación de estrés abiótico			●	●	●	●	●	●	●	●	●		
Extracción y análisis de ARN					●	●	●	●					
qPCR (expresión génica)						●	●	●					
Análisis de proteínas (opcional)							●	●	●				
Cuantificación de isoprenoides (HPLC)								●	●	●			

Análisis por espectrometría de masas										•	•	•		
Registro en libro de campo	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
Procesamiento y análisis de datos											•	•	•	
Redacción de resultados y discusión												•	•	
Correcciones y entrega final													•	•

## 6.5. Análisis de datos

Análisis de varianza (ANOVA) para comparar las medias entre las diferentes variables fenotípicas (altura de planta, número de hojas, etc.) y verificar la significancia estadística de las diferencias observadas entre los grupos de mutantes y controles.

Para los análisis estadísticos se empleará R.

Interpretación de datos: Se interpretarán las diferencias fenotípicas y transcriptómicas observadas entre los mutantes y los controles en función de las mutaciones en los genes de la vía MVA.

Se correlacionarán los resultados de expresión génica con los cambios fenotípicos para determinar el impacto funcional de las mutaciones en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.

### 6.5.1. Colecta de datos.

Las muestras serán recolectadas directamente de invernadero y laboratorio experimental de LBMP. Se hará una selección aleatoria de las plantas con fenotipo homogénea por cada etapa de desarrollo. Las hojas y raíces serán extraídas con todos los cuidados y protocolos del laboratorio para poder realizar el análisis molecular y metabolómicos. Y se almacenaran cuidadosamente.

### 6.5.2. Libro de campo

Se utilizará un libro digital y físico para la toma de datos

- Fecha de siembra y etapas fenológicas.
- Condiciones ambientales.
- Observaciones fenotípicas.
- Resultados de PCR Y qPCR
- Registros de estrés reducido.
- Análisis de metabolitos.

## 7. Referencias bibliográficas

Kasahara, H., Hanada, A., Kuzuyama, T., Takagi, M., Kamiya, Y., & Yamaguchi, S. (2002). Contribution of the Mevalonate and Methylerythritol Phosphate Pathways to the Biosynthesis of Gibberellins in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 45188–45194. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208659200>

Lange, B.M., Rujan, T., Martin, W., & Croteau, R. (2000). Isoprenoid Biosynthesis: The Evolution of Two Ancient and Distinct Pathways across Genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 13172–13177. <https://doi.org/10.1073/pnas.240454797>

Meinke, D.W., Cherry, J.M., Dean, C., Rounsley, S.D., & Koornneef, M. (1998). *Arabidopsis Thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science*, 282, 662–682. <https://doi.org/10.1126/science.282.5389.662>

Miziorko, H.M. (2011). Enzymes of the Mevalonate Pathway of Isoprenoid Biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 505, 131–143. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.09.028>

Nagata, N., Suzuki, M., Yoshida, S., & Muranaka, T. (2002). Mevalonic Acid Partially Restores Chloroplast and Etioplast Development in *Arabidopsis* Lacking the Non-Mevalonate Pathway. *Planta*, 216, 345–350. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0871-9>

Pruitt, R.E., & Meyerowitz, E.M. (1986). Characterization of the Genome of *Arabidopsis Thaliana*. *Journal of Molecular Biology*, 187, 169–183. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90226-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90226-3)

Rodríguez-Concepción, M., Forés, O., Martínez-García, J. F., González, V., Phillips, M. A., Ferrer, A., & Boronat, A. (2004). Distinct Light-Mediated Pathways Regulate the Biosynthesis and Exchange of Isoprenoid Precursors during *Arabidopsis* Seedling Development. *The Plant Cell*, 16(1), 144–156. <https://doi.org/10.1105/tpc.016204>

Tholl, D., & Lee, S. (2011). Terpene Specialized Metabolism in *Arabidopsis Thaliana*. *The Arabidopsis Book*, 9, e0143. <https://doi.org/10.1199/tab.0143>

Vranová, E., Coman, D., & Gruissem, W. (2013). Network Analysis of the MVA and MEP Pathways for Isoprenoid Synthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 665–700. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120116>