



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL
GEN HMG-CoA REDUCTASA DE YUCA
(*Manihot esculenta*, Crantz) EVALUANDO SU
EXPRESIÓN MEDIANTE UNA PCR EN
TIEMPO REAL**

***TRABAJO ESPECIAL DE
GRADO***

*Presentado ante la ilustre
Universidad Central de
Venezuela, por el bachiller María
Alejandra Rangel Vásquez como
requisito parcial para optar por
el título de Licenciada en
Biología.*

Tutor: Dr. Diógenes Infante

CARACAS, VENEZUELA
ABRIL 2010

Resumen

Rangel V. María A.

Aislamiento y caracterización del gen HMG-CoA reductasa de yuca (*Manihot esculenta*, Crantz) evaluando su expresión mediante una PCR en tiempo real

Tutor: Dr. Diógenes Infante. Trabajo Especial de Grado. Caracas, U.C.V. Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. 2.010, N°

Palabras claves: gen HMG-CoA reductasa, 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa, yuca, manihot, PCR en tiempo real.

El cultivo de yuca es de suma importancia para combatir la desnutrición en el mundo, ya que es capaz de crecer en suelos pobres y con gran sequía. Sin embargo el rápido deterioro post-cosecha resulta en pérdidas del 90% de la siembra total, por esto se han dirigido las investigaciones en biotecnología, al desarrollo de plantas de yuca resistentes a enfermedades e insectos.

El gen HMG-CoA reductasa (3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa) regula la ruta metabólica del mevalonato que desencadena en la producción de metabolitos secundarios, como las fitoalexinas, compuestos que le confieren a la planta resistencia contra microorganismos patógenos y plagas. Por lo tanto se cree que el estudio de este gen y su posterior manipulación podría ayudar a disminuir el deterioro post-cosecha de los cultivos de yuca.

Como objetivo inicial de este trabajo se planteó el clonamiento del gen HMG-CoA reductasa, utilizando la estrategia propuesta por Sambrook (2.001), para luego secuenciar el clon completando la secuencia parcial del gen de 1.907 pb, que fue obtenida en investigaciones previas en el laboratorio de Biotecnología Agrícola del IDEA. La publicación del genoma de yuca en noviembre de 2.009, permitió identificar la secuencia del gen HMG-CoA reductasa y enfocar el trabajo a la caracterización molecular de este gen en la planta de yuca.

El análisis *in silico* posibilitó la identificación de la secuencia del gen HMG-CoA reductasa en 2.493pb ordenados en 4 exones y 3 intrones, con una similitud de 97,7% del mismo gen en otras especies de plantas. El análisis de la organización la secuencia facilitó el diseño de dos pares de cebadores, para la evaluación mediante una PCR en tiempo real de los niveles de expresión del gen HMG-CoA reductasa en diferentes condiciones fisiológicas. Pero no se pudo medir la expresión debido a errores en la estandarización de la PCR, luego de normalizar las condiciones de temperatura, concentración de cloruro de magnesio y concentración de ADN se realizó la PCR en tiempo real cuyos resultados preliminares se presentaron en este trabajo.

Dedicatoria

A los que quieren pero no pueden, porque si se puede.

Agradecimientos

Quiero agradecer a Dios por la vida y oportunidades que me ha dado.

A mis padres Marbeliz y Jesús quienes siempre han sido un modelo y ejemplo a seguir, impulsándome durante toda mi vida a ser mejor persona y motivándome en los estudios para concluir satisfactoriamente mi carrera universitaria.

A mi hermano Carlos quien me ha servido de soporte y ha sido un gran compañero en todas las etapas de mi vida.

A mi novio Néstor quien con su amor, paciencia y solidaridad me ha acompañado en la última fase de mi carrera y ha estado para mí, siempre que lo he necesitado.

A Fiona, María Lourdes y Valeria, que más que amigas son como mis hermanas y cuyo apoyo incondicional he tenido siempre.

A mi tutor Diógenes Infante por asesorarme y haberme brindado la oportunidad de realizar mi tesis en el laboratorio de Biotecnología de Plantas ubicado en el IDEA, donde conté con todo lo necesario para la culminación exitosa de este trabajo.

A todo el personal del laboratorio de Biotecnología Agrícola por su hospitalidad y ayuda brindada cuando lo necesitaba.

Al Ministerio del Poder Popular para Ciencia y Tecnología e Industrias Intermedias (MPPCTII), quien financió el proyecto: “Aportes al desarrollo de un modelo productivo en el cultivo de la yuca (*M. esculenta*)”, al cual estaba adscrito este trabajo de investigación.

Al personal del IDEA Beatriz Pernía, Ysvic Inojosa, Angela De Sisto, Leopoldo Naranjo y Pedro Graterol, cuyos consejos me guiaron para un mejor desarrollo de los resultados y de la metodología descrita en este trabajo, aclarando mis dudas y mejorándolo.

A las profesoras Guillermina Alonso, Palmira Guevara y Aura Falco por sus asesorías prestadas a mi persona, quienes con sus constantes preguntas e intervenciones enriquecieron este trabajo.

Abreviaturas

- ◆ CaCl_2 – Cloruro de calcio.
- ◆ Et – Eficiencia de transformación.
- ◆ FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
- ◆ G3PDH – Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa.
- ◆ HCN – ácido cianhídrico.
- ◆ HMG-CoA reductasa – 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa.
- ◆ JGI – Joint Genome Institute.
- ◆ Kb – kilo bases.
- ◆ MS – metabolismo secundario.
- ◆ Pb – pares de bases.
- ◆ PCR cuantitativa – qPCR.
- ◆ qPCR – *quantitative Polymerase Chain Reaction*.
- ◆ SREBP – *Sterol Regulatory Element Binding Proteins*.
- ◆ T_m – Temperatura de melting o de fusión.
- ◆ U – Unidad.
- ◆ UTR – (*UnsTranlated Region*).

Índice

◆	Introducción.....	1
	● Taxonomía y Morfología de la planta de yuca.....	1
	● Cultivo de yuca.....	2
	● Metabolismo Primario y Secundario.....	7
	● Metabolómica.....	10
	● El gen 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa.....	10
	● PCR en tiempo real.....	13
	● PCR inversa.....	14
	● Rutas metabólicas.....	15
◆	Antecedentes.....	20
	● Antecedentes internacionales.....	20
	● Proyecto Genoma de Yuca.....	23
	● Antecedentes nacionales.....	24
◆	Justificación.....	25
◆	Objetivos.....	26
◆	Plan de trabajo.....	27
◆	Materiales y métodos.....	30
	● Materiales y métodos de la clonación del gen HMG-CoA reductasa.....	30
	● Materiales y métodos de la identificación <i>in silico</i> y caracterización del gen HMG-CoA reductasa.....	35
	● Materiales y métodos del aislamiento de ARN.....	35
◆	Resultados.....	40

● Resultados de la clonación del gen HMG-CoA reductasa.....	40
● Resultados de la identificación <i>in silico</i> y caracterización del gen HMG-CoA reductasa.....	49
● Resultados del aislamiento de ARN	58
◆ Discusión de Resultados.....	66
◆ Conclusiones.....	74
◆ Recomendaciones.....	75
◆ Referencias bibliográficas.....	76

Introducción

Taxonomía y Morfología de la planta de yuca

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es un arbusto perenne que alcanza los tres metros de altura. Posee características taxonómicas y morfológicas resaltantes que las diferencian de otras plantas, como por ejemplo:

- ◆ Tallo. Puede tener posición erecta, inclinada y acostada. Según la variedad de la yuca, el tallo podrá tener ninguna, dos, tres o más ramificaciones primarias, siendo el de tres ramificaciones el mayoritario en la yuca. El grosor del tallo se mide a 20 cm del suelo y puede ser delgado (menos de 2 cm de diámetro), intermedio (2-4 cm) y grueso (más de 4 cm). Al carácter del grosor del tallo se le ha asociado el alto rendimiento en raíces de reserva. Los entrenudos pueden ser cortos (hasta 8 cm), medios (8-20 cm) y largos (más de 20 cm).
- ◆ Hojas. Son de forma palmipartida con 5, 6 o 7 lóbulos, pueden tener forma ovalada o linear. Son simples, alternas, con vida corta y una longitud de 15 cm aproximadamente. Los peciolos son largos y delgados, de 20-40 cm de longitud y de un color que varía entre el rojo y el verde. La epidermis superior es brillante con una cutícula definida. Según la defoliación (pérdida de hojas) en la estación seca, las variedades de yuca pueden retener algo de follaje, o gran parte de follaje (60% aproximadamente).
- ◆ Flores. La planta es una especie monoica por lo que la planta produce flores masculinas y femeninas. Las flores femeninas se ubican en la parte baja de la planta,

y son menores en número que las masculinas, que se encuentran en la parte superior de la inflorescencia.

- ◆ Sistema radicular. Está formado por la corteza externa llamada súber o corcho, la corteza media formada por felodermis sin esclerénquima, posee un bajo contenido de almidón y alto en compuestos cianogénicos, la corteza interna constituida por parte del parénquima de la corteza primaria, floema primario y secundario, y por último, el cilindro central está formado básicamente por el xilema secundario (Ceballos, 2.002).

Cultivo de yuca

La yuca, conocida también como cassava o mandioca, es un cultivo que constituye parte importante en la dieta de millones de personas en Asia, África y América Latina. El cultivo está muy bien adaptado a condiciones subtropicales, suelos pobres, requiere altos niveles de humedad y de sol para crecer. En las variedades (cruces entre la misma especie, para obtener características diferentes de las plantas originales) actualmente cultivadas, la yuca se reproduce mejor por esquejes o gajos que por semilla (Rallt, 2.006).

En algunos pueblos amazónicos se manejan decenas de variedades de yuca adaptadas a distintos tipos de suelos, de usos, de regímenes climáticos, etc. Las yucas amargas fueron desarrolladas por las poblaciones amazónicas como un método de control de las plagas de insectos. En Asia, la yuca también tiene importancia, pero no como cultivo para el consumo humano, sino para alimentar animales. En países como Brasil, se ha dado un uso industrial a la yuca como fuente de biocombustibles desde hace algunas décadas y

en la actualidad, proyectos de este tipo se están llevando a cabo también en países como Colombia, Nigeria, Tailandia, China e Indonesia (Rallt, 2.006).

El cultivo de yuca es consumido por millones de personas, a pesar de que es una planta cianogénica, es decir, que puede sintetizar bajo determinadas condiciones al ácido cianhídrico, este se forma cuando se cortan o trituran las plantas o las partes que contienen glucósidos (Ceballos, 2.002).

La toxicidad de la yuca ha recaído en el alto contenido de HCN (ácido cianhídrico) generado en algunas variedades de yuca. Esta sustancia es un potente inhibidor de la respiración celular. Su afinidad por iones metálicos como el cobre o el hierro, hace que al combinarse con el hierro de la hemoglobina y con el cobre de la citocromo oxidasa, causen depresión neuronal de los centros moduladores, conllevando así a problemas respiratorios y según la intensidad provocando la muerte (Ceballos, 2.002).

Si bien las consecuencias de la intoxicación dependen de la dosis, la frecuencia de su ingestión, así como el estado nutricional del individuo, no sólo el consumo de variedades amargas de yuca, sino también las variedades dulces pueden resultar peligroso para las personas o animales. La yuca dulce contiene hasta 50 veces menos proporción de cianuro, no obstante la concentración de glucósidos cianogénicos en la raíces se puede ver afectada por las condiciones ambientales en las que se han cultivado, por tanto las raíces han de ser sometidas a un tratamiento previo, para evitar cualquier intoxicación, como secado al sol varios días del tubérculo o cocción a más de 100° C antes del consumo (Ceballos, 2.002).

Este tubérculo en el 2008 fue declarado por la FAO como uno de los cultivos claves para combatir la desnutrición, ya que en su volumen se puede llegar a encontrar hasta 35% de carbohidratos y 1,5% de proteínas, además posee gran capacidad de crecer y reproducirse en condiciones severas (suelos pobres y con poca irrigación) por lo que se siembra a lo largo de todos los países tropicales sirviendo para alimentar diariamente a 600 millones de personas en América Latina, Asia y África (Rallt, 2.006).

A pesar de su importancia, el rendimiento promedio del cultivo de yuca es menor del 10% de su potencial (Rallt, 2.006), por lo que desde hace algunos años se han desarrollado programas de investigación en biotecnología aplicada a este cultivo, como es el caso del desarrollo de plantas de yuca genéticamente modificadas con un aumento en la resistencia a enfermedades e insectos (Taylor y col., 2.004).

Entre las enfermedades fúngicas más comunes que padece la planta se encuentran:

- ◆ Mancha parda de la hoja. Causada por *Cercospora henningsii*. Es una de las enfermedades más importantes de la yuca y los síntomas que provoca son manchas marrones, más definidas en el haz que en el envés de la hoja y las nervaduras pueden aparecer de color negro.
- ◆ Mancha blanca de la hoja. Causada por *Cercospora caribae*. El hongo penetra en la planta a través de los estomas, invadiendo posteriormente los espacios intercelulares, este organismo fitopatógeno sobrevive en la época seca sobre los tejidos viejos infectados, para volver a iniciar su actividad en el periodo de lluvias. Es una enfermedad frecuente en los periodos húmedos y frescos, causando un

pérdida de color en la hoja tornándose amarilla, en el centro de esta aparece un color pardo en cuyo borde en ocasiones aparece una línea irregular pardo-violeta.

- ◆ Ceniza o mildiu. Causada por *Oidium* sp. Esta enfermedad aparece en la época seca y ataca preferentemente a las hojas más desarrolladas, provocando lesiones amarillentas y en ocasiones aparecen áreas necróticas de color marrón. Pudiendo llegar hasta provocar la defoliación de la planta.
- ◆ Añublo pardo fungoso. Causada por *Cercospora vicosae*. Suele presentarse donde aparece la mancha parda y los síntomas son manchas grandes de color marrón, siendo marrón grisáceo en el envés. Puede ocasionar defoliaciones severas en variedades susceptibles, ocasionando grandes pérdidas en la cosecha.
- ◆ Pudrición seca del tallo y la raíz. Causada por *Diplodia manihotis*. En esta enfermedad aparece una pudrición radical que conllevará a la muerte de la planta. También ataca el material de propagación almacenado, sobre todo en condiciones de alta humedad relativa, y a los restos de tallos que se han dejado en el terreno (Ceballos, 2.002).

La enfermedad bacteriana más común es:

- ◆ Bacteriosis, pudrición. Causada por *Xanthomonas manihotis*. Es una enfermedad importante en Argentina, Paraguay y Brasil que provoca el marchitamiento de las hojas y la exudación de goma, esta enfermedad aparece el extremo de las ramas, secándose las hojas nuevas (Ceballos, 2.002).

Las principales plagas de la planta de yuca son:

- ◆ El taladrador de tallos y ramas. Causada por *Coelostermus* sp. Las larvas hacen galerías en los cultivos que pueden llegar a los 13 mm.
- ◆ Gusano de la hoja. *Erinnyis ello*, es un lepidoptera. Esta es una plaga importante que ataca por toda América y acaba con las hojas de la yuca y otras plantas.
- ◆ "Mosquinha dos mandiocais" o "Broca dos brotes". *Lonchaea pendula*. Es una de las plagas más importantes de América. La mosca coloca los huevos en los brotes, llegando a acabar con las hojas en desarrollo.
- ◆ Ácaros. Atacan en la época seca provocando decoloración y deformación de las hojas, ocasionando la caída de las mismas. Desorganiza todo el proceso de crecimiento de la planta, provocando acortamiento de los nudos y la muerte en los extremos apicales, incluso en toda la planta (Ceballos, 2.002).

Si la planta de yuca resiste a las enfermedades y plagas mencionadas anteriormente, se procede a la recolección del cultivo. Un indicador de que la yuca se encuentra próxima a la madurez es el quebramiento del suelo alrededor de la planta. Suele cosecharse entre los 7 y los 10 meses posteriores a la siembra, en función de la variedad. Es importante no adelantarse demasiado a la cosecha pues tendrá demasiado contenido en látex y no será apto para el consumo. Entre los 12-24 meses del ciclo de cultivo es el periodo óptimo para la recolección de la yuca cuando su destino es la industria del almidón, pues es cuando se alcanza el máximo rendimiento en raíces. (Arismendi, 1.980).

La cosecha manual, es la más común y resulta más sencilla en suelos con una textura arenosa a franca. Previo a la cosecha, los tallos se cortan con un machete o una segadora rotativa a una altura de 10 - 15 cm del suelo, para luego arrancar las raíces entre 2 y 3 semanas antes de la cosecha. El corte se realiza para disminuir el deterioro fisiológico

de la raíz, a pesar de que ésta disminuirá el contenido en almidón y la calidad culinaria de la yuca después del corte. (Arismendi, 1.980).

En el período de post-cosecha, el método tradicional de almacenamiento de la yuca es enterrando las raíces en el suelo. En la India y el Este de África, las raíces que no pueden ser consumidas o procesadas inmediatamente son amontonadas en pilas y regadas con agua. Esta es una etapa muy importante, ya que el calentamiento excesivo de la raíz o la humedad abundante en el almacenamiento, producen alteraciones de la pulpa, manifestándose como puntos o franjas, primero azules que posteriormente se tornan marrones a través de los haces vasculares. Si no se almacena correctamente el cultivo, se descompone y acaba siendo invadido por organismos saprófitos. (Arismendi, 1.980).

Metabolismo Primario y Secundario

Los MS son compuestos orgánicos cumplen funciones específicas en las plantas, como proporcionar resistencia o protección contra microorganismos patógenos o herbívoros, pero no tienen un rol directo en el crecimiento o reproducción de la misma y por esto se denominan secundarios. Hay que tener en cuenta que la diferencia entre los metabolitos primarios y secundarios es sólo funcional (no pueden ser distinguidos en base a moléculas precursoras, ni estructura química, ni origen biosintético), por lo que la diferencia entre las vías bioquímicas es difusa y a veces un compuesto considerado metabolito primario, por la acción de una sola enzima se convierte en lo que se considera un MS (Taiz y Zeiger, 2.006).

Los MS comprenden los alcaloides, los isoprenoides y los fenilpropanoides; y son codificados por “genes específicos de resistencia”, la interacción de estos genes con los

“genes específicos de virulencia”, desencadena una reacción bioquímica en la planta para sintetizar las sustancias de defensa contra microorganismos. Estas sustancias se sintetizan en pocas horas, principalmente en respuesta a una infección y se denominan fitoalexinas, que a su vez, comprenden un gran número de sustancias con diferentes estructuras como los isoprenoides o los flavonoides; de los cuales muchos son antibióticos contra un amplio espectro de patógenos y bacterias (Hans-Walter, 2.005).

La síntesis de varias sustancias de defensa es inducida por los elicitores, estos son frecuentemente proteínas excretadas por los patógenos al atacar las células vegetales. Los elicitores también pueden ser fragmentos de la pared celular del patógeno, los cuales están unidos a receptores específicos en el exterior de la superficie de la membrana plasmática de la pared celular y que se liberan por acción de las enzimas de defensa de la planta. La unión de los elicitores con la membrana plasmática libera señales de cascada de proteínas quinasas y sustancias señales como el ácido salicílico y el ácido jasmónico, que finalmente inducen la transcripción de genes para la síntesis de fitoalexinas como los isoprenoides (Hans-Walter, 2.005).

Los isoprenoides, algunas veces referidos como terpenoides, son una vasta y diversa clase de compuestos orgánicos similares a los terpenos. Los terpenoides pueden estar formados por unidades de 5 carbonos, como el isopreno (precursor del isopentenil difosfato) (Katsuyoshi y col., 2.003). Las plantas superiores contienen enzimas para sintetizar isoprenoides a partir de una forma básica de isopreno, mediante dos rutas biosintéticas diferentes, una en el citosol y otra en los plastidios, estos procesos ocurren de manera diferente en ambos compartimientos (Hans-Walter, 2.005).

Konrad Bloch (Hans-Walter, 2.005) descubrió que el “acetil-CoA” es el precursor de la biosíntesis de los esteroides en el citosol por la ruta del “Acetato-mevalonato” (figura 1). Esta ruta es bloqueada por el “mevilonin”, el cual es un inhibidor específico de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa. Se ha demostrado que el mevilonin inhibe la síntesis de isoprenoides en el citosol pero no en los plastidios, ya que la ruta de síntesis es diferente. En los plastidios, los precursores de la síntesis de esteroides son el piruvato y el D-gliceraldehido-3-fosfato (figura 2), formando el 1-desoxi-D-celulose-5-fosfato (DOXP), y sus siglas le dan el nombre a esta ruta, la “DOXP- sintasa” (Hans-Walter, 2.005).

En el citosol el acetil-CoA es esencial para la elongación y producción de los ácidos grasos, la deposición de suberina en la cutícula de las células y también se necesita en la producción de flavonoides e isoprenoides, constituyendo un elemento clave en diferentes rutas metabólicas. El acetil-CoA no puede pasar a través de las membranas celulares pero aparentemente los derivados de él si pueden. Por ejemplo, el isopentenil pirofosfato tiene una permeabilidad variable pudiendo pasar de un compartimiento a otro y se han encontrado moléculas de Acetoacetil-CoA en los peroxisomas (Oliver y col., 2.009). Las dos rutas metabólicas antes mencionadas, llevan a la formación de isopentenil pirofosfato y este produce la síntesis del geranylgeranyl pirofosfato (figura 3), que a su vez lleva a la formación del diterpeno “casbeno”, el cual forma una fitoalexina y es precursor de la síntesis de giberelinas y de carotenos (Hans-Walter, 2.005).

Los isoprenoides son sintetizados en grandes cantidades en tejidos especializados como las hojas o los pétalos y la síntesis a nivel transcripcional es regulada principalmente mediante la expresión de genes. Esto es evidente después de una infección o al producirse una herida, cuando el metabolismo de los isoprenoides es cambiado rápidamente por

elicitores que inducen la expresión de genes específicos de resistencia (Hans-Walter, 2.005).

Metabolómica

La metabolómica es un enfoque desarrollado mediante la integración de diversas disciplinas para estudiar de una manera global los metabolitos en un organismo. Este enfoque implica un acercamiento cuantitativo y cualitativo para todos los metabolitos presentes en un organismo. La genética clásica ha sido utilizada para seleccionar las mejores variedades cultivadas de una cosecha. Sin embargo, se ha hecho difícil clarificar las funciones de todos los genes sólo con técnicas genéticas, por lo tanto la metabolómica provee la posibilidad de aclarar cuáles son las funciones de un gen conectándolo a los metabolitos de ese organismo. Esta tecnología usa herramientas de análisis químico para la extracción de los metabolitos, bioinformática para el análisis de resultados y determinar sus niveles de expresión para poder comprender la biología del organismo estudiado (Oikawa y col., 2.008).

Si podemos entender los mecanismos y principios de la red metabólica, eventualmente podremos determinar cómo un organismo es capaz de alterar sus reacciones bioquímicas para crear diversos metabolitos secundarios bajo diferentes cambios bióticos y abióticos en su entorno (Gómez-Galera y col., 2.007).

El Gen 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa)

La HMG-CoA reductasa es una enzima dependiente de NADPH, que cataliza un paso clave en la ruta del mevalonato, la vía que produce colesterol en los animales (figuras

4 y 5) y los isoprenoides en las plantas. Para los animales, esta enzima es una proteína de membrana del retículo endoplasmático y está compuesta por 8 dominios transmembranas con el sitio activo localizado en el extremo carboxilo terminal en el citosol (Roitelman y col., 1.992). Pero en las plantas se diferencian solamente 2 dominios transmembranas con la misma localización del sitio activo (Stermer y col., 1.994).

La regulación de la enzima se realiza en varios niveles: transcripcional, traduccional y post traduccional (fosforilación). A nivel transcripcional se regula mediante las proteínas denominadas SREBP, factores de transcripción que estabilizan y regulan la síntesis de lípidos. Estas proteínas regulan la expresión de varios genes involucrados en la biosíntesis y captura del colesterol y reciben su nombre por unirse a una secuencia denominada SRE-1 (*Sterol Regulatory Element-1*) ubicada en la región 5' promotora de los genes del receptor de LDL (*Low-Density Lipoprotein*) y de las enzimas HMG-CoA sintasa y HMG-CoA reductasa (Sato 2.009; Shimano, 2.009).

Los miembros de esta familia de proteínas son SREBP-1 y SREBP-2, ambas están localizadas en el retículo endoplasmático con los extremos N y C terminales orientados hacia el citoplasma. Cuando los niveles de colesterol caen, el dominio N-terminal del SREBP se activa y es liberado del retículo endoplasmático para posteriormente entrar al núcleo y lo hace a través de pasos proteolíticos regulados por las proteasas denominadas S1P y S2P produciéndose la transcripción. Cuando los niveles de colesterol son elevados cesa la proteólisis del SREBP y no se degrada la proteína en el núcleo (Sato, 2.009; Shimano, 2.009).

Durante la traducción del ARN mensajero, la regulación viene dada por un compuesto derivado del mevalonato (el farnesol), una molécula que acelera la degradación de la enzima reductasa e inhibe la ruta metabólica (figura 1) del mevalonato (Meigs y col., 1.996).

La HMG-CoA reductasa es fosforilada e inactivada por el AMP activado, el cual obtiene este estado, por una proteína quinasa que también fosforila e inactiva una acetil-CoA carboxilasa. Ambas rutas utilizan acetil-CoA para la síntesis de lípidos y son inactivadas cuando la energía celular es baja y la concentración de AMP es elevada (Goldstein y col., 1.990).

Los inhibidores de la HMG-CoA reductasa disminuyen la cantidad de colesterol en la sangre y se llaman estatinas. Las aprobadas para uso médico son atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina, simvastatina y rosuvastatina, y se encuentran disponibles comercialmente (Liao, 2.002).

Las estatinas al inhibir esta enzima interfieren en la formación de isoprenoides a partir del mevalonato. Los isoprenoides como el farnesil pirofosfato y el geranylgeranyl pirofosfato, sirven para la modificación postraducciona de una gran variedad de proteínas, incluyendo la subunidad gamma de las proteínas G (caracterizadas por la fijación de GTP y su posterior hidrólisis a GDP) y las proteínas pequeñas unidoras de GTP (Liao, 2.002).

El bloqueo de la síntesis hepática del colesterol produce una activación de las proteínas reguladoras SREBP, que activan la transcripción de proteínas y por tanto, producen una mayor expresión del gen del receptor de LDL y un aumento en la cantidad de receptores funcionales en el hepatocito (Nissen y col., 2.004).

La atorvastatina es un inhibidor selectivo y competitivo de la HMG-CoA reductasa. En el hígado se incorporan los triglicéridos y el colesterol a las VLDL (*Very-Low-Density Lipoprotein*) y se liberan al plasma para su distribución en los tejidos periféricos. La atorvastatina reduce los niveles plasmáticos de colesterol y de las lipoproteínas inhibiendo en el hígado la HMG-CoA reductasa y la síntesis de colesterol (Malinowski, 1.998).

PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real también conocida como PCR cuantitativa o qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*), es una herramienta que permite cuantificar la expresión de genes, combinando tanto la sensibilidad y especificidad de la PCR con una detección eficiente de la señal por fluorescencia (Gutierrez, 2.008). Esta técnica se ha empezado a usar con el fin de monitorear la expresión de familias de genes en plantas (Gachon, 2.004), permitiendo cuantificar niveles de transcripción en genes de expresión débil (Czechowski y col., 2.004). La qPCR utiliza los mismos reactivos de la PCR convencional, un molde de ADN, cebadores específicos, dNTPs, un tampón y una polimerasa; pero a esa mezcla se le agrega un fluoróforo y con el uso de un termociclador acoplado a un sistema de detección especial (sensores para medir fluorescencia) se excita ese fluoróforo a una longitud de onda apropiada, lo que permite medir la tasa de generación de uno o más productos específicos, luego de cada ciclo de amplificación. En las técnicas basadas en fluoróforos inespecíficos como el SYBR Green, se detecta la generación exponencial de ADN cuando el SYBR se une a éste, pero en las técnicas basadas en sondas específicas se utiliza un oligonucleótido marcado fluorescentemente (Bustin 2.000).

Para que la técnica de PCR en tiempo real tenga éxito hay que tomar en cuenta algunas reglas que permitan la reproducibilidad del método y eliminar errores sistemáticos (Udvardi 2.008):

1. Las muestras se realizan por triplicado para facilitar el análisis estadístico de la data.
2. El aislamiento de ARN debe ser de alta calidad y pureza.
3. Digerir el ARN con DNAsas para eliminar los restos ADN.
4. Realizar una transcripción con una transcriptasa inversa que no tenga actividad de RNAsa.
5. Medir la calidad del ADN copia.
6. Diseñar cebadores con características específicas como T_m , % G-C y tamaño determinado de los cebadores y del fragmento a amplificar.
7. Estandarización de la técnica de PCR.
8. Usar un gen de expresión constitutiva, como control de la qPCR, para normalizar los resultados.
9. Realizar la qPCR para todas las muestras en tubos separados.
10. Calcular la transcripción relativa de cada gen estudiado.

PCR inversa

La PCR inversa es una variante de la técnica de PCR que permite realizar una amplificación de las regiones flanqueantes de un fragmento de ADN que solo se conoce su secuencia interna (Raponi y col., 2.000).

Esta técnica sirve para amplificar secuencias de ADN conocidas, pero flanqueadas por regiones de secuencia desconocida, cada una de las cuales incluye un sitio de

reconocimiento para la misma enzima de restricción. De tal manera que podemos cortar el DNA por estos sitios y ligar los extremos resultantes para formar un monómero circular. Los cebadores para la PCR son homólogos a los extremos de la región de ADN conocida, con sus extremos 5' y 3' en direcciones opuestas, de tal forma que la PCR amplificaría a través de la región de ADN cuya secuencia no se conoce. Este procedimiento ha sido utilizado para proseguir la identificación de algunos genes, así como para identificar y amplificar elementos transponibles o secuenciar ADN flanqueado por sitios de integración viral (Raponi y col., 2.000).

Rutas metabólicas

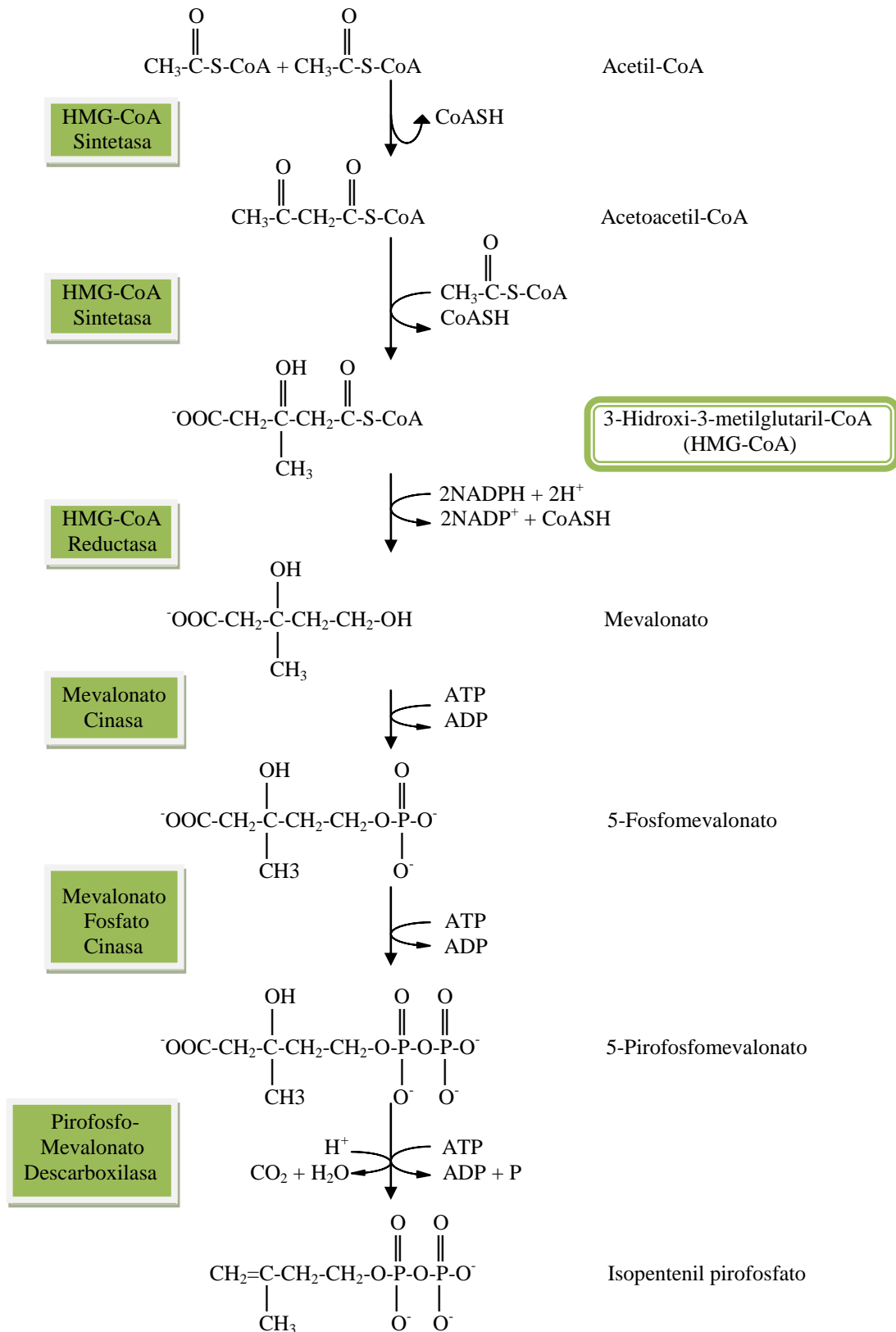


Figura 1. Síntesis del Isopentenil Pirofosfato en el citosol, vía Acetato-mevalonato. (Tomado de Hans-Walter, 2.005).

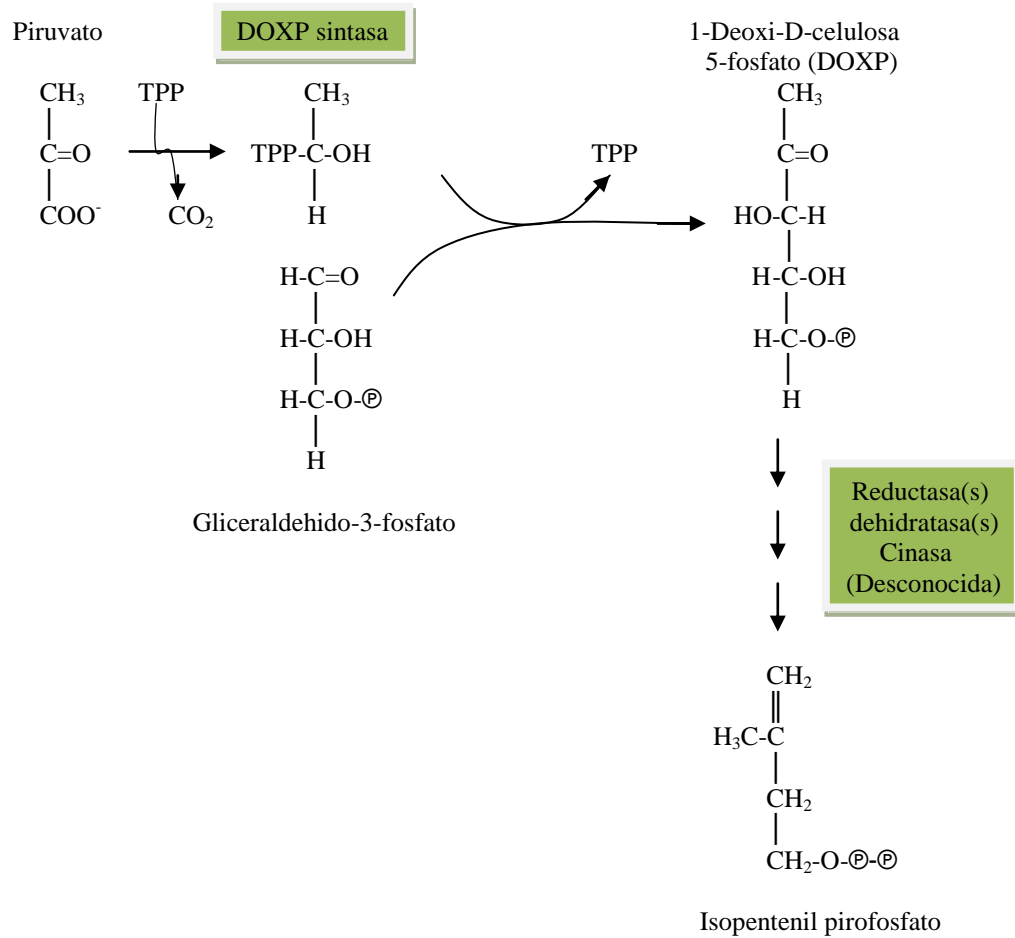


Figura 2. Síntesis del Isopentenil Pirofosfato en los plastidios, vía DOXP. (Tomado de Hans-Walter, 2.005).

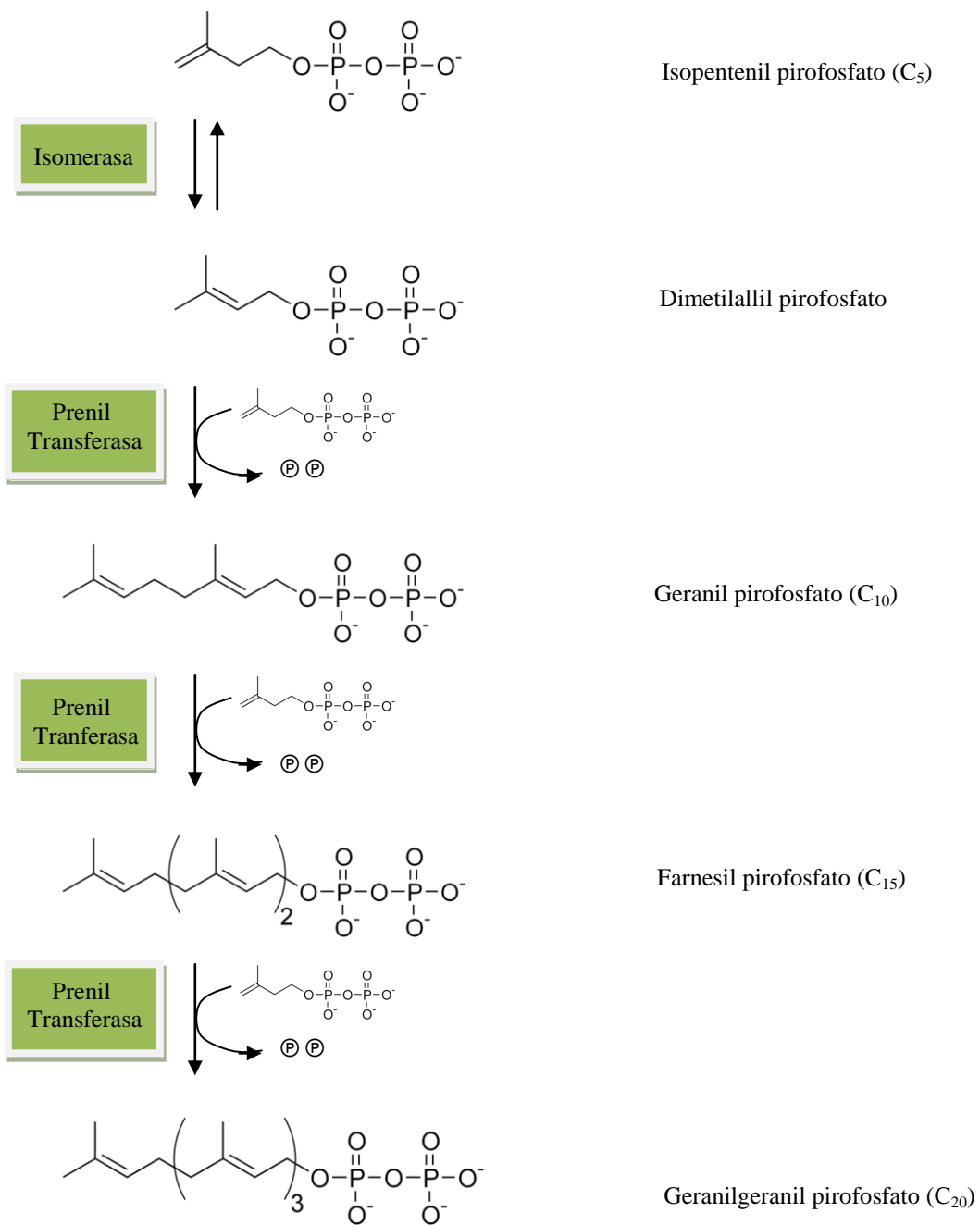


Figura 3. Síntesis del Geranilgeranil pirofosfato. (Tomado de Hans-Walter, 2.005).

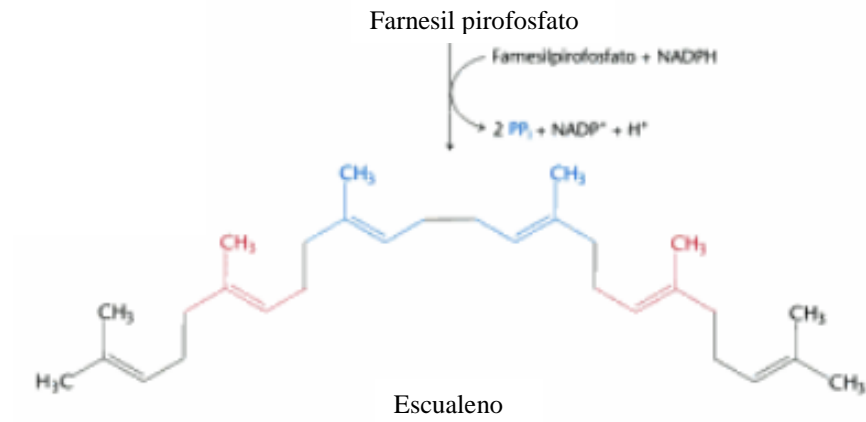


Figura 4. Formación del escualeno. (Tomado de Melo, 2.007).

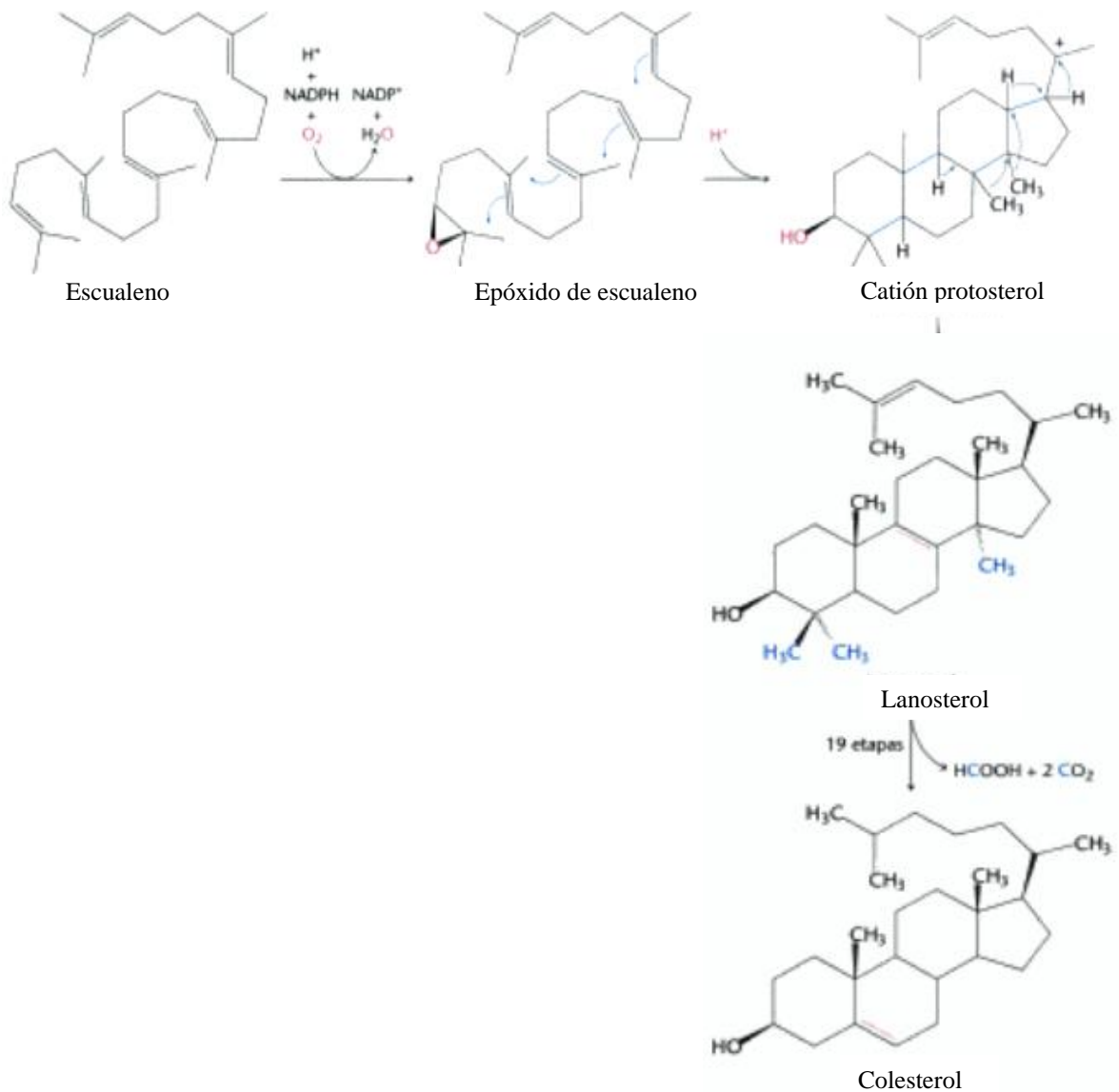


Figura 5. Formación del Colesterol. (Tomado de Melo, 2.007).

Antecedentes

Antecedentes Internacionales

Leopold Ruzicka encontró que el isopreno es el elemento básico para la síntesis de muchas sustancias naturales. Él postuló la regla del “Isopreno biogénico”, de acuerdo a la cual todos los terpenoides (derivados de los terpenos) son sintetizados vía un precursor hipotético, llamado “isopreno activo”. Esto fue verificado por Feodor Lynner en Munich (1.964), quien identificó al “isopentenil pirofosfato” como el “isopreno activo” (Hans-Walter, 2.005).

Los isoprenoides o terpenoides derivados del isopreno, son sustancias importantes utilizadas como fármacos o como precursores para la síntesis de otros compuestos, las investigaciones están en proceso para incrementar la habilidad de las plantas de sintetizar estos compuestos mediante la ingeniería metabólica (Hans-Walter, 2.005).

Para muchas plantas es vital el metabolismo secundario y la resistencia a plagas, por eso es importante controlar la síntesis de isoprenoides por vía del mevalonato. Un punto de control de la ruta del mevalonato es la enzima HMG-CoA reductasa. Esta es una proteína integral de membrana que se encuentra localizada en el retículo endoplasmático, en los plastidios, las mitocondrias y en el citoplasma. En las especies de plantas *Arabidopsis*, *Hevea*, tomate y maíz, se han clonado los genes que codifican para la HMG-CoA reductasa y se ha notado una fuerte similitud en la secuencia del gen entre estas especies eucariotas (Stermer y col., 1.994), lo cual hace posible identificar los genes en la yuca por comparación de secuencias.

Se han encontrado altos niveles del gen HMG-CoA reductasa en zonas de rápido crecimiento en plantas como las raíces y la zona apical, pero estos disminuyen en tejidos maduros. La modulación del gen también puede ser regulada por la luz, ya que la luz roja estimula la acumulación de isoprenoides. Otra forma de regulación es mediante un corte en la planta estimulando así la producción de fitoalexinas, lo que conlleva al incremento en la producción de la enzima que codifica el gen (Stermer y col., 1.994).

La manipulación de los productos naturales de las plantas a través de la metabolómica es una técnica que permite controlar rutas metabólicas, introduciendo genes de un organismo a otro, lo que eventualmente favorecería la producción de un producto de interés (Grotewold y col., 1.998).

El mejoramiento genético convencional de la yuca tiene algunas limitaciones, incluyendo:

- ◆ La naturaleza intrínseca heterocigota del cultivo.
- ◆ La gran cantidad de características genéticas deseables que son recesivas y son el resultado de la expresión de muchos genes (poligénicas).

En vista de estos problemas, la ingeniería genética constituye una técnica poderosa para dotar a los agricultores de las características genéticas que ellos desean en sus variedades cultivadas, pero para esto no es suficiente contar con avances tecnológicos sino que es importante que haya una transferencia de tecnología, herramientas y experticia hacia los países en los que la yuca juega un rol socioeconómico importante, especialmente en el continente africano (www.ciat.cgiar.org/yuca/pdf/report_2008/executive_summary08.pdf).

La Yuca es un cultivo básico muy importante en los países tropicales, por eso el interés de desarrollar un sistema de transferencia genética que pueda conferir características deseadas a este cultivo. En 1.995 se estableció un sistema de transformación genética para la yuca usando *Agrobacterium tumefaciens* (CIAT 1182) y bombardeo de partículas para obtener plantas transformadas genéticamente estables, para ello se usó el vector pGV1040 y las inoculaciones se hicieron en hojas de cotiledones (Cabral y col., 1.995; Sarria y col., 1.995).

El primer mapa genético preliminar de la Yuca (*Manihot esculenta*, Crantz) para incrementar la eficiencia en la introducción de cromosomas específicos o fragmentos de cromosomas en germoplasma de yuca, se implementó utilizando marcadores moleculares: RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) y RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*). Se trabajó con diferentes clases de yuca que poseían resistencia al virus del mosaico de la yuca (Fregene, 1.995).

Después del primer protocolo para producir yuca transgénica, se han manipulado diferentes variedades de arroz y varias leguminosas, todos los trabajos han sido realizados en Europa, Estados Unidos y en el CIAT (*Centro Internacional de Agricultura Tropical*), ubicado en Cali Colombia (http://www.ciat.cgiar.org/about_ciat/cropfocus.htm).

Los principales trabajo en los que se ha concentrado la manipulación genética en yuca hasta el momento incluyen:

- ◆ Resistencia a patógenos e insectos.
- ◆ Reducción de pérdidas por deterioro del tubérculo en la post cosecha.
- ◆ Mejorar la calidad del almidón.

La mayoría de estos trabajos son realizados en el CIAT, cuyo interés es que los agricultores productores de yuca, las comunidades rurales, el sector procesador y las cadenas productivas puedan beneficiarse de este cultivo mediante un aumento del valor económico de lo producido y cosechado por los agricultores, el fortalecimiento de los mercados para la yuca, el logro de precios más estables y una expansión de los usos finales de la raíz de yuca o sus productos (Ceballos, 2.007).

Proyecto Genoma de Yuca

El proyecto genoma de yuca se realizó con el objetivo inicial de generar una base de datos con la secuencia del genoma de la yuca, donde esta información estaría disponible y sería gratuita. Mucha de la utilidad de la secuencia del genoma vendrá del desarrollo en las herramientas de cultivo de la planta y el mejoramiento en la producción de la cosecha, ya que este es un cultivo de importancia humanitaria (Joint Genome Institute, 2.009).

El proyecto fue construido en base a un piloto iniciado a través de DOE-JGI Community Sequencing Program (CSP) por 14 miembros del consorcio dirigido por Claude Fauquet, Joe Tohme y Pablo Rabinowicz. Este proyecto fue realizado usando librerías de plásmidos y cósmidos. La fase principal del proyecto fue dirigida por Steve Rounsley, Dan Rokhsar, Chinnappa Kodira y Tim Harkins, empezó en la primavera del 2.009 cuando 454 Life Sciences, la compañía Roche y DOE-JGI se unieron para proveer recursos para la secuenciación del genoma completo de Yuca, usando la plataforma 454 GS FLX Titanium. Estos datos se combinaron con los generados en el proyecto piloto para ensamblar el genoma. Toda la data fue generada de una línea celular llamada AM560-2 generada en el CIAT en Cali, Colombia (Joint Genome Institute, 2.009).

Aunque la Yuca tiene un genoma de tamaño estimado de 760 Mb, inicialmente se ensamblaron 416 Mb, se cree que estos representan casi todas las regiones génicas del genoma y las porciones perdidas son secuencias repetitivas que no pudieron ser ensambladas. Se logró hacer un 95% del mapa de los transcritos mostrando casi completa cobertura de proteínas y genes codificantes de esas proteínas (JGI, 2.009).

Antecedentes Nacionales

El IDEA es pionero en esta investigación a nivel nacional y se ha realizado una investigación previa mediante la tesis de Maestría de la Ing. Yndira Hernández, titulada: “Caracterización del gen 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa) en yuca (*Manihot esculenta* Crantz)”, en el cual se realizó la clonación parcial del gen con el diseño de cebadores degenerados, a partir de secuencias conocidas de especies vegetales: *Cucumis melo*, *Arabidopsis thaliana*, *Andrographis paniculata*, *Oryza sativa* y *Solanum tuberosum*.

En ese trabajo se obtuvo un fragmento del gen HMG-CoA reductasa de 1.907pb y al ser secuenciado se obtuvo una homología con secuencias reportadas en el GenBank de la misma enzima para *Hevea brasiliensis*, obteniendo un 92% de similitud con el gen (Hernández, 2.009).

Justificación

Este trabajo experimental se llevo a cabo en el Centro Nacional de Biotecnología Agrícola (CNBA), ubicado en la Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA). El CNBA tiene un programa multidisciplinario de investigación en biotecnología de plantas, que se centra principalmente en cultivos como: raíces, tubérculos, cacao y leguminosas forrajeras.

La investigación que se llevó a cabo en este trabajo, fue una labor innovadora que consistió en caracterizar el gen HMG-CoA reductasa en la planta de yuca (*Manihot esculenta*), que no está identificado en esta planta y es de suma importancia en la producción de metabolitos secundarios. Estos compuestos le confieren a la planta resistencia contra microorganismos patógenos y plagas a los cultivos, una función muy importante ya que la yuca tienen un alto deterioro en la post-cosecha y se piensa que el gen HMG-CoA reductasa puede tener impacto positivo para controlar el deterioro de este cultivo, que sirve de alimento para millones de personas en todo el mundo.

Si se entiende como regula el gen HMG-CoA reductasa los niveles de expresión de los isoprenoides y cómo se comporta en diferentes condiciones fisiológicas, podremos a largo plazo estudiar la modificación genética de la yuca para resistir a enfermedades y con esto evaluar el aumento de la vida post-cosecha de este cultivo, beneficiando así a empresas agroindustriales, pequeños productores independientes y redes de innovación productiva.

Objetivos

Objetivo general:

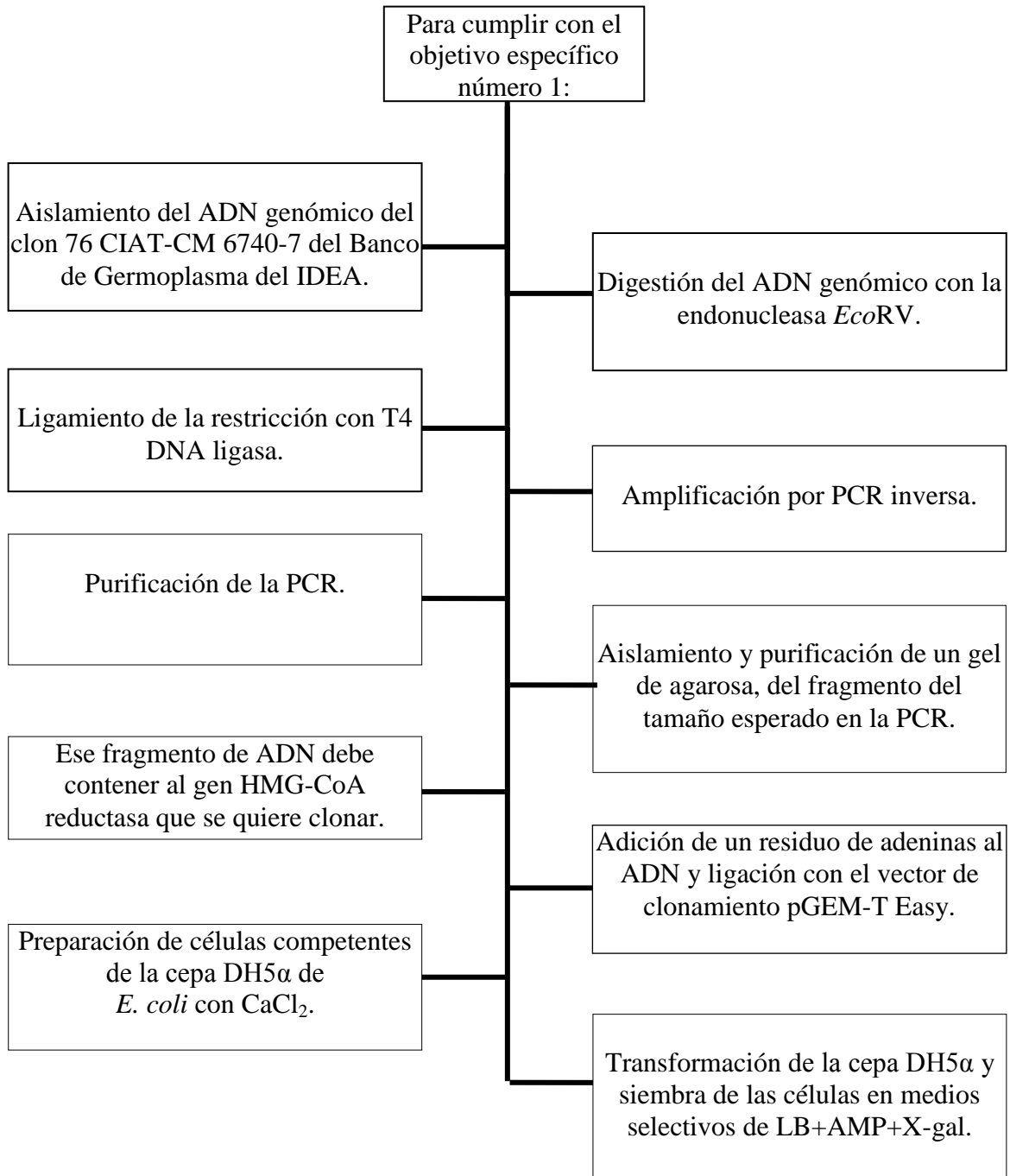
- ◆ Caracterizar el gen HMG-CoA reductasa de yuca (*Manihot esculenta*) evaluando su expresión mediante una PCR en tiempo real.

Objetivos específicos:

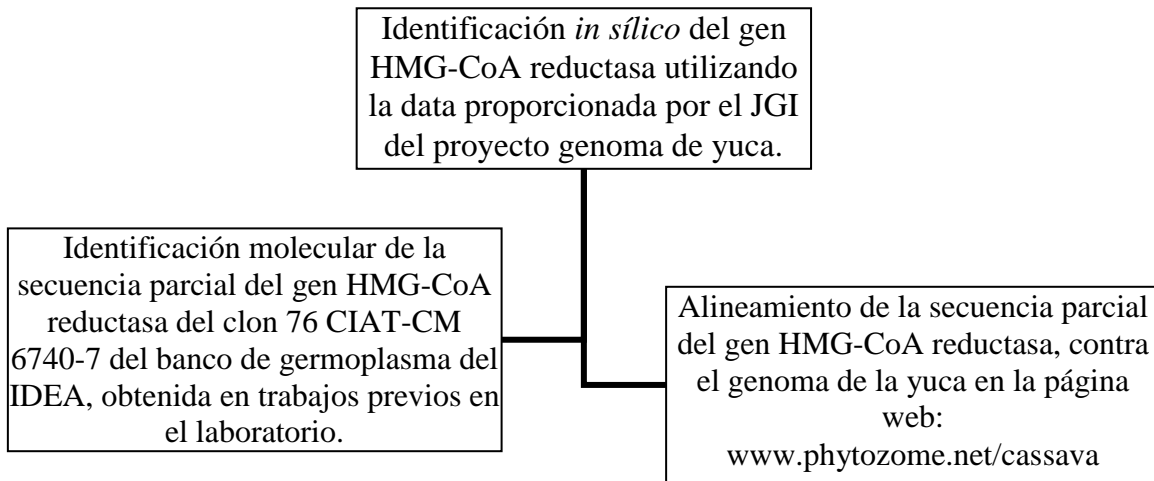
1. Aislar el ADN genómico de plantas de yuca para realizar la clonación del gen HMG-CoA reductasa.
2. Identificación *in silico* del gen HMG-CoA reductasa utilizando la información proporcionada por el JGI (Joint Genome Institute) del proyecto genoma de yuca (*Manihot esculenta*).
3. Caracterizar la secuencia parcial del gen HMG-CoA reductasa del IDEA en base a:
 - 3.1. Número de exones e intrones.
 - 3.2. Identificación de regiones 5', 3' y del promotor.
 - 3.3. Comparación de la secuencia del gen con otras especies.
4. Aislar ARN de plantas de yuca para medir la expresión del gen HMG-CoA reductasa utilizando PCR en tiempo real en diferentes condiciones:
 - 4.1. Condición de la planta *in vitro*.
 - 4.2. Condición de la planta en invernadero.
 - 4.3. Condición de la planta en campo.
 - 4.4. Condición de la planta en campo después de un corte en el tallo.

Plan de trabajo

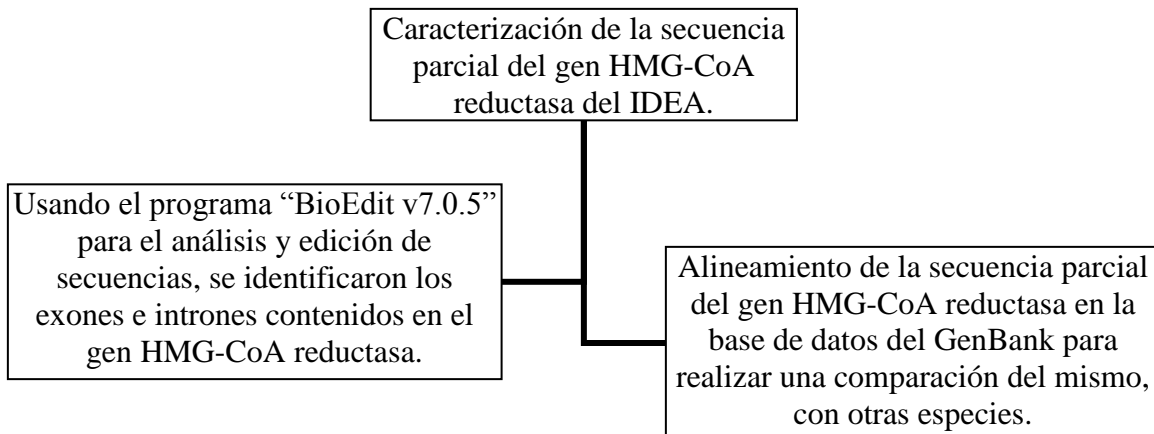
Para cumplir con el objetivo general propuesto en este trabajo se realizó la siguiente metodología:



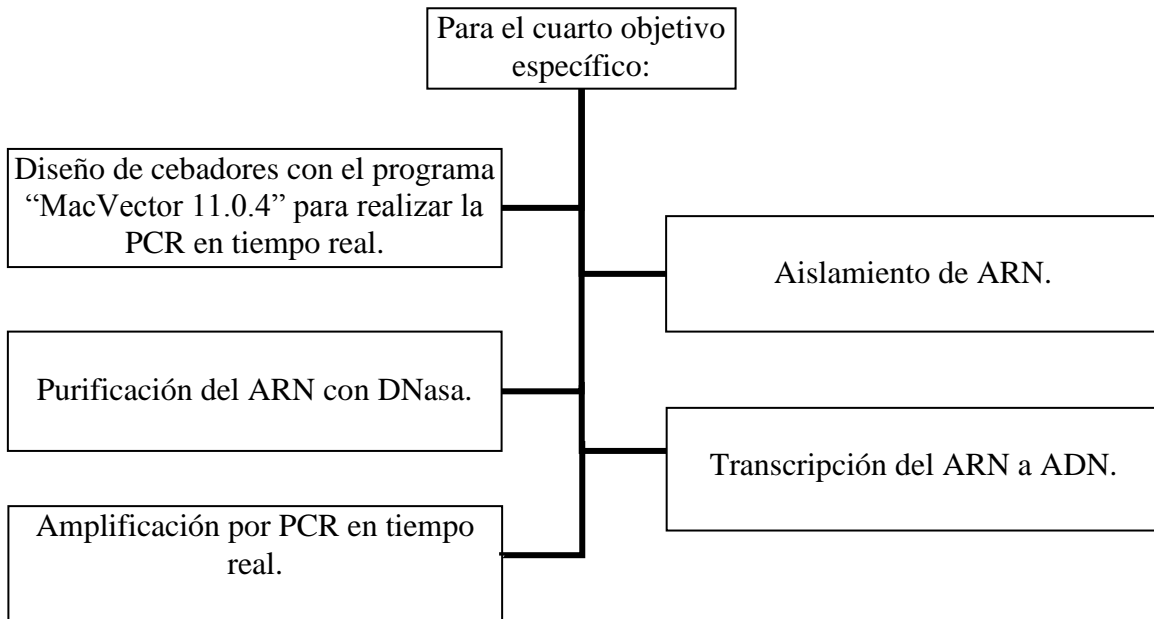
No se terminó de clonar el gen porque para noviembre de 2.009 se publicó el genoma de la yuca, por el *Join Genome Institute* (JGI) entonces se procedió a realizar el segundo objetivo específico:



Para el tercer objetivo específico se siguió la siguiente metodología:



Para el cuarto objetivo específico: aislar ARN de plantas de yuca para medir la expresión del gen HMG-CoA reductasa utilizando PCR en tiempo real en diferentes condiciones, se procedió de la siguiente manera:



Materiales y métodos

Materiales y métodos de la clonación del gen HMG-CoA reductasa

Material vegetal. Se trabajó con las hojas jóvenes de plantas de yuca, con el clon 76 CIAT-CM 6740-7 del Banco de Germoplasma de la Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), con el fin de obtener el ADN genómico y el ARN de la Yuca.

Extracción de ADN. Se realizó el aislamiento del ADN, según el protocolo de Salah, M. y Martínez, I., (1.997) con algunas variaciones: se tomaron 100 mg de tejido fresco de hojas jóvenes del clon 76 de yuca y se homogenizaron en un mortero con 400 µl del tampón (NaCl 0,4 M; Tris HCl 10 mM, pH=8; EDTA 2 mM, pH=8). Luego se agregaron 40 µl de SDS (dodecilsulfato de sodio) al 20% y 8 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y se mezcló bien. La muestra fue transferida a un tubo eppendorf e incubada 1 hora a 60° C, después se agregaron 400 µl de NaCl 5 M y se colocaron en el vortex 30 seg a velocidad máxima para luego centrifugar la muestra durante 30 min a 4° C y 20.800 g. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y se le agregaron 500 µl de isopropanol. Se incubó la muestra durante 1 hora a 0° C y después se centrifugó durante 25 min a 4° C y 20.800 g. El sedimento se lavó con 100 µl de etanol al 70% y se concentró bajo vacío. Finalmente se resuspendieron las muestras en 300 µl de agua estéril y se guardaron a 4° C. Las muestras se midieron en un espectrofotómetro “Nano drop”, para determinar su concentración.

Cortes con enzimas de restricción. El ADN genómico se digirió con la enzima *EcoRV*, según protocolo de la casa comercial Promega. Las muestras de ADN se colocaron

con la endonucleasa durante 3 horas a 37° C. Al finalizar, las muestras se guardaron a 4° C. La enzima se inactivó por calor a 65° C durante 20 min.

Ligación del ADN. Después de la digestión con *EcoRV* se procedió a ligar el ADN con la enzima T4 DNA ligasa, para circularizar los fragmentos de la digestión, según protocolo de la casa comercial Promega. Se dejaron las muestras toda la noche con la ligasa a 16° C. Después de esa primera incubación, se adicionó 1 U más de enzima ligasa y se dejó otras 16 horas de incubación (Lewin, 2.008), para asegurar la ligación de los fragmentos. Al finalizar las muestras se guardaron a 4° C.

PCR Inversa. Con los fragmentos circulares, se realizó una PCR inversa con el kit de “Invitrogen Platinum Pfx” y según el siguiente protocolo: a 2 µl del ADN (digerido y ligado, aproximadamente 200 ng), se agregaron 3 µl del tampón (1X), 1.5 µl de MgSO₄ 5 mM, 1.2 µl dNTPs 10 mM, 0.9 µl del cebador delantero (hibrida en el exón 2 del gen): GGATACCTGTTAAAACGACG (10 µM), 0,9 µl del cebador reverso (hibrida en el exón 2 del gen): GACAATTTTGATACCTTGGC (10 µM), 0.6 µl de la enzima Pfx (1-2,5 U) y se completa con agua (19.9 µl) hasta un volumen final de reacción de 30 µl. El ADN se amplificó mediante el siguiente programa en el termociclador: 1 ciclo de 94° C durante 5 min, 1 ciclo con 3 pasos: desnaturalización (94° C durante 15 seg), el paso de unión de los cebadores al ADN blanco (48° C durante 1 min), y el de elongación (68° C durante 1 min), 1 ciclo de 68° C durante 10 min para la elongación final de la cadena de ADN. El segundo ciclo se repite 35 veces y al final hay un ciclo a 4° C.

Purificación de la PCR. El producto de PCR se purificó según el protocolo del kit de purificación de PCR “Accuprep” de la casa comercial Bioneer. A 1 volumen de reacción de

PCR, se le agregaron 5 volúmenes del tampón “PB” y se mezcla (Ej. A 20 µl de la reacción de PCR se le agregaron 100 µl del tampón). La mezcla anterior se colocó en una columna del kit y se centrifugó 1 min a 20.800 g. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 500 µl del tampón “WB” en la columna, centrifugándose a 20.800 g durante 1 min. Se descartó el sobrenadante y se agregaron otros 500 µl del tampón “WB” en la columna centrifugándose a 20.800 g durante 3 min. Para eluir el ADN se agregaron 30 µl del tampón “EL” (calentado previamente a 60° C) y se centrifugó a 20.800 g durante 1 min, luego se agregaron 10 µl más del tampón “EL”, centrifugando otro minuto.

Electroforesis de la muestra. Se corrió un gel de agarosa 0,8% con las muestras purificadas, para extraer el fragmento del tamaño esperado después de la amplificación del ADN. El gel se corrió durante 1 hora y 30 min a 90 voltios y se reveló con bromuro de etidio en una cámara de luz UV. La banda se extrajo del gel cortándola con un bisturí.

Purificación de la banda de ADN. El fragmento con el ADN extraído del gel de agarosa se purificó según el protocolo de purificación de geles de “Accuprep”, casa comercial Bioneer. Se colocó la porción de gel con el ADN en un tubo y se añadieron 3 volúmenes del tampón “1” a un volumen del gel (Ej. A 200 mg de agarosa se le agregan 600 µl del tampón). Se incubó a 60° C durante 10 min, se agitó cada 2 min para disolver la agarosa. Se agregaron 200 µl de isopropanol a la mezcla y esta se transfirió a una columna del kit centrifugando durante 1 min a 20.800 g. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 500 µl del tampón “2” a la columna, centrifugando durante 1 min a 20.800 g. Se descartó el sobrenadante y se agregan otros 500 µl del tampón “2” a la columna centrifugando en las mismas condiciones. Se descarta el sobrenadante y se centrifuga durante 1 min a 20.800 g.

Se transfirió la columna a un tubo nuevo y se eluyó el ADN con 30 μ L del tampón “3” se incubó 5 min a temperatura ambiente y se centrifuga durante 1 min a 20.800 g.

Adición de un residuo de adeninas. Al fragmento de ADN purificado se le adicionó un residuo de adeninas para evitar que se circularice, según protocolo: 10 μ L del ADN (aproximadamente 1 ng), 4 μ L de buffer 5X, 2 μ L de $MgCl_2$ 25 mM, 1 μ L dATPs 10 mM, 0,2 μ L Go Taq polimerasa 5U y agua 2,8 μ L hasta Vf = 20 μ L. La mezcla de reacción se incubó 30 min a 70° C.

Ligación con el vector de clonamiento. El vector para clonar el gen fue el pGEM-T Easy de Promega, un vector diseñado con un residuo de timinas que se une al residuo de adeninas del ADN. La reacción se dejó 20 horas: 4 μ L del ADN poli adenilado, 1 μ L del vector, 1 μ L T4 DNA ligasa, 1 μ L buffer de la enzima 10X y 3 μ L agua, Vf = 10 μ L.

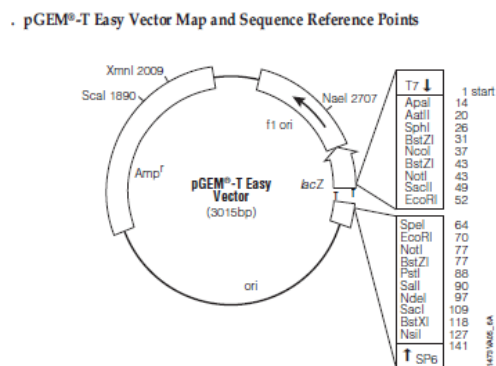


Figura 6. Mapa de un vector circular pGEM-T Easy y puntos de referencia de secuencia. Tomado de www.promega.com.

Preparación de células competentes. La cepa DH5 α de *E. coli* se hizo competente con $CaCl_2$ según protocolo de Sambrook (2.001): se seleccionó una colonia de una placa previamente incubada durante 16 a 20 horas con la cepa DH5 α en medio LB agar, se

incubó la colonia en 100 ml de medio LB durante 3 horas a 37° C con agitación vigorosa hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ aproximadamente 0,4. El cultivo fue transferido a unos tubos Falcon de 50 ml e incubados en hielo 10 min. Se centrifugó a 4.100 g durante 10 min a 4° C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 30 ml de MgCl₂-CaCl₂ frío (80 mM MgCl₂, 20 mM CaCl₂). Se centrifugó durante 10 min a 4.100 g y 4° C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 2 ml de CaCl₂ (0,1M) por cada 50ml del cultivo original. Las células están listas para la transformación, si no se usaron al instante, se agregan 140 µl de DMSO y se incuban en hielo durante 15 min esto se repite y se guarda en alícuotas a -80° C.

La cepa DH5α fue utilizada porque no tiene resistencia al antibiótico ampicilina, usado como marcador selectivo, además la bacteria es recombinante, es decir que acepta material genético foráneo y este se replica sin problema en el interior celular, por lo tanto esta cepa es capaz de aceptar el vector de clonamiento ligado con el ADN. Su genotipo es: *deoR*, *endA1*, *gyrA96*, *hsdR17* (rK⁻ mK⁺), *recA1*, *relA1*, *supE44*, *thi-1*, (*lacZYA-argFV169*), 80*lacZ* M15, F (Hanahan, 1.983).

Transformación de la cepa DH5α. Este experimento se realizó según protocolo de Sambrook (2.001): a 200 µl de las células competentes se agregaron 50 ng de ADN (ligado con el vector del clonamiento), se mezcló y se incubó en hielo durante 30 min. El tubo se transfirió a un baño de agua a 42° C durante 90 seg exactos (si es menos tiempo no se incorpora el ADN a la célula y si es más tiempo se puede lisar la célula) sin agitación y luego otra vez en hielo durante 2 min. Se agregaron 800 µl de medio LB al tubo incubando durante 45min en un baño de agua a 37° C y 50 ciclos/min de agitación.

Materiales y métodos de la identificación *in silico* y caracterización del gen HMG-CoA reductasa

Utilizando la data proporcionada por el JGI del proyecto genoma de yuca, se realizó la identificación molecular del gen HMG-CoA reductasa del clon 76 CIAT-CM 6740-7 del Banco de Germoplasma del IDEA. Comparando la secuencia parcial del gen antes mencionado, obtenida en trabajos previos en el laboratorio de Biotecnología Agrícola en el IDEA (Hernández 2.009), se realizó un alineamiento de esta secuencia contra el genoma de yuca en la página web: www.phytozome.net/cassava, para localizar la posición del gen en el genoma e identificar su tamaño completo.

Usando el programa “BioEdit v7.0.5” para el análisis y edición de secuencias, se identificaron los exones e intrones contenidos en la secuencia parcial del gen HMG-CoA reductasa, determinando cuales regiones de la secuencia parcial correspondían con el genoma de yuca, además de identificar la porción faltante en la secuencia del laboratorio e identificar los extremos 5´ y 3´ del gen.

Se realizó un alineamiento de la secuencia parcial de este gen en la base de datos del GenBank, para realizar una comparación del mismo con otras especies.

Materiales y métodos del aislamiento de ARN

Diseño de cebadores. Se diseñaron varios cebadores con el programa “MacVector 11.0.4” para realizar la PCR en tiempo real. Características para diseñar los cebadores: temperatura de fusión (temperatura de melting, T_m) = 50-65° C y con una diferencia entre el cebador delantero y el reverso menor a 1° C, % G-C = 50-60, tamaño del cebador de 18 a

25 nucleótidos, el fragmento amplificado debe ser entre 75 y 200 nucleótidos (Beltrán 2.009; Boeckman 2.003; Udvardi 2.008).

Aislamiento de ARN. La extracción del ARN (de hojas jóvenes del clon 76 de yuca, del banco de germoplasma del IDEA) se realizó según el protocolo de la casa comercial Qiagen, usando el “RNeasy Plant Mini Kit”: 100 mg de tejido congelado con nitrógeno líquido se maceraron en un mortero con 450 µl del tampón “RLT” y se incubó durante 3 min a 56° C. Se trasvasó la muestra a una columna del kit (morada) centrifugándose 2 minutos a 14.000 g. Se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf y se le agregaron 500 µl de etanol al 100%, esa mezcla se trasvasó a una columna rosada del kit. Se centrifugó durante 15 seg a 14.000 g descartándose el sobrenadante. A la columna se agregaron 700 µl del tampón “RW1” centrifugándose en las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante y se agregaron 500 µl del tampón “RPE” a la columna. Se centrifugó durante 15 seg a 14.000 g descartándose el sobrenadante, se agregaron otros 500 µl del tampón “RPE” y se centrifugó en las condiciones anteriores. La columna se colocó en un eppendorf de 1,5 ml nuevo y se eluyó el ARN con 25 µl de agua libre de RNasas centrifugando 1 min a 14.000 g, se agregaron otros 25 µl del agua anterior centrifugándose en las mismas condiciones. Las muestras se midieron en un espectrofotómetro “Nano drop”, para determinar su concentración

Tratamiento del ARN con DNasa. Después de aislado el ARN, se trató con la DNasa de la casa comercial Ambion según el siguiente protocolo: al ARN se le agregaron 5 µl del tampón de la DNasa (1X de concentración final) y 1µl de la enzima (2 unidades). Se incubó la reacción a 37° C durante 30 min. Se agregó el inactivador de la DNasa (5 µl) incubando la muestra 2 min con agitación a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14.000 g

durante 1 min y 30 seg. Se trasvasó el sobrenadante a un tubo nuevo. Se puede realizar la transcripción de inmediato, o se almacena el ARN a -80°C .

Electroforesis de la muestra. En un gel de formaldehído (FA) al 1% se visualizó el ARN aislado y purificado con la DNasa de Ambion. El gel FA y los tampones se prepararon según protocolo de la casa comercial de Qiagen: 1 g de agarosa se diluyó en 10 ml del tampón 10X FA y 88,2 ml de agua libre de RNasas, después se agregaron 1,8 ml de formaldehído al 37% (12,3 M). El tampón 10X FA contiene: 200 mM de MOPS, 50 mM de acetato de sodio, 10 mM de EDTA en un volumen final de 1 litro de agua libre de RNasas, el pH se ajustó a 7 con NaOH. Tampón 1X FA (tampón de corrida): 100 ml del tampón 10X FA, 20 ml de formaldehído al 37% y 880 ml de agua libre de RNasas. Tampón de carga 5X RNA: 16 μl de una solución saturada de azul de bromofenol, 80 μl de una solución 50 mM de EDTA (pH=8), 720 μl de formaldehído al 37%, 2 ml de glicerol al 100%, 3,084 ml de formamida, 4 ml del tampón 10X FA, se ajustó el volumen final a 10 ml con agua libre de RNasas. El agua libre de RNasas se preparó agregando 1 ml de DEPC (Dietil pirocarbonato) a 999 ml de agua destilada y se esterilizó esta preparación.

Transcripción reversa del ARN. Al ARN tratado con la DNasa se le realizó la transcripción inversa con la transcriptasa reversa de la casa comercial Promega. En un tubo se colocaron 3 μl del ARN (aproximadamente 1 μg), 1 μl del oligo dT 5 mM y 1 μl de agua libre de nucleasas, Vf = 5 μl . En otro tubo se colocaron 2 μl de ARN que codifica para el gen de la kanamicina (sabiendo que tiene un peso molecular de 1,2 kb), 1 μl del oligo dT y 2 μl de agua libre de nucleasas (control positivo), Vf = 5 μl . En otro tubo se colocaron 1 μl del oligo dT y 4 μl de agua libre de nucleasas (control negativo), Vf = 5 μl . Los tubos se incubaron a 70°C durante 5 min. Inmediatamente se colocaron en hielo durante 5 min.

Luego se agregó a cada tubo la mezcla de reacción para la transcripción: 5,9 µl de agua libre de nucleasas, 2 µl del tampón ImPromII (10X), 3,5 µl de MgCl₂ (4,3 mM), 1 µl de la mezcla de dNTP (0,5 mM c/u), 1,6 µl del inhibidor de RNasa y 1 µl de la transcriptasa reversa, para un volumen final de reacción de 20 µl. Como control negativo de la transcripción, a un tubo con ARN se le agregó la mezcla de la transcripción (descrita en el párrafo anterior), pero en vez de la enzima transcriptasa se le agregó 1 µl de la enzima taq polimerasa de la casa comercial Promega. Se incubaron todos los tubos en un termociclador durante 5 min a 25° C, luego a 42° C durante 1 hora y se inactivó la transcriptasa a 70° C durante 15 min. Para probar que la transcripción del ARN fue exitosa se realizó una PCR según siguiente protocolo: a 6 µl del ARN transcrito se agregaron 2 µl del tampón (1X), 1 µl de MgCl₂ (3 mM), 0,5 µl dNTPs (10 mM), 1 µl del cebador delantero (10 µM), 1 µl del cebador reverso (10 µM), 0,5 µl de taq polimerasa (3 U) y se completó con agua (8 µl) hasta un volumen final de 20 µl. El ADN se amplificó mediante el siguiente programa en el termociclador: 1 ciclo de 94° C durante 2 min. 1 ciclo con 3 pasos: 94° C durante 1 min, 50° C durante 1 min y 72° C durante 2 min (repetido 25 veces), 1 ciclo de 72° C durante 5 min.

PCR en tiempo real. Del ARN transcrito se hizo una dilución 1/10 (Beltrán y col., 2009), es decir como el volumen final de reacción de la PCR en tiempo real es 25 µl, se agregaron 2,5 µl ADN copia (aproximadamente 30 ng). Se usó una mezcla de reacción provista por los laboratorios Bio-Rad, la “qPCR MasterMix Plus for SYBR Green I”, esta mezcla contiene: un tampón a 2X de concentración, 10 mM dNTPs, 1 U HotGoldStar DNA polimerasa, 5 mM MgCl₂, Uracil-N-Glicosilasa (para inactivar productos inespecíficos de dUTP), SYBR Green I y estabilizadores. Para la reacción de PCR se agregaron: 12,5 µl de

la MasterMix, 2,5 µl del cebador delantero (100 µM), 2,5 µl del cebador reverso (100 µM), 2,5 µl del ADN y 5 µl de agua libre de nucleasas. Cada muestra se realizó por triplicado. El programa de amplificación se realizó en un termociclador Bio-Rad y con el programa de computadora “Bio-Rad iQ5”, según protocolo de la misma casa comercial con algunas modificaciones: ciclo 1 a 50° C durante 2 min, ciclo 2 de 95° C durante 10 min, ciclo 3 con 2 pasos (repetido 40 veces): 95° C durante 15 seg, 1 min a la temperatura de hibridación de cada par de los cebadores (en este ciclo se realiza la cuantificación de la PCR). Ciclo 4 de 95° C durante 1 min. Ciclo 5 a 55° C durante 1 min y el ciclo 6 de 55° C a 95° C con un incremento de temperatura de 0,5° C, durante 10 seg y se repite 81 veces (en este ciclo se colectan los datos para la curva de melting).

Resultados

Resultados de la clonación del gen HMG-CoA reductasa

Con el propósito principal de culminar la clonación del gen HMG-CoA reductasa y caracterizar el mismo, se modificaron los objetivos planteados en este trabajo. Para cumplir el primer objetivo específico de esta investigación, se realizó el aislamiento del ADN genómico de la planta de yuca (figura 9), siendo este digerido con la enzima de restricción *EcoRV*, obteniéndose un barrido correspondiente a los muchísimos fragmentos de ADN que produjo la endonucleasa y que fueron visualizados en un gel de agarosa (figura 10). La enzima *EcoRV* se eligió porque tiene su sitio de reconocimiento o sitio diana, alejado de la secuencia del gen HMG-CoA reductasa, permitiendo tener al gen en su tamaño completo. Esto fue posible realizando un mapa de restricción del gen (figura 7), donde se observa que la enzima causa la ruptura de los enlaces fosfodiéster que unen a las bases nitrogenadas, después de 3000 pb y el gen es de 2,493 pb. Luego se ligó con la enzima T4 DNA ligasa para circularizar los fragmentos de la digestión.

Como lo que se conoce es una región intermedia del gen, se realizó la PCR inversa con los fragmentos circulares y los cebadores diseñados en un trabajo anterior (antecedentes nacionales) que se unen en una región intermedia del gen (figura 8). Después de la amplificación se purifica el producto de PCR, los resultados de la purificación se vieron en un gel de agarosa al 0,8% (figura 11) revelando bandas inespecíficas de ADN, por esto se cortó con un bisturí la banda de ADN que tenía un peso de 2 kb (correspondientes a la secuencia parcial de 1.907 pb) y se trató este fragmento de agarosa, con un kit de purificación de geles de Accuprep de la casa comercial Bioneer (figura 12).

A la cepa DH5 α de *E. coli* se le realizó el protocolo de CaCl₂ del manual Sambrook para volverlas competentes (figura 13-A y 13-B), es decir permeabilizar la membrana celular y favorecer la entrada del ADN purificado y ligado al vector pGEM-T Easy al interior celular, para luego esta cepa ser transformada con el protocolo de transformación de Sambrook y Russell (2.001).

Al fragmento de ADN purificado se le adicionó una cola de adeninas para su posterior unión con el vector de clonamiento pGEM-T Easy de Promega, mediante la enzima T4 DNA ligasa. Este vector de clonamiento permite seleccionar a las bacterias transformadas por un marcador de resistencia al antibiótico ampicilina y discriminar las colonias con el vector de clonamiento sólo, o con este ligado al ADN, realizando un chequeo de colonias blancas y azules dependiendo si degradan al sustrato al X-gal, porque también contiene el gen *lacZ* como marcador selectivo (figura 13-C, 13-D Y 13-E).

No se terminó de clonar el gen HMG-CoA reductasa porque se publicó el genoma de la yuca por el JGI en noviembre de 2.009, utilizando esta información se procedió a realizar un análisis de la secuencia parcial del gen de 1.907pb del IDEA.

```

3041  GAAATGCAATGTGTAGAAATTAACCTCTGGGGACTGATGTGGCAGTGGTATGCATCCAAATCAATTGTAGTGTGGTA  3120
3041  CTTTACGTTACACATCTTAAATTGAGAACCCCTGACTACACCGTCACCATACGTAGGTTTATAGTTAAACATCACACCAT  3120
      MwoI      BsrDI      FokI      TspRI      SfaNI
      HpyF10VI  ApoI      BsmFI      BfrBI
                        BtsI
                        BstF5I
                        NsiI

3121  GAAACAAAGGAAGAAAGATCAGTGGTTGCATAATTTAATAGTTGGAAGTCGGTGTGCACATTTTTTAGATATCAATTTCT  3200
3121  CTTTGTTCCTCTCTTCTAGTCACCAACGTTAAATTAATCAACCTTCAGCCACACCGTGTAAAAAATCTATAGTTAAAGA  3200
      MboII      ApaLI      EcoRV
      MmeI      Hpy8I
                        Bme1580I
                        BsiHKAI
                        Bsp1286I

3201  ACAAGTCTGGCAAGAATTATAGTTTCATTATAACGTAATAAACAATTATCATTTTTTTAACAGAACAATTATCATT  3280
3201  TGTTCAGACCGTTCTTAATATCAAAGTAATATTGCATTTTATTTGTTAAATAGTAAAAAATTTGCTCTTGTTAAATAGTAA  3280
      TspDII      PsiI

```

Enzimas que no cortan el fragmento de 1.907pb del gen HMG-CoA reductasa:

AfeI, AflII, AgeI, AhdI, AleI, AlwNI, ApaI, ApaLI, AscI, AsiSI, AvaI, BbeI, BbvCI, BcgI, BclI, BfrBI, BglII, BlpI, Bme1580I, BmgBI, BmrI, BmtI, BplI, Bpu10I, BsaI, BsiWI, BsmI, BspEI, BspHI, BsrBI, BsrGI, BssHII, BssSI, BstAPI, BstEII, BstZ17I, Bsu36I, DraI, DraIII, EarI, EciI, EcoNI, **EcoRV**, FseI, FspI, FspAI, HpaI, KasI, MscI, NaeI, NarI, NgoMIV, NheI, NsiI, PacI, PciI, PmeI, PmlI, PshAI, PsiI, PspOMI, PsrI, PsrI, PvuI, PvuII, RsrII, SanDI, SapI, SexAI, SfiI, SfoI, SgrAI, SmaI, SnaBI, SphI, SrfI, SspI, SwaI, TaqII, Tth111I, XbaI, XhoI, XmaI.

Figura 7. Mapa de restricción del fragmento de 1.907pb del gen HMG-CoA reductasa.

La enzima *EcoRV* no reconoce un sitio de restricción en el gen HMG-CoA reductasa de la planta de yuca, la ruptura del ADN se realiza casi 1 kb después del gen.

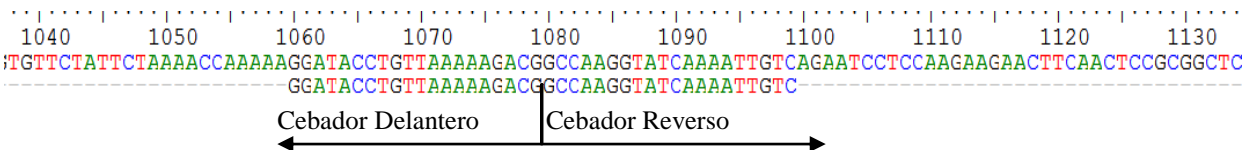


Figura 8. Hibridación de los cebadores diseñados en un trabajo previo, con la secuencia parcial del gen HMG-CoA reductasa de 1.907pb.

Estos cebadores se diseñaron especialmente para la técnica de PCR inversa, por esto hibridan en una región intermedia del gen y amplifican hacia los extremos del mismo.

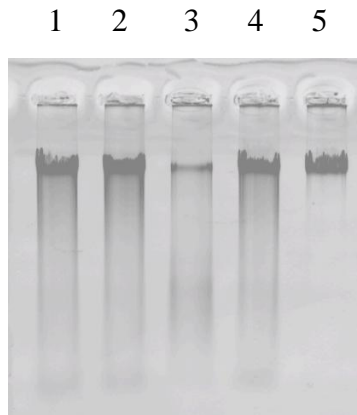


Figura 9. Gel de agarosa al 0,8% con las muestras de ADN genómico. En los carriles 1, 2, 3 y 4 se colocaron muestras de ADN del clon 76 de yuca (2µl de 4 réplicas: A, B, C y D) y en el carril 5 se encuentra el marcador de masa molecular, el fago λ con 100ng/µl (2µl).

Las muestras de ADN (figura 9) se mezclaron con SYBR green (2µl) y el gel se reveló en el escáner “Typhoon 9.410”. Las muestras se midieron en un espectrofotómetro “Nano drop”, para determinar la concentración de cada una: 582,4ng/µl, 459,4ng/µl, 321,2ng/µl y 605ng/µl respectivamente para las replicas A, B, C y D. El protocolo de extracción de ADN genómico de Salah y Martínez, 1.997, es un método simple y rápido que permite obtener gran cantidad de ADN de buena calidad, como se observan en los resultados de la figura 9 en los carriles 1, 2 y 4, donde se observa el ADN genómico de yuca que tiene un peso molecular de aproximadamente 70 kb.

Para las digestiones del material genético, normalmente la cantidad de ADN utilizada oscila entre 0,5 y 10 µg y se añaden de 1 a 10 unidades de enzima respectivamente, pero hay que tener en cuenta que la cantidad de la enzima no puede superar el 10% del volumen total de reacción, ya que las enzimas de restricción están almacenadas en glicerol y una alta concentración de este en el medio de reacción,

disminuye la especificidad de la enzima (Devlin, 2.004). Esto es importante a la hora de estandarizar el protocolo de restricción enzimática, para obtener una digestión completa del ADN y que la proporción del material genético con la enzima sea la correcta, porque si no se presentan problemas de digestiones parciales y hay que someter al ADN a una segunda digestión, como fue el caso de la figura 10.

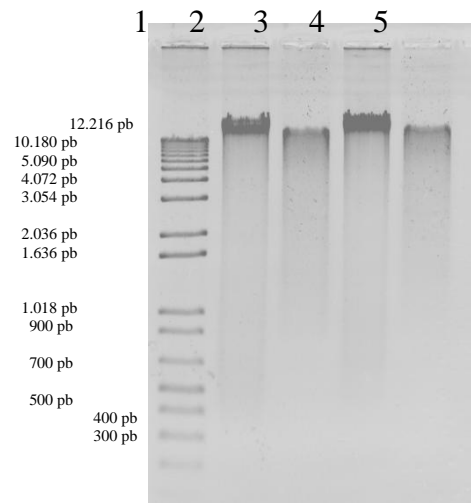


Figura 10. Gel de agarosa al 0,8% con las muestras de ADN digeridas con *EcoRV*. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular de Invitrogen, “1Kb plus DNA ladder”. En el carril 2 está la muestra A de ADN sin digerir, en el carril 3 está el ADN anterior digerido (1.164,8ng). En el carril 4 está el ADN D sin digerir y en el carril 5 la muestra anterior digerida (1.210ng).

En la figura 10, no se observa una buena digestión enzimática del ADN, hubo que realizar una segunda digestión con la enzima *EcoRV* para garantizar que el ADN se fragmentara por completo y no hubiera ningún segmento sin digerir. Como *EcoRV* deja extremos romos en el ADN, se realizó una segunda ligación a la muestra con la enzima T4 DNA ligasa antes de realizar la PCR inversa.

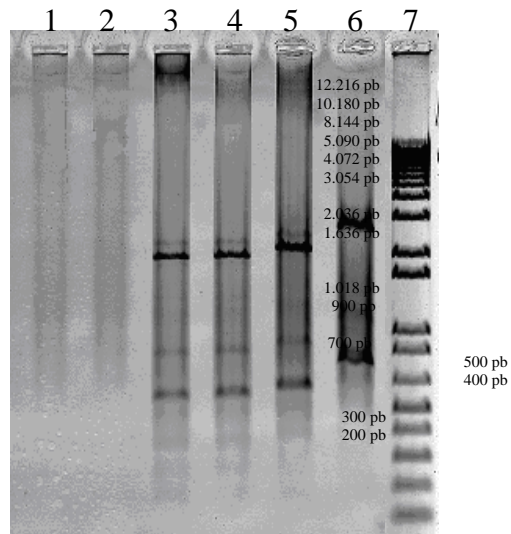


Figura 11. Resultados de la PCR inversa en un gel de agarosa al 0,8%. En el carril 1 y 2 están los controles negativos de la PCR (todos los reactivos, menos el ADN), en el carril 3 se observa el fragmento del gen amplificado de 2kb (kilo bases) de la muestra A, en el carril 4 está un duplicado de la muestra A. En el carril 5 se ve el fragmento amplificado para la muestra D y en el sexto carril su duplicado. En el último carril el marcador de peso molecular “1Kb plus DNA ladder” de Invitrogen.

La amplificación de este gen dio como resultado (figura 11) varios fragmentos inespecíficos, debido a la baja temperatura de hibridación de los cebadores (48° C). La muestra amplificada del carril 6 está contaminada, porque al realizar la corrida electroforética se muestra un patrón de migración diferente a los demás carriles.

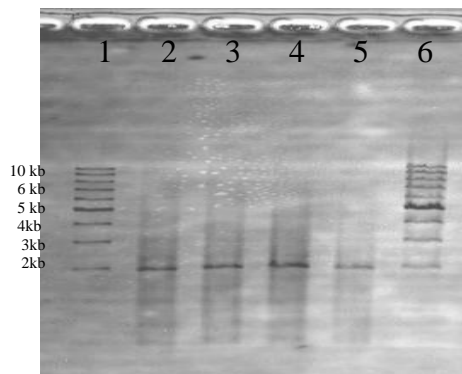


Figura 12. Gel de agarosa al 0,8% con las muestras purificadas con el kit de purificación de geles de Accuprep, observándose el fragmento del gen HMG-CoA reductasa de aproximadamente 2 kb. En los carriles 1 y 6 está el marcador de peso molecular de Promega “1kb DNA ladder”, en el carril 2 y 3 la muestra A y en el carril 4 y 5 la muestra D.

En la figura 12 se observa una banda cercana a 2 kb, que es el tamaño esperado del gen parcial de 1.907 pb. La muestra fue purificada con el kit de Accuprep de donde se aisló el ADN del fragmento de agarosa extraído del gel. Una vez que el ADN se amplificó y se purificó, se le adicionó una cola poli A y se ligó con el vector de clonamiento p-GEM-T Easy, este es un vector construido que se cortó con la enzima *EcoRV* y se le adicionó una cola de timina en el extremo 3'. Con el fragmento de ADN ligado al vector se procede al clonamiento del gen.

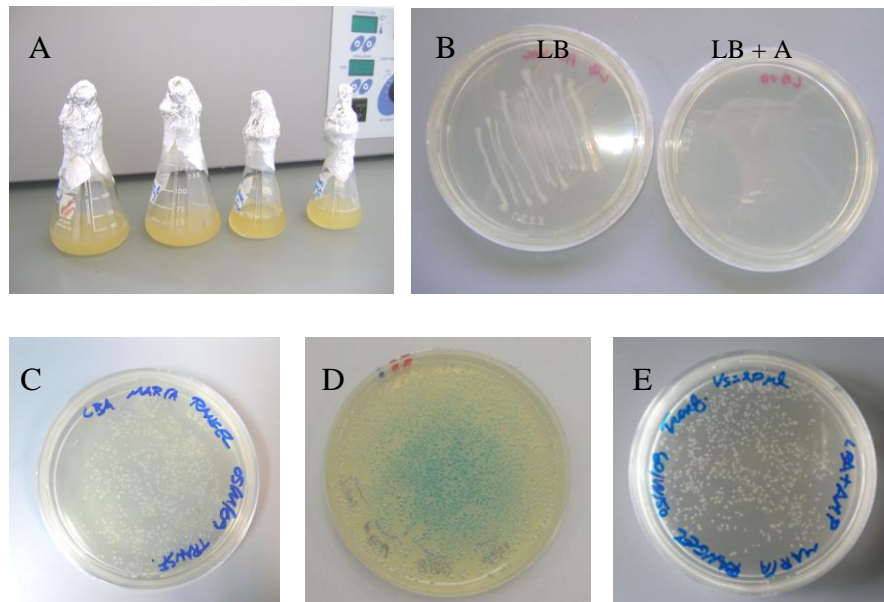


Figura 13. Proceso de clonación del gen HMG-CoA reductasa. (A) Preparación de las células competentes con CaCl_2 . (B) Control de viabilidad de las células competentes DH5 α en placas de LB y LB+AMP. (C) Control de las células DH5 α transformadas en placas de LB y (D y E) Células transformadas usando como marcador selectivo al gen *lacZ* en placas de LB+X-gal+AMP.

Se sembró 1 placa de LB + Ácido nalidíxico y de LB para control fenotípico de la cepa DH5 α , cuando se corroboró el fenotipo de la bacteria, que si crece en LB y también en

ácido nalidíxico, se procedió a realizar el protocolo de competencia. En la figura 13-A, se muestran las fiolas con los cultivos de *E. coli*, ya han alcanzado una D.O.₆₀₀ de 0,4 para iniciar el protocolo de competencia con CaCl₂. En 13-B se ven dos placas sembrada con las células competentes DH5 α como control de viabilidad del método de competencia, en la placa de LB si crecieron las células y en la placa de LB+AMP no crecieron, es decir que las células están vivas y siguen susceptibles a la ampicilina. Se sembró 1 placa de LB con ADN para control negativo de la transformación donde no creció nada. En 13-C se ve 1 placa de LB después de la transformación de las células DH5 α con el vector pGEM-T Easy, donde se observó crecimiento, por lo tanto las bacterias siguen vivas. 13-D y 13-E se sembraron 4 placas de células transformadas en LB+AMP+X-gal, Volumen de siembra (Vs) = 20 μ l (por duplicado), Vs = 50 μ l y Vs = 100 μ l. Para los Vs de 50 y 100 creció un césped, por lo que no se pudo contar el número de colonias transformadas.

Se calculó la eficiencia de transformación (Et) con el Vs = 20 μ l donde se contaron 800 y 768 colonias o UFC (*Unidades Formadoras de Colonias*) en cada placa. Se transformaron 50ng de ADN, pero se diluyeron en 3ml para la transformación.

$$Et = N^{\circ} \text{ colonias}/\mu\text{g ADN} = 784 \text{ UFC} / 0,000016\mu\text{g} = 4,9 \times 10^7 \text{ UFC}/\mu\text{g}$$

Como hubo un alto crecimiento bacteriano en las placas de la figura 13-D y 13-E, significa que la transformación fue exitosa porque el plásmido fue recibido por la bacteria, confiriéndole a esta resistencia a la ampicilina. Otro marcador selectivo aparte del antibiótico es el sustrato X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido), este es un compuesto cromogénico que al ser degradado por la enzima β -galactosidasa se

transforma en un compuesto azul insoluble, es utilizado como indicativo para saber si la célula expresa la enzima β -galactosidasa (codificada por el gen *lacZ*).

La bacteria *E. coli* puede sintetizar la enzima β -galactosidasa, que es capaz de hidrolizar al disacárido lactosa en los monosacáridos glucosa y galactosa. El vector de clonamiento usado en este experimento porta un segmento del ADN de *E. coli*, que contiene la secuencia regulatoria y la información codificante para los primeros 146 aminoácidos de la enzima β -galactosidasa. Esta región está contenida en el sitio de clonamiento múltiple del vector, que posee el marco de lectura para el gen *lacZ*.

La cepa DH5 α por si sola no podrá expresar la enzima, pero cuando es transformada con el vector pGEM-T Easy, la β -galactosidasa podrá sintetizarse de forma completa de manera de ser enzimáticamente activa. Este tipo de complementación, en el cual las mutaciones por delección del segmento proximal del gen *lacZ*, son complementadas por mutantes β -galactosidasa negativos que poseen la porción proximal del gen *lacZ* intacta, es llamada α -complementación. La inserción de un fragmento de ADN exógeno en la zona de clonamiento múltiple del vector, resultará en la producción de una subunidad de β -galactosidasa que no será capaz de complementar la actividad enzimática, por lo que las colonias portadoras del vector ligado al ADN, no serán capaces de metabolizar el sustrato cromogénico originando colonias blancas (13-E). Cuando el vector se circulariza sólo, se produce la α -complementación y sí se transcribe el gen *lacZ* originando las colonias azules (13-D) porque las bacterias degradaron al galactopiranosido X-gal.

Resultados de la identificación *in silico* y caracterización del gen HMG-CoA reductasa

Se realizó la identificación molecular del gen HMG-CoA reductasa del clon 76 del IDEA, comparando la secuencia parcial del mismo con la secuencia proporcionada por el JGI. Después de realizar el alineamiento de ambas secuencias en la página web: www.phytozome.net/cassava, se encontró una similitud de 97,7% entre ellas (figura 14). El análisis no revela la localización cromosómica del gen, pero si su posición en el genoma, la secuencia parcial del gen se encuentra desde el nucleótido 82.396 hasta el 84.024. No hay 100% de similitud entre la secuencia parcial del gen y la secuencia del genoma debido a mutaciones puntuales, como sustituciones, deleciones e inserciones entre ambas secuencias.

Analizando la secuencia genómica del gen HMG-CoA reductasa, se obtuvieron 4 exones (exón 1 de 998pb, exón 2 de 182pb, exón 3 de 347pb y exón 4 de 243pb), 3 intrones (138pb, 354pb y 97pb respectivamente) y se encontraron en la página web las secuencias UTR en la región 5' y en la región 3' (figura 15).

También se muestra la secuencia codificante del gen compuesta por los 4 exones (figura 16) y la secuencia peptídica con el orden que forman los aminoácidos para sintetizar la proteína 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A reductasa (figura 17). Esta secuencia peptídica se analizó con la base de datos del NCBI, hallándose una correspondencia de la secuencia con la familia del gen HMG-CoA reductasa y correlación de la misma secuencia con otras especies de plantas (figura 18). Igualmente al hacer un alineamiento con la secuencia genómica parcial del gen con la base de datos del NCBI, se muestra un 92% de similitud con el mismo gen para la planta de *Hevea brasiliensis* (figura 19), pero no hay tanta similitud con otras plantas, a diferencia de la secuencia peptídica.

Con el programa “BioEdit v7.0.5” se alinearon los exones e intrones del gen HMG-CoA reductasa del genoma de yuca obtenido del JGI, con la secuencia parcial del gen clonado en el IDEA, para poder caracterizar esta última en comparación con el gen completo (figura 20). La secuencia parcial del gen se alinea desde el exón 1 hasta el exón 3, incluyendo los intrones pero el alineamiento no es 100% complementario entre las secuencias, al inicio del exón 1 no hay similitud sino a partir de la base nitrogenada 209, de allí en adelante solo hay diferencias en un par de bases por cada segmento (intrón o exón). Para el final del exón 3, de las 1.907pb que tiene la secuencia parcial del gen hay 1.878pb que se alinean con el gen completo faltando 29 bases que no se complementan con el gen del JGI, pero esas base faltantes es debido a que no se encontró concordancia con el intrón 3, ni con el exón 4 de la secuencia del JGI (2.359pb). En la figura 21 se observa un resumen de la figura 20.



Figura 14. Alineamiento de la secuencia parcial del gen HMG-CoA reductasa del IDEA (query) contra el genoma de la yuca (subject), encontrándose un 97,7% de identidad del gen con el genoma.

Al realizar un alineamiento del fragmento del gen HMG-CoA reductasa obtenido en trabajos previos en el laboratorio con el genoma de la yuca proporcionado por el JGI, se

obtienen los resultados de la figura 14 donde no hay 100% de similitud entre el gen y el genoma (hay concordancia con el genoma desde la base nitrogenada 82.396 hasta la 84.024). La falta de similitud entre las secuencias es debido a una mutación puntual, como lo es una sustitución de una base nitrogenada, también se notan unas ausencias en la secuencias ocasionado por otras mutaciones como una delección o una inserción. No se sabe con certeza qué tipo de mutación es, porque no puede determinarse si es una ausencia o un exceso de nucleótidos en la secuencia de la variedad de yuca en el laboratorio, o es en la secuencia de la variedad de yuca usada para el proyecto genoma de yuca.



Figura 15. Secuencia genómica del gen HMG-CoA reductasa. Se muestran 4 exones, 2 en color azul oscuro (exón 1 de 998pb y exón 3 de 347pb) y 2 en azul claro (exón 2 de 182pb y exón 4 de 243pb), 3 intrones de color blanco (138pb, 354pb y 97pb respectivamente) y están las secuencias UTR en la región 5' (de color verde con 62pb) y 3' (de color rosado con 72pb).

Genomic sequence | Transcript sequence | CDS sequence | Peptide sequence | Show all

key: 5' UTR exons | CDS exons | 3' UTR exons

- Genomic sequence [2493 nucleotides]
- Transcript sequence [1904 nucleotides]
- CDS sequence [1770 nucleotides]

BLAST this sequence: [Phytozome](#) [NCBI](#)

BLAST this sequence: [Phytozome](#) [NCBI](#)

BLAST this sequence: [Phytozome](#) [NCBI](#)

```

ATGGACGCCACAGCCGGCCACCTAAACCAACCGTGCCTCCACCGCCACGACGGCCACATCCACCACCGGAAGCATGCTGCATCGGTTGAACGCCGCCCTT
CATCACCCACTCCAAAAGCATCGGACGCGCTTCCGCTGCCACTCTACCTCACTAACGCTGTTTTCTTCACTCTGTTCTTCTCGGTGGCGTATTACCTCTT
CCACCGGTGGCGAGACAAGATCCGCACTCTACTCCCTTCCATCGTTACTCTCTCTGAAATTGCTGCTATTGTTCCCTCATGCTCTTTCAITTTAC
CTCCTTGGATTCTTCGGTATCGATTTTGTTCAGTCAATTTATGCACGCGCTCCCATGAAGCGTGGGACCTTGACGATACGGATCCCAACTACTCTCATCG
ATGAAGATCACGCTCATCACTGCCCTCCCGCTAGTATATCTACTAAGACTAACCTTGTTCAGCAGCTCCCAAATGCTACTTCGGTACCCTTAAT
TACATCATTAGCTTCGGAGGAAGACGAAATGATTGTCAACTCCGTCGTGAATGGAATCATACCTCCTATCTCTGGAGTCGAAGCTTGGGACTGCAAAA
CGGGCGCAGTGATTCCGGCTGAGGCTTTGACAGGATGACAGGAGGTCGCTGGGAGGCTGCCACTAGAAGGTTTGAATACGAGTCGATTTTAGGGC
AATGCTGTGAATCCAGTGGGTCAGTGCAGATTCCGGTTGGGATTGCGGGCCGTTGTTACTGAACGGCGGGAGTACTCTGTCGATGCTTACCAC
TGAGGTTGTTGTTGCAAGCAAAACAGAGGATGAAGGCGATATACTTGTCAAGTGGGATACCAGCTGTGTTGAAAGGATGGCATGACAAGAGCG
CTGTGCTAGATTCCGACCGCGACTAGAGCCCGGAGTTGAAAGTCTTCTTGGAGGATCCTGACAAATTTGATACCTTGGCCGTCGTTTTAAACAGGT
CCAGTAGATTTCCGAGGCTCCAAAGTATCCAATGCTCTATTGCCGTAATAAATCTTTACATGAGATTGAGCTGCAGCAGCAGCGCAGCAATGGGGATGAA
CATGGTTTCCAAAAGGGTTCAAAAAGTCTTGAATTTCTTCAAAAATGATTTTTCTGATATGGATGTCATTGGCATCTCAGGAAATTTTGTTCGGATAAG
AAGCTGCTGCTGTAAGTGAAGGACGAGGCAATCAGTTGTTGCGAGCAATATCAAGGAGGAGGTTGTAAGAAAGTGTGAAAACAAAGG
TTGCTCCCTAGTGGAGCTCAACATGCTCAAGAATCTGGCTGGTCTGCCATTGCTGGTCTGGTGGATTAAATGCTCATGCAGGCAACATCGTATC
TGCAATCTTATTGCCACTGGTCAAGATCCAGCACAGAACGTTGAGAGTCTCATTGCATTACCATGATGGAAGCTGTCAATGATGAAAAGGATCTCCAC
ATCTCTGTGACCATGCTTCCATTGAGTGGGTACCGTTGGAGGTGGAATCAACTGCATCTCAGTCTGCTTGTCTCAATTTGCTTGGTGGAGGGAG
CAAGCGAAGAAATCTCCAGGATCAAACTCAAGACTCCTGGCCACCATAGTGGCTGTTTCAAGTTTGGCTGGTGGAGCTTCTCTTGTATGCTGCCATTGCAG
TGGGCGAGTTGTGAGGATCACATGAAATCAACAGATCCAGCAAAGATGTGTCCAAAGCTGACTCTTAG

```

Figura 16. Secuencia del CDS del gen HMG-CoA reductasa.

La secuencia del CDS del gen o secuencia codificante, se observa en la figura 16 compuesta por los 4 exones, sin los intrones ya que estos no codifican para la secuencia de la proteína.

Genomic sequence | Transcript sequence | CDS sequence | Peptide sequence | Show all

key: 5' UTR exons | CDS exons | 3' UTR exons

- Genomic sequence [2493 nucleotides]
- Transcript sequence [1904 nucleotides]
- CDS sequence [1770 nucleotides]
- Peptide sequence [590 residues]

BLAST this sequence: [Phytozome](#) [NCBI](#)

BLAST this sequence: [Phytozome](#) [NCBI](#)

BLAST this sequence: [Phytozome](#) [NCBI](#)

BLAST this sequence: [Phytozome](#) [NCBI](#)

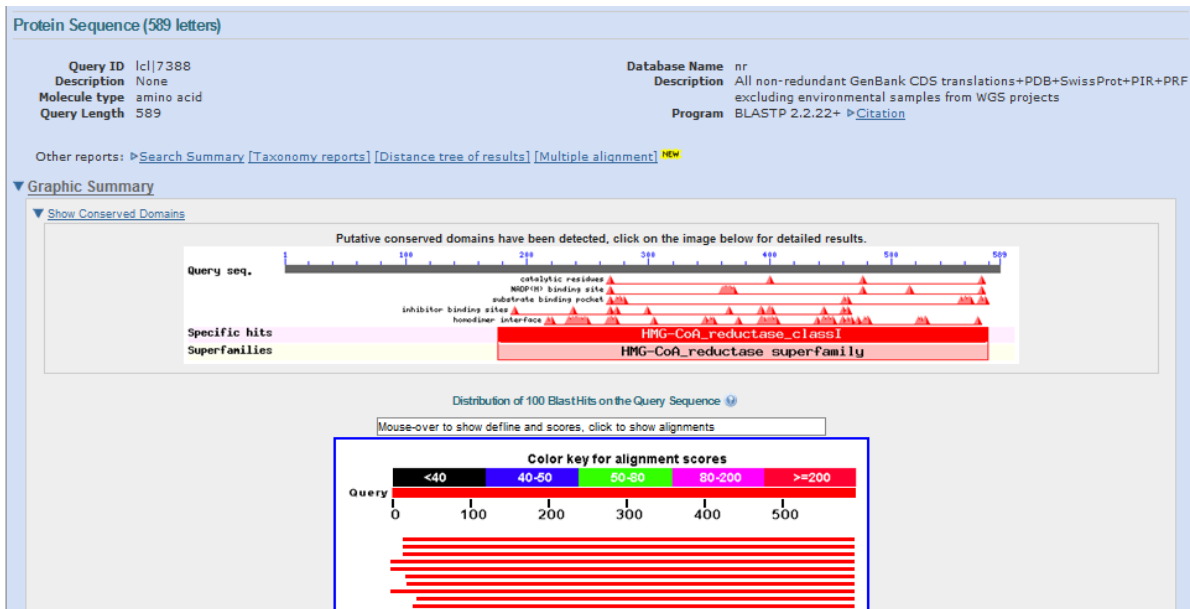
```

MDATSRPPKPPCSTATQGHIIHRKHAASVERRPSSPTPKASDALPLPLYLTVNAVFTLFFSVAYVLLHRWRDKIRNSTPLHIVTLSEIAAIVSLIASFIY
LLGFFGIDFVQSFIAARASHEAWLDDTDFNYLIDEDHRLITCPPASISTRNLAASAKLPTSVPLITSLASEEDEMIVNSVNVGIIIPSYSLERKLGDCR
RAAVIRREALQRMTGRSLGGLPLEGFDYESILGQCCMPFVGVQIPFVGIAGPLLLNGREYSVFMATTEGCLVASTNRGCKAIYLSGGSTSVLLKDGMTA
FVVRFATRAAELKFFLEDPDNFDTLAVVFNRSRFRALQGIQCS IAGKNLYMRFSCSTGDAMGMNVSRGVQNVLEFLQNDPFSMDMDVIGISGMFCSDE
KPAAVNWIEGRGKSVVCEAIKKEEVVKKVLRKTVASLVELNMLRNLGSAIAGALGFENAHAGNIVSAIFIATGQDPAQNVESSHCITMMEAVNDGRDLH
IGVTMPSIEVGTVGGGTQLASQSAICNLNLLGVKGAASESPGNSRLLATIVAGSVLAGELSLMSAIAAGQLVRSHMRYNRS3KDVSKAAS*

```

Figura 17. Secuencia peptídica del gen HMG-CoA reductasa.

La secuencia peptídica de la figura 17 indica cuál es el orden de los aminoácidos que forman la proteína 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A reductasa.



Descriptions

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
sp P29057.1 HMDH1_HEVBR RecName: Full=3-hydroxy-3-methylgluta...	1092	0.0
dbj BAF98282.1 hydroxymethylglutaryl-CoA reductase [Hevea br...	1089	0.0
gb AAU08214.1 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductas...	1088	0.0
ref XP_002510732.1 hmg-CoA reductase, putative [Ricinus comm...	1045	0.0
ref XP_002301898.1 predicted protein [Populus trichocarpa] >...	1013	0.0
gb ABK56831.1 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase [Euph...	978	0.0
ref XP_002275827.1 PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vi...	968	0.0
gb AAV54051.1 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductas...	959	0.0
ref XP_002306999.1 predicted protein [Populus trichocarpa] >...	951	0.0
gb ABF56518.1 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductas...	945	0.0
sp F14891.1 HMDH1_ARATH RecName: Full=3-hydroxy-3-methylgluta...	934	0.0
ref NP_177775.2 HMG1 (HYDROXY METHYLGLUTARYL COA REDUCTASE 1...	933	0.0
dbj EAA36291.1 HMG-CoA reductase [Cucumis melo] >gb ACZ50511...	932	0.0
gb AAD03789.1 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductas...	931	0.0
gb AAB69727.1 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductas...	930	0.0
gb AAB87727.1 hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase [N...	919	0.0
gb AAL54879.1 AF004233.1 hydroxy-methyl-glutaryl-coenzyme A r...	918	0.0
gb AAO85554.1 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase [Nico...	917	0.0
gb AAB69726.1 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductas...	915	0.0
sp Q01559.1 HMDH_NICSY RecName: Full=3-hydroxy-3-methylglutar...	915	0.0
gb AAL54878.1 AF004232.1 hydroxy-methyl-glutaryl-coenzyme A r...	914	0.0
sp Q41438.1 HMDH3_SOLTU RecName: Full=3-hydroxy-3-methylgluta...	911	0.0
sp Q9XEL8.1 HMDH2_CAPAN RecName: Full=3-hydroxy-3-methylgluta...	910	0.0
emb CAA48611.1 hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (NADPH) [...	910	0.0
sp F48020.1 HMDH1_SOLTU RecName: Full=3-hydroxy-3-methylgluta...	909	0.0
gb AAB62581.1 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase 2 [So...	909	0.0
ref XP_002265638.1 PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vi...	908	0.0
gb ABC74565.1 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase [Picr...	908	0.0
ref XP_002300544.1 predicted protein [Populus trichocarpa] >...	906	0.0
gb AAV68034.1 3-hydroxy-methylglutaryl coenzyme A reductase ...	901	0.0

Figura 18. Alineamiento de la secuencia peptídica del gen HMG-CoA reductasa con la base de datos del NCBI.

En la figura 18 se observa que el alineamiento de la secuencia peptídica del gen HMG-CoA reductasa corresponde con esta familia de genes, siendo la secuencia que aparece primero en las descripciones del alineamiento la secuencia del mismo gen para

Hevea brasiliensis, posteriormente se muestran otras plantas (*Cucumis melo*, *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, entre otras) con la misma secuencia peptídica codificada por el gen. Igualmente al hacer un alineamiento con la secuencia genómica parcial del gen del IDEA (figura 19) y el NCBI, se muestra un 92% de similitud con el mismo gen para la planta de *Hevea brasiliensis*, pero no hay similitud con otras plantas, a diferencia de la secuencia peptídica, porque al estar incompleta la secuencia origina una proteína truncada.

Nucleotide Sequence (1907 letters)

Query ID |cl|16609
 Description None
 Molecule type nucleic acid
 Query Length 1907

Database Name nr
 Description All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
 Program BLASTN 2.2.22+ [Citation](#)

▼ Descriptions

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer

Sequences producing significant alignments:
 (Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
X54657.1	H.brasiliensis HMGR1 gene for 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme	1886	1886	92%	0.0	86%	
AY352338.1	Hevea brasiliensis 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase	1855	1855	92%	0.0	85%	
AB294692.1	Hevea brasiliensis HbHMGR mRNA for hydroxymethylglutaryl-CoA rec	1031	1481	56%	0.0	94%	
AY706757.1	Hevea brasiliensis 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase	1031	1481	56%	0.0	94%	
X54659.1	H.brasiliensis HMGR1 mRNA for 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzym	1031	1481	56%	0.0	94%	
AF429388.1	Hevea brasiliensis hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase mRN	1026	1475	56%	0.0	94%	
X54658.1	H.brasiliensis HMGR2 mRNA 3-hydroxy-3-methylglutaryl conenzyme	405	405	15%	5e-109	91%	
EU296534.1	Cyclocarya paliurus 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reducta	309	309	15%	4e-80	85%	
AM482611.1	Vitis vinifera, whole genome shotgun sequence, contig VV78X19236	298	298	15%	8e-77	84%	
AM473141.1	Vitis vinifera, whole genome shotgun sequence, contig VV78X19236	298	298	15%	8e-77	84%	
XM_002275791.1	PREDICTED: Vitis vinifera hypothetical protein LOC100265082 (LOC1	296	296	15%	3e-76	84%	UG
AM454433.2	Vitis vinifera contig VV78X195465.30, whole genome shotgun seque	239	239	15%	5e-59	81%	
XM_002283147.1	PREDICTED: Vitis vinifera hypothetical protein LOC100245191 (LOC1	237	237	15%	2e-58	81%	UG
XM_002510686.1	Ricinus communis hmq-CoA reductase, putative, mRNA	193	193	10%	4e-45	84%	G
AM269751.1	Suqarcane grassy shoot phytoplasma partial 16S rRNA gene, isolate	119	119	3%	7e-23	100%	

Figura 19. Alineamiento de la secuencia parcial del gen obtenida en el IDEA con la base de datos del NCBI.

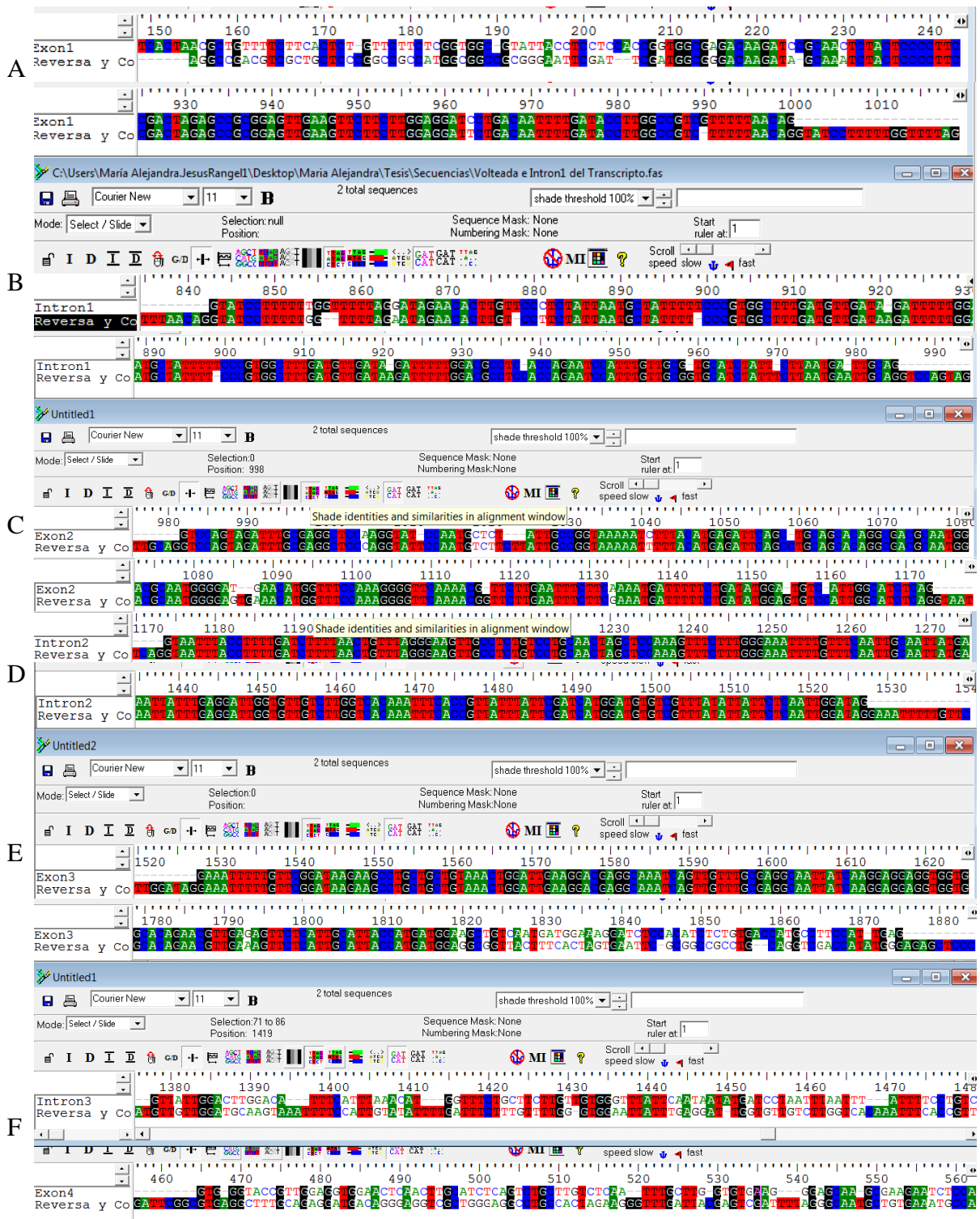


Figura 20. Alineamiento de los exones e intrones del gen HMG-CoA reductasa del genoma de yuca con la secuencia parcial del gen del IDEA. (A) Alineamiento del exón 1. (B) Alineamiento del intrón 1. (C) Alineamiento del exón 2. (D) Alineamiento del intrón 2. (E) Alineamiento del exón 3. (F) Alineamiento del intrón 3 y exón 4.

En la figura 20 se muestra el resultado del alineamiento de los exones e intrones del gen HMG-CoA reductasa del genoma de yuca obtenido del JGI, con la secuencia parcial del gen clonado en el IDEA, para poder caracterizar esta última en comparación con el gen completo. 20-A la secuencia parcial del gen se alinea con la base nitrogenada número 155 del exón 1, pero el alineamiento no es 100% complementario entre las secuencias, no hay similitud desde el inicio sino desde la base nitrogenada 209 donde se emparejan las secuencias hasta la base número 1.000. Si a esas 1.000 bases se restan las 155 iniciales, el gen parcial se alinea con 845 bases del exón 1. Figura 20-B se observa casi completa concordancia cuando se compara la secuencia del intrón 1 con la secuencia parcial del gen, encontrándose un alineamiento de 142 bases. En la figura 20-C se observa el análisis con el exón 2, una buena complementariedad de bases desde la 982 hasta la 1.173 de la secuencia parcial dando como resultado 191 bases en común. En la figura 20-D, continuando con el alineamiento de la secuencia parcial del gen HMG-CoA reductasa con el intrón 2 obtenido por el JGI, se unen ambas secuencias en la base número 1.174 hasta la 1.527, para una complementariedad de 353pb. En 20-E continúa el alineamiento del exón 3 en la base 1.528 hasta la 1.875, uniéndose ambas secuencias por 347 bases. Para el final del exón 3 sumando las bases donde se alinean ambas secuencias deberían haber 1.878 bases del fragmento del gen del IDEA que contiene 1.907 bases, es decir que faltan 29 bases que no se complementan con el gen del JGI. Figura 20-F, las 29 bases que faltan de la secuencia parcial es debido a que no se encontró concordancia con el intrón 3, ni con el exón 4 de la secuencia del JGI.

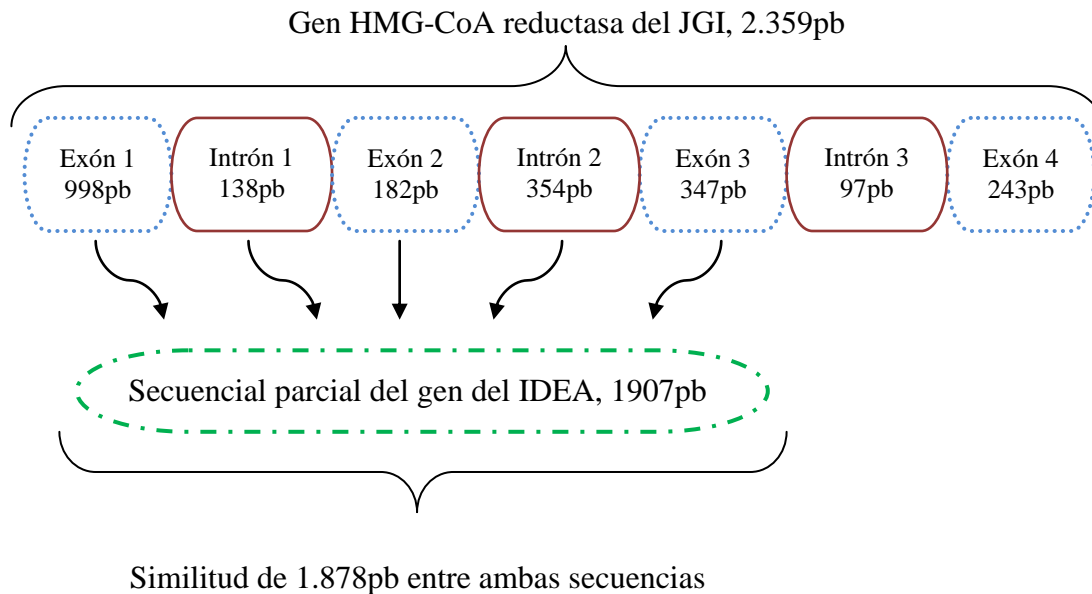


Figura 21. Resumen de la figura 20 mostrando la relación entre la secuencia del gen HMG-CoA reductasa del JGI y la secuencia parcial del gen del IDEA.

Resultados del aislamiento de ARN

Se diseñó un par de cebadores específicos para amplificar el gen HMG-CoA reductasa de la planta de yuca, con la secuencia proporcionada por el JGI y donde hubiera completa complementariedad con la secuencia parcial del gen del IDEA. Los cebadores hibridan en el exón 2 y 3 de la secuencia (figura 22). El otro par de cebadores diseñados fueron para amplificar el gen Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, gen control de la qPCR, que amplifica en el exón 4 de ese gen y se elaboró con la secuencia del JGI. Los resultados del diseño de los cebadores se muestran en la tabla 1.

El aislamiento del ARN total del clon 76 de yuca, se realizó para las plantas en las siguientes condiciones: *in vitro*, en el campo y en campo con un corte de tallo. No se pudo realizar el aislamiento del ARN para la planta en la condición de invernadero, debido a que

no había plantas en buen estado, las hojas estaban marchitas y el aislamiento de ARN no fue exitoso, pues se necesitan hojas frescas para la extracción.

El ARN se incubó con una enzima DNasa, para eliminar el ADN que pudiera estar presente en la muestra después del aislamiento y que interfiere con la transcripción reversa del ARN, causando falsos positivos y creando contaminación en la qPCR para determinar la expresión del gen HMG-CoA reductasa.

Después del aislamiento y purificación de las muestras del ARN, este se desnaturalizó con formaldehído y formamida y se separó en un gel de agarosa desnaturalizado (gel FA), para evitar que forme estructuras secundarias y se vea afectado su patrón de migración.

Luego de visualizar el ARN en el gel, este se encontró en óptimas condiciones, procediendo así a la transcripción reversa del mismo. Para evaluar los resultados de esa metodología, se realizó una PCR convencional de las muestras de ARN transcritas y estas se observaron en un gel de agarosa al 1% donde amplifican solo las muestras que contenían el ARN y la transcriptasa reversa. Las muestras con ARN y taq polimerasa no amplifican, porque si lo hacen es debido a una contaminación del ARN con ADN.

A las muestras del ADN copia se les realizó la PCR en tiempo real para ver la expresión del gen HMG-CoA reductasa. La muestra con los cebadores que amplifican el gen anterior y los cebadores del gen control se realizaron por triplicado para disminuir el error estadístico.

Tabla 1. Lista de cebadores diseñados con el programa MacVector 11.0.4.

Cebadores	Genes	Secuencia del Cebador	% G+C	Tm
Delantero	HMG-CoA reductasa	5'- GGCTCCAAGGTATCCAATGC -3'	55,0	55,6° C
Reverso	HMG-CoA reductasa	5'- GCAGCAGGCTTCTTATCCG -3'	57,9	54,8° C
Delantero	G3PDH	5'- CGAAAAGCCTGTGACCGTC -3'	57,9	55,2° C
Reverso	G3PDH	5'- GGTGAACACTCCAGTTGATTCC -3'	50,0	54,6° C

El par de cebadores diseñados para amplificar un fragmento del gen HMG-CoA reductasa, muestran un producto de amplificación de 196 pb. El cebador delantero hibrida en el exón 2 del gen, en la base 1.016 hasta la 1.035. El cebador reverso hibrida en el exón 3, en la base 1.211 hasta la 1.193 (figura 22).

El gen G3PDH es un gen de expresión constitutiva y fue utilizado como control del experimento de expresión del gen HMG-CoA reductasa en la PCR en tiempo real. El cebador delantero del gen G3PDH, hibrida en la base 216 hasta la 234 y el cebador reverso hibrida desde la base 315 hasta la 294. Este par de oligos se diseñaron para amplificar un fragmento de 100 pb.

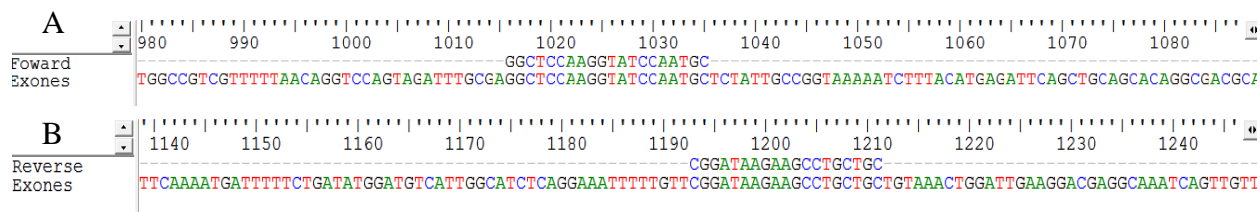


Figura 22. Hibridación de los cebadores diseñados para amplificar el gen HMG-CoA reductasa en la qPCR. (A) Hibridación del cebador delantero en el exón 2 del gen. (B) hibridación del cebador reverso en el exón 3 del gen.

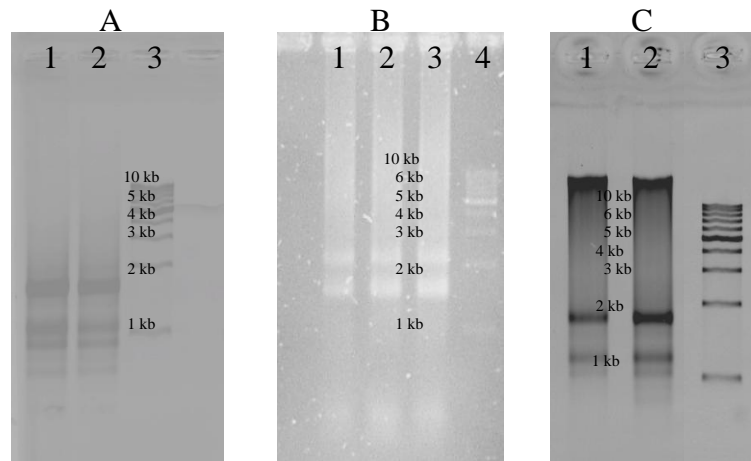


Figura 23. Gel FA 1% con muestras de ARN aisladas con el kit de Qiagen en diferentes condiciones climáticas. (A) En los carriles 1 y 2 están duplicados del ARN extraído de la planta en la condición *in vitro*, en el carril 3 está el marcador de peso molecular de Promega “1kb DNA ladder”. (B) En el carril 1, 2 y 3 se muestran replicas del ARN aislado de la planta en la condición de campo, en el carril 4 está el marcador de peso molecular “1kb DNA ladder”. (C) En el carril 1 y 2 se muestran duplicados del ARN de la planta extraído en la condición campo después de un corte de tallo, en el carril 3 está el marcador de peso molecular “1kb DNA ladder”.

En la figura 23 se ven las muestras de ARN en los geles FA 1%, se observa una banda cercana a 2 kb correspondiente al ARN 28S (4,5 kb), la subunidad mayor del ribosoma y la segunda banda se encuentra cerca de 1 kb que sería 18S (1,9 kb), la subunidad menor del ribosoma. En cada pocillo se cargaron 4 μ l de la muestra y 2 μ l del tampón de carga 5X. En la figura 23-A se observan las muestras de ARN en la condición *in vitro*, la concentración de cada muestra se determinó con el espectrofotómetro “Nano drop”: 225,9 ng/ μ l y 310,1 ng/ μ l para el carril 1 y 2 respectivamente, el gel se leyó en el escáner “Typhoon 9.410”.

En la figura 23-B, se ven las muestras de ARN en la condición en campo, la concentración de las muestras se determinó con el espectrofotómetro “Nano drop”: 147,2 ng/ μ l, 159,4 ng/ μ l y 110,2 ng/ μ l, para el carril 1, 2 y 3 respectivamente, el gel se reveló en un transluminador y se tiñó con bromuro de etidio. Para el carril 1 y 2 de la figura 23-C se

determinó la concentración de las muestras de ARN en un espectrofotómetro “Nano drop”: 121,8ng/μl y 163,5ng/μl respectivamente, el gel se leyó en el escáner Typhoon 9.410.

El peso de las bandas se obtuvo de la bibliografía, ya que el marcador de peso molecular es para medir el peso del ADN y no de ARN (Scott, 1987).

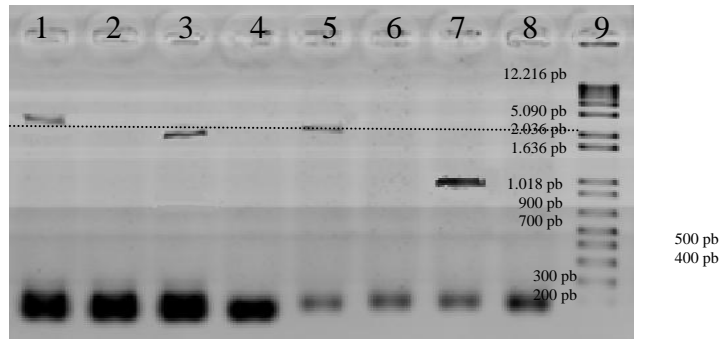


Figura 24. Gel de agarosa al 1% con las muestras de la PCR después de la transcripción. En los carriles 1 y 2 se encuentra el ARN aislado en la condición *in vitro*, para el carril 1 el ARN lleva transcriptasa reversa, para el carril 2 el ARN lleva taq polimerasa. En los carriles 3 y 4 se encuentra el ARN aislado en la condición en campo, en el carril 3 el ARN lleva transcriptasa y en el carril 4 contiene taq polimerasa. En los carriles 5 y 6 se observa el ARN aislado en la condición campo después de un corte de tallo, para el carril 5 está el ARN con la transcriptasa, el carril 6 contiene el ARN con taq polimerasa. En el carril 7 se encuentra el control positivo, 1,2 kb del gen que codifica para la kanamicina. En el carril 8 está control negativo, todos los reactivos menos el ARN. En el carril 9 esta el marcador de peso molecular “1Kb plus DNA ladder”.

En la figura 24 se comprueba que el ARN aislado y tratado con la DNasa quedo libre de ADN, al realizar la transcripción reversa del ARN este ácido nucleico es el único que amplifica, ya que al realizar una PCR con el producto de la transcripción reversa, sólo se observan bandas de amplificación en las muestras que contenían la enzima transcriptasa reversa (carriles 1, 3 y 5). En las muestras que contenían la enzima taq polimerasa no se observaron bandas amplificadas (2, 4 y 6), como esta enzima amplifica solamente ADN y no hubo amplificación, entonces se puede decir que el ARN no está contaminado con ADN.

Pero hay un error en la amplificación de las muestras transcritas, ya que se usaron los cebadores diseñados en un trabajo previo para la PCR inversa y estos amplifican fragmentos circulares de ADN. Por lo tanto, esta amplificación señala que hay algún ADN circular en la muestra que amplificó un fragmento de más de 2 kb, un tamaño mayor que la secuencia codificante (figura 16) del gen HMG-CoA reductasa.

Al realizar la PCR en tiempo real con las condiciones descritas en los materiales y métodos, no se obtuvo una amplificación de ADN, lo que amplificó fueron dímeros de los cebadores creando falsos positivos. Esto puede ser debido a que no se estandarizó correctamente la PCR normal con los cebadores diseñados para la qPCR. Esta PCR normal se realizó con los reactivos y las concentraciones descritas en los métodos de este trabajo para la qPCR y aparentemente se observó una banda amplificada de casi 200 pb (figura no mostrada en la tesis), correspondientes con el producto de amplificación de los cebadores diseñados para el gen HMG-CoA reductasa. Pero esa PCR se reveló en un gel de agarosa 0,8%, por lo tanto no se discriminan bandas de bajo peso molecular, dejando la duda en los resultados.

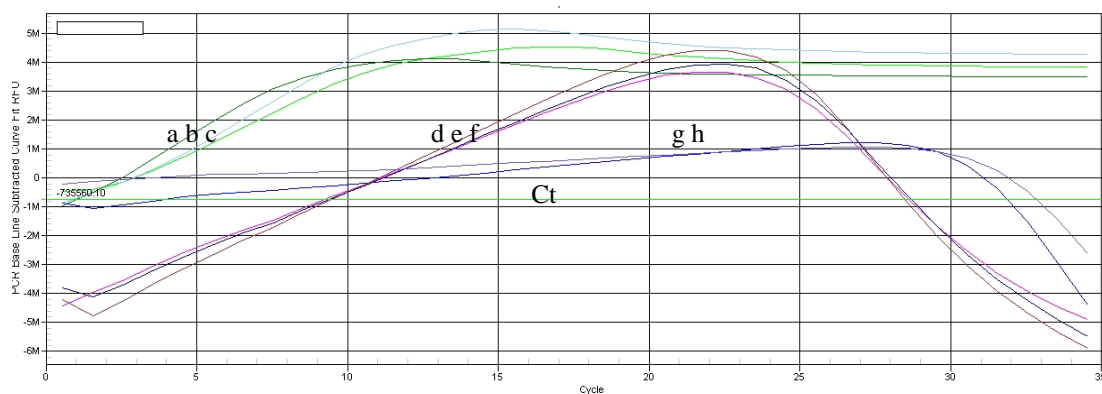


Figura 25. Cuantificación del gen HMG-CoA reductasa. Las curvas a, b y c corresponden a la amplificación del gen HMG-CoA reductasa, la curva g es el control negativo. Las curvas d, e y f corresponden al gen G3PDH, la curva h es el control negativo.

Tabla 2. Valores de Ct de las muestras de la PCR en tiempo real.

Genes	Curvas de la figura 25	Valor de Ct
HMG-CoA reductasa	a	00,00
HMG-CoA reductasa	b	00,98
HMG-CoA reductasa	c	00,98
Control negativo	g	3,97
G3PDH	d	09,29
G3PDH	e	09,45
G3PDH	f	09,45
Control negativo	h	0,5

En las qPCR se detecta la generación exponencial de ADN doble cadena por cada ciclo de amplificación, usando un fluoróforo que se une inespecíficamente a este, como es el SYBR Green, por lo tanto amplifican también dímeros de cebadores, aparte de los genes en estudio.

En la figura 25, se muestra una gráfica de cuantificación de PCR en tiempo real. El eje vertical representa el número de copias del ADNc medido en unidades de fluorescencia y el eje horizontal se observan el número de ciclos de la qPCR. La línea verde representa el valor de Ct, o base para determinar la cantidad de ADN presente en la amplificación. La línea base se refiere a los ciclos iniciales en los que no hay cambios detectables en la cantidad de fluorescencia, y solo se detecta la fluorescencia basal. Cuando se produce un cambio significativo en la fluorescencia se determina el Ct, identificando el ciclo en el cual se eleva la intensidad de la fluorescencia por encima del ruido de fondo, en la fase exponencial de la reacción de la PCR, es decir, el valor Ct está representado por el ciclo en el cual la producción de fluorescencia cruza el umbral establecido (Bustin, 2.000).

Cuanto menor sea el valor Ct, la muestra tiene más cantidad de ADN y alcanza más rápido el umbral o base, pero en la figura 25 los Ct para el gen HMG-CoA reductasa eran casi de cero (tabla 2), por lo tanto hay un error en la qPCR probablemente contaminación de la muestra y falsos positivos por las uniones entre los cebadores, porque el valor del umbral debe ser más alto, mayores de 20, según la literatura. El Ct para el gen G3PDH era de 9 (tabla 2), pero en la literatura está reportado valores de cuantificación entre 18 y 20 (Beltrán, 2.009), el valor de 9 es muy bajo indicando una incongruencia de los resultados de la figura 25, confirmando que esa gráfica no expresa la cuantificación real de los genes, hay una contaminación en las muestras.

El control negativo siempre se realiza sin ADN para ver la falta de fluorescencia, pero en la figura 25 se observa una pequeña amplificación, producto de uniones entre los cebadores. El control positivo fue el gen G3PDH que tuvo una amplificación más lenta que el gen HMG-CoA reductasa pero alcanzaron el mismo máximo.

Se realizaron varias amplificaciones de la qPCR aumentando la concentración de ADNc a 50ng y se agregaron 1 mM más de MgCl₂ a la mezcla de reacción, pero se obtuvieron resultados similares, por lo tanto hay que estandarizar primero la PCR normal de las muestras con los cebadores de qPCR y las concentraciones de los reactivos, antes de hacer la PCR en tiempo real.

Discusión de Resultados

El aislamiento de ADN fue exitoso (figura 9), obteniéndose gran cantidad para realizar la digestión enzimática con la endonucleasa *EcoRV*, esta enzima no posee un sitio de restricción en la secuencia del gen HMG-CoA reductasa. La digestión del ADN se realiza alrededor de 1 kb del gen, permitiendo obtener un fragmento con el gen completo para su posterior amplificación.

Después de la digestión del ADN (figura 10), se realizó una ligación para obtener un fragmento circular porque la PCR inversa amplifica moléculas circulares de ADN. En la muestra se tendrán los dos tipos de ligaciones: la intramolecular y la intermolecular, pero con una gran concentración de ADN se favorece el primer tipo de ligación.

Después de obtener los fragmentos de la digestión ligados, se procedió con la realización de la PCR inversa (figura 11) para amplificar una región intermedia del gen HMG-CoA reductasa de yuca, ya que los cebadores diseñados hibridan en el exón 2 del gen y amplifican hacia los extremos, pudiendo así completar la secuencia parcial del gen obtenida en trabajos previos en el IDEA, ya que faltaban las regiones 5' y 3' del gen. La enzima Platinum Pfx usada como polimerasa en la PCR inversa, posee actividad exonucleasa 3'-5', por lo que provee una alta fidelidad de replicación y una elevada procesividad y velocidad de extensión de cadenas, gracias a esta enzima y a los cebadores usados se esperaba amplificar el gen completo para poderlo clonar y secuenciar.

Con el fragmento de ADN amplificado y purificado de 2 kb (que contenga al gen HMG-CoA reductasa), se realizó el clonamiento ligando el ADN al vector de pGEM-T Easy, este se usó porque contiene un sitio múltiple de clonamiento con una región que

codifica para la enzima β -galactosidasa, también sitios múltiples de restricción, marcador de resistencia para ampicilina y un origen de replicación (Promega).

Cuando el DNA exógeno a la bacteria ha sido ligado en el vector, debe entonces introducirse en la célula hospedadora. La más usada es *E. coli* pues, la clonación se realiza directamente en la bacteria y se utiliza para la amplificación del ADN recombinante. Las células con capacidad de ser transformadas (de captar ADN) se denominan competentes, esta transformación consiste en tratar la membrana de *E. coli* que usualmente es muy impermeable, con CaCl_2 a 0° de modo que queda afectada la pared celular y el ADN es capaz de adherirse a los sitios accesibles de dicha pared. Después un corto choque térmico a 42°C favorece la incorporación del ADN. Las células se recuperan por incubación en un medio completo, antes de ser sembradas en el medio selectivo correspondiente (Luque, 2.001). Este proceso de competencia se realizó con la cepa DH5 α de *E. coli* para insertar el vector de clonamiento con el fragmento del gen HMG-CoA reductasa y obtener así las bacterias transformantes y recombinantes (figura 13).

Al calcular la eficiencia de transformación de las bacterias recombinantes, sólo se usó el menor volumen de siembra (20 μl) en las placas de LB+AMP+X-gal, ya que, para los volúmenes de 50 μl y 100 μl creció un césped, lo que indica que había mucha cantidad de ADN en la transformación y las bacterias alcanzaron una alta densidad de crecimiento, por lo tanto debió hacerse una dilución primero antes de sembrar las células transformadas en las placas. A pesar de la concentración de las células transformadas en las placas se pudo calcular una buena Et, por encima de 10^7 UFC/ μg .

Tanto las colonias blancas como las colonias azules indican que la transformación fue exitosa, porque el plásmido fue recibido por la bacteria confiriéndole a esta resistencia al marcador selectivo, la ampicilina. Otro marcador de la transformación aparte del antibiótico fue el sustrato X-gal que al ser degradado origina colonias azules, pero este marcador es indicativo para saber si las colonias son solo transformantes (con el vector) o son recombinantes (con el vector y el ADN). Las colonias blancas se originan cuando el material genético foráneo se inserta en el vector p-GEM-T Easy interrumpiendo el marco de lectura del gen *lacZ*, no hay producción de la enzima β -galactosidasa y no se degrada el sustrato. Cuando el vector no tiene el inserto de ADN, no se interrumpe el marco de lectura y sí se transcribe el gen *lacZ* originando las colonias azules por la degradación del medio.

El crecimiento de más colonias azules que blancas indican que hay un problema en el protocolo, puede ser en la adición de la cola poli A al fragmento del ADN, por lo tanto se debe verificar la temperatura y el tiempo de incubación del material genético con la adenina, ya que si no se incorpora este nucleótido al ADN no va a haber la unión entre el ácido nucleico y el vector. También puede ser un problema en la ligación del ADN poli adenilado con el vector de clonamiento, la unión entre ellos no está funcionando y se favorece solamente la ligación intramolecular del vector, para evitar esto debe agregarse mayor cantidad de ADN en la reacción, favoreciendo la ligación entre el vector y el ADN. Pero es muy raro que se circularice el vector sólo, ya que este posee en un extremo una cola de timinas para mantenerlo en una forma lineal, puede ser que el reactivo ya venía con un vector en forma circular y este es el que está originando las colonias azules.

La idea inicial de clonar el gen HMG-CoA reductasa era secuenciar el gen y completar la secuencia obtenida en los trabajos previos del laboratorio del IDEA, para

luego medir la expresión del gen. Como en noviembre de 2.009 publicaron el genoma de yuca, se consiguió la secuencia requerida, por esto no se terminó de clonar el gen sino que se procedió a realizar un análisis de ese genoma con la secuencia parcial del gen, para poder caracterizar esta última. A partir de la secuencia completa del gen se diseñaron unos cebadores para realizar la expresión del gen mediante una PCR en tiempo real.

Al realizar el alineamiento de la secuencia del genoma completo de la yuca (información obtenida por el JGI) con la secuencia del fragmento del gen obtenido en el IDEA, se obtuvo como resultado que no hay 100% de similitud entre ambas secuencias (figura 14), sólo 97,9% debido a los polimorfismos de un solo nucleótido o SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). El SNP es una variación en la secuencia de ADN que afecta a una sola base de una secuencia del genoma, se consideran una forma de mutación puntual, ya sean deleciones o mutaciones, que han sido lo suficientemente exitosas evolutivamente para fijarse en una parte significativa de la población de una especie (Lewin, 2.008). Sin embargo también se consideran que cambios de unos pocos nucleótidos, como pequeñas inserciones y deleciones pueden ser consideradas como SNP (Gibson, 2.004).

Al realizar el análisis de las secuencias de exones e intrones del gen HMG-CoA reductasa del genoma de yuca, con la secuencia parcial del gen clonado en el IDEA, se obtiene que el alineamiento entre ambas secuencias no es 100% complementario entre ellas, para el exón 1 es a partir de la base nitrogenada 209 donde hay homología en las secuencias (figura 20). A partir de esa base nitrogenada hasta el exón 3 (incluyendo los intrones entre ellos) sólo se encuentran diferencias en un par de bases por cada segmento (intrón o exón). Para el intrón 3 y el exón 4 de la secuencia del JGI no hay concordancia con la secuencia parcial del gen, faltando 29 bases de las 1.907pb reportadas por alinearse.

Las 1.907pb de la secuencia parcial no concuerdan perfectamente con el gen completo, sobran unas bases al inicio del exón 1 y otras bases al final del exón 3. Esa incongruencia es debido a la PCR inversa para amplificar el fragmento; los cebadores que se diseñaron en el trabajo previo, amplifican desde la región central hacia los extremos y por tener temperaturas de hibridación bajas se unen a fragmentos inespecíficos. Es posible que al final de la extensión del ADN amplificado, hibridaran nucleótidos inespecíficos en el inicio y final del segmento que se clonó de 1.907pb, originando tantos errores entre las secuencias analizadas del mismo gen. Si se eliminan las bases del fragmento del gen que no se alinean con el gen completo, se eliminan muchos de los SNP observados en los resultados, quedando sólo algunas mutaciones puntuales entre las secuencias alineadas desde la base 209 del exón 1 hasta la base 1.820 del exón 3. Los polimorfismos de un solo nucleótido que quedan en el alineamiento de las secuencias también se deben a que a pesar de ser la misma especie de yuca, son dos variedades diferentes.

La secuencia del gen del IDEA viene de una variedad de planta diferente a la planta de donde se tomo la secuencia del gen del JGI, ocasionando diferencias genotípicas en la misma planta, por esto son las mutaciones observadas. Otra explicación para el exceso de SNP es una errónea edición en la secuencia del gen parcial del IDEA, este pudo no secuenciarse correctamente mostrando varias incongruencias en la secuencia del gen vs el genoma.

En los resultados se muestra la secuencia genómica del gen HMG-CoA reductasa (figura 15), mostrando la longitud de los exones e intrones con que se comparó la secuencia parcial del gen del IDEA, la secuencia del CDS (figura 16) y la secuencia peptídica (figura 17). Esta última se analizó con la base de datos del NCBI, observándose que el

alineamiento de la secuencia peptídica del gen HMG-CoA reductasa corresponde con esta familia de genes, y con secuencias del mismo gen para plantas como *Hevea brasiliensis*, *Cucumis melo*, *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays*, entre otras (figura 18). Mientras que al realizar un alineamiento con la secuencia genómica parcial del gen del IDEA y el NCBI, se muestra un 92% de similitud con el mismo gen para la planta de *Hevea brasiliensis*, pero no hay similitud con otras plantas (figura 19), esto es debido que la organización nucleotídica es bastante similar entre yuca y *Hevea*, también la secuencia parcial del gen podría considerarse un pseudogen, ya que es una secuencia nucleotídica similar a un gen normal pero que no da como resultado un producto de expresión, porque la proteína está truncada por falta de una parte de la secuencia del exón 1 y ausencia del exón 4 en el fragmento del gen del IDEA.

Las secuencias UTR corresponden a regiones no traducidas de los genes. Se hallan generalmente en los extremos 5' y 3' de las secuencias, son las dos partes no traducidas de cada gen, debido a que se encuentran colindando con el marco abierto de lectura (ORF en inglés *Open Reading Frame*). El UTR que está “aguas arriba” del extremo 5' conecta con el ORF mediante el carbono 5' de la desoxirribosa del primer desoxirribonucleótido es decir, de la adenina del codón de inicio. “Aguas abajo” se sitúa el 3'-UTR y conecta mediante el carbono 3' del último desoxirribonucleótido del ORF es decir, el último del codón de parada (Griffiths, 2.008).

Después de analizar y caracterizar la secuencia parcial del gen del IDEA, se realizó un diseño de cebadores con la secuencia completa del gen para poder realizar la expresión del mismo en una PCR en tiempo real. Para esto se aisló ARN para usarlo de molde y amplificar el gen a partir de los ARN mensajeros.

Para el aislamiento de ARN, hay que tomar varias precauciones para evitar que se degrade. Todo el material a usar debe ser nuevo preferiblemente, ya que las RNasas no se inactivan en su totalidad en el autoclave, limpiar el mesón de trabajo y el material con una solución 0,5N de NaOH o una solución de DEPC al 0,1% y lo que se requiera esterilizar se autoclava 2 veces y se coloca en una estufa a 200° C durante 48 horas.

Al realizar la extracción del ARN de las hojas de la planta *in vitro*, se siguió el protocolo del kit de Qiagen (figura 23), pero para la hojas de la planta de campo el tiempo de macerado con el tampón de lisis se aumentó, ya que las hojas eran más grandes y el tejido fue más difícil de disgregar y no se aislaba tanto ARN como en la planta *in vitro*. Una vez que se realizó la extracción se trató el ARN con una DNasa para asegurar que sólo va a haber ARN al hacer la transcripción reversa y ese ADN copia que se sintetizó fue el utilizado en la PCR en tiempo real. Si hay contaminación de ADN en la muestra de ARN, al momento de realizar la qPCR no se va a medir la expresión del gen producto del ARN mensajero, sino lo que se va a amplificar es el ADN que ya tenía la muestra.

El ARN tiende a plegarse sobre sí mismo y a formar estructuras secundarias, estas evitan que el material genético migre correctamente ocasionando errores en la corrida electroforética, por esto se usó un gel de formaldehído y se desnaturizó el ARN al momento de visualizarlo.

Al realizar la transcripción reversa del ARN y probar el experimento con una PCR (figura 24), se notó que fue exitosa la digestión enzimática y el ARN quedó libre de impurezas y de ADN, sólo así se puede realizar la qPCR.

Los cebadores diseñados para la qPCR (tabla 1) tienen un porcentaje de G+C entre 50 y 60, es decir su contenido de guanina y citosina es alto, ya que los pares G-C en el ADN están conectados por tres enlaces de hidrógeno en vez de dos enlaces como los pares A-T. Esto hace el enlace G-C más fuerte y más resistente a la desnaturalización por efecto de la temperatura, un alto contenido de G-C implica una temperatura de desnaturalización más alta, por lo tanto es más estable el cebador (Madigan, 2.003).

Los cebadores diseñados amplifican fragmentos pequeños, entre 75 y 200 nucleótidos, ya que la PCR en tiempo real es una técnica capaz de generar fragmentos muy pequeños (desde 60 pb), lo que la hace ideal para la detección de cambios cuantitativos en la expresión génica durante el curso de alteraciones celulares patológicas o experimentales, así como para la cuantificación de niveles de ARNm en muestras de tejidos con ARN parcialmente degradado (Bustin, 2002).

A pesar de tener gran cuidado en el diseño de los cebadores y tratar de evitar contaminación en la muestra de ARN, no se obtuvieron los resultados de la PCR en tiempo real esperados, ya que siguiendo el protocolo de Bio-Rad y de Beltrán 2.009 (quien trabajó con plantas de yuca y realizó una qPCR) no hubo amplificación del ADN copia. Hubo que estandarizar el protocolo de PCR en tiempo real, variando las concentraciones de ADNc y de CaCl₂, pero igual no se pudo medir ni la cuantificación, ni la expresión de los genes. La amplificación vista en la figura 25 fue de dímeros de cebadores, por lo tanto no se obtuvieron los resultados de la expresión del gen HMG-CoA reductasa en diferentes condiciones fisiológicas.

Conclusiones

Para que la clonación de un gen sea exitosa, la ligación del ADN con el vector de clonamiento debe ser en cantidades apropiadas, para garantizar que el ADN ingrese al interior celular y se formen más colonias blancas que azules.

Se logró caracterizar molecularmente el gen HMG-CoA reductasa de yuca (*Manihot esculenta*), identificando la secuencia parcial que se tenía en el laboratorio en cuanto a los exones e intrones y regiones promotoras.

La secuencia genómica parcial del gen HMG-CoA reductasa es similar al mismo gen en otras especies, pero la secuencia peptídica del mismo no es similar con otros genes, porque origina una proteína truncada.

Recomendaciones

Para realizar el aislamiento de ADN o ARN se debe partir de material vegetal fresco, porque si las hojas están marchitas no se realiza una buena extracción.

Para realizar la PCR inversa los cebadores deben tener altas temperaturas de hibridación, para evitar fragmentos inespecíficos en la amplificación del material genético.

A pesar de que ya está la secuencia completa del genoma de yuca, se podría realizar la clonación del gen HMG-CoA reductasa del clon 76 de yuca para completar la secuencia del gen del IDEA, ya que en el alineamiento se observaron muchos SNPs.

Hay que agregar mayor cantidad de ADN cuando se va a ligar con el vector de clonamiento, para favorecer la ligación entre ambos y obtener así más colonias blancas que azules.

Antes de sembrar las placas de LB+Amp+X-gal en la transformación, se debe realizar una dilución para no obtener un césped en la siembra y calcular con diferentes volúmenes la eficiencia de transformación.

Hay que tener mucho cuidado en el aislamiento del ARN para evitar que se degrade y usar inhibidores de RNasas como el DEPC para tratar el material de vidrio y de plástico a usar.

Hay que aislar bastante ARN, así al momento de la transcripción reversa tener suficiente muestra, ya que en la qPCR, la amplificación de las muestras se realiza por triplicado y se gasta muy rápido el ADNc.

Referencias bibliográficas

1. Arismendi, L. 1.980. Prácticas culturales, almacenamiento y procesamiento del cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz.). Trabajo de Ascenso. Universidad de Oriente. Venezuela.
2. Beltrán, J., Jaimes, H., Echeverry, M., Ladino, Y., López, D., Duque, M., Chavarriaga, J. y colaboradores. 2.009. Quantitative analysis of transgenes in cassava plants using real-time PCR technology. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* **45**: 48-56.
3. Boeckman, F., Brisson, M., Tan, L. 2.003. Real-Time PCR: General Considerations. Bio-Rad Lab. Tech Notes 2593: 1-4.
4. Bustin S.A. 2.000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* **25**:169-93.
5. Cabral, G., Bautista, L., Andrade, G., Rech, E., Brasileiro, A. 1.995. Cassava transformation by *Agrobacterium tumefaciens* and particle acceleration. *CIAT.* **1**: 264-275.
6. Ceballos, H., Sánchez, T., Morante, N., Fregene, M., Dufour, D., Smith, A., Denyer, K. y colaboradores. 2.007. Discovery of an Amylose-free Starch Mutant in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *J. Agric. Food Chem.* **55**: 7.469-7.476. <http://www.ciat.cgiar.org/yuca/inicio.htm>. [Consulta 19 de febrero de 2.009].
7. Ceballos, H., Ospina, B. 2.002. La Yuca en el tercer Milenio: Sistemas Modernos de Producción, Procesamiento, Utilización y Comercialización. CIAT, primera edición, Colombia.

8. Czechowski, T., Bari, R., Stitt, M., Scheible, W., Udvardi, M. 2004. Real-time RT-PCR profiling of over 1.400 Arabidopsis transcription factors: Unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. *Plant J.* **38**: 366-379.
9. Devlin, T. 2004. Bioquímica. Editorial Reverté, S.A., cuarta edición, España.
10. Fregene, M., Angel, F., Gómez, R., Rodríguez, F., Maya, M., Bonierbale, M., Tohme M., y colaboradores. 1995. A linkage map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) based on RFLP and RAPD markers. *CIAT.* **1**: 49-61.
11. Gachon, C., Mingam, A., Charrier, B. 2004. Real-time PCR: What relevance to plant studies? *Journal of Experimental Botany.* **55**: 1.445-1.454.
12. Gibson, G., Muse, S. 2004. A Primer of Genome Science. Sinauer Associates Inc., segunda edición, E.U.A.
13. Goldstein, J., Brown, M. 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature.* **343**: 425–30.
14. Gómez-Galera, S., Pelacho, A., Gené, A., Capell, T., Christou, P. 2007. The genetic manipulation of medicinal and aromatic plants. *Plant Cell Rep.* **26**: 1.689-1.715.
15. Griffiths, A., Miller, J., Suzuki, D., Lewontin, R., Gelbart, W. 2008. Genética. McGraw-Hill Interamericana, séptima edición.
16. Grotewold, E., Chamberlin, M., Snook, M., Siame, B., Butler, L., Swenson, J., Maddock, S., y colaboradores. 1998. Engineering Secondary Metabolism in Maize Cells by Ectopic Expression of Transcription Factors. *The Plant Cell.* **10**: 721-740.
17. Gutierrez, L. 2008. Towards a Systematic Validation of References in Real Time RT-PCR. *The Plant Cell.* **20**: 1.734-1.735.
18. Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.

19. Hans-Walter, H. 2.005. Plant Biochemistry. Elsevier Academic Press, tercera edición, E.U.A.
20. Hernández, Y. 2.009. Caracterización del gen 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa) en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Tesis de Maestría. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela.
21. Katsuyoshi, K., Uritani, I., Oba, K. 2.003. Induction Mechanism of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase in Potato Tuber and Sweet Potato Root Tissues. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**: 1.007-1.017.
22. Lewin, B. 2.008. Genes IX. Jones and Bartlett Publishers, Inc., primera edición, E.U.A.
23. Liao, JK. 2.002. Isoprenoids as mediators of the biological effects of statins. *J Clin Invest.* **110**: 285-288.
24. Luque, J., Herraéz, A. 2.001. Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Editorial Elsevier, primera edición, España.
25. Madigan, M., Martinko J. 2.003. Brock biology of microorganisms. Pearson-Prentice Hall décima edición, E.U.A.
26. Malinowski, JM. 1.998. Atorvastatin: a hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor. *Am J Health Syst Pharm.* **55**: 2.253-2.267.
27. Meigs, T., Roseman, D., Simoni, R. 1.996. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase degradation by the nonsterol mevalonate metabolite farnesol in vivo. *J. Biol. Chem.* **271**: 7.916–22.
28. Melo, V., Cuamatzi, O. 2.007. Bioquímica de los procesos metabólicos. Editorial Reverté, segunda edición, México.

29. Nissen S, Tuzcu M, Schoenhagen P, Brown BG, Ganz P, Vogel RA, y colaboradores. 2004. Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis. *JAMA*. **291**: 1.071-1.080.
30. Oikawa, A., Matsuda, F., Kusano, M., Okazaki, Y., Saito, K. 2008. Rice Metabolomics. *Rice*. **1**: 63-71.
31. Oliver, D., Nikolau, B., Wurtele, E. 2009. Acetyl-CoA-Life at the metabolic nexus. *Plant Science*. **176**: 597-601.
32. Raponi, M., Dawes, I., Arndt, G. 2000. Characterization of Flanking Sequences Using Long Inverse PCR. *Bio. Techniques*. **28**: 834-844
33. Roitelman, J., Olender, E., Bar-Nun, S., Dunn, W., Simoni, R. 1992. Immunological evidence for eight spans in the membrane domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: implications for enzyme degradation in the endoplasmic reticulum. *Cell Biol*. **117**: 959-73.
34. Salah, M., Martinez, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*. **22**: 4.692-4.693.
35. Sambrook, J., Russell, D. 2001. Molecular Cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, tercera edición, E.U.A.
36. Sarria, R., Balcázar, N., Destéfano Beltrán, L., Roca, W. 1995. Progress in *Agrobacterium*-mediated transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *CIAT*. **1**: 241-244.
37. Sato, R. 2009. SREBPs: protein interaction and SREBPs. *FEBS Journal*. **276**: 622-627.
38. Scott, R., Bendich, A. 1987. Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer. *Plant Mol. Biol*. **9**: 509-520.

39. Shimano, H. 2.009. SREBPs: novel aspects of SREBPs in the regulation of lipid synthesis. *FEBS Journal*. **276**: 615.
40. Stermer, B., Bianchini, G., Korth, K. 1.994. Regulation of HMG-CoA reductasa activity in plants. *Journal of Lipid Research*. **35**: 1.133-1.140.
41. Taiz, L., Zeiger, E. 2.006. Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc., cuarta edición, E.U.A.
42. Taylor, N., Chavarriaga, P., Raemakers, K., Siritunga, D., Zhang, P. 2.004. Development and application of transgenic technologies in cassava. *Plant Mol. Biol.* **56**: 671-688.
43. Udvardi, M., Czechowski, T., Scheible, W. 2.008. Eleven Golden Rules of Quantitative RT-PCR. *The Plant Cell*. **20**: 1.736-1.737.

Consultas en línea:

1. http://www.ciat.cgiar.org/about_ciat/cropfocus.htm [Consultado 08 de abril de 2.009].
2. http://www.ciat.cgiar.org/yuca/pdf/report_2008/executive_summary08.pdf [Consultado 08 de abril de 2.009].
3. Joint Genome Institute. *Manihot esculenta* (cassava). [En línea]. [Consultado 10 de noviembre de 2.009]. <http://www.phytozome.net/cassava>.
4. Promega. Technical Manual, pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems. [En línea]. [Consultado 20 de febrero de 2.009]. <http://www.promega.com>.
5. RALLT. Manipulación genética de la Yuca. [En línea]. Sep. 02, 2.006. [Consultado 12 de noviembre de 2.008]. Disponible en: <http://www.ecoportel.net/content/view/full/62439>.