



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

Titulación de Bioquímico Farmacéutico

**“Caracterización de proteínas LEA 3
(Late Embryogenesis Abundant, familia 3) de especies de
Fabáceas”**

Trabajo de Fin de Titulación

AUTORA:

Paola Ximena Dalgo Aguilar

DIRECTORA:

Augusta Yadira Cueva Agila, Ph.D.

LOJA – ECUADOR

2012

CERTIFICACIÓN

Ph.D.

Augusta Cueva Agila

DIRECTORA DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

CERTIFICA:

Que el presente trabajo, denominado: “*Caracterización de proteínas LEA 3 (Late Embryogenesis Abundant, familia 3) de especies de Fabáceas*” realizado por el profesional en formación: Srta. Paola Ximena Dalgo Aguilar, cumple con los requisitos establecidos en las normas generales para la Graduación en la Universidad Técnica Particular de Loja, tanto en el aspecto de forma como de contenido, por lo cual me permito autorizar su presentación para fines pertinentes.

Loja, septiembre 2012

f) _____

CI:

Augusta Cueva Agila, Ph.D

DIRECTORA

CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Paola Ximena Dalgo Aguilar declaro ser autora del presente trabajo y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales”.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico, o institucional (operativo) de la Universidad”.

f) _____

Ci:

Paola Ximena Dalgo Aguilar

TESISTA

DEDICATORIA

Cada esfuerzo tenas, supone un sacrificio, pero cada sacrificio, nos hace avanzar a la meta que un día nos fijamos al comienzo de mi vida estudiantil, y justo es que superando las dificultades y todos los sin sabores que la vida otorga dedique con amor este proyecto de fin de carrera a mis queridos padres Jorge y Fanny, por enseñarme la magia del mundo, amigos que Dios y la vida me regaló.

A mis hermanos Karla y Jorge seres que más quiero en este mundo por sus acertados consejos y buenos ejemplos.

A mi pequeña sobrina Sofy por alegrarme la vida.

A todos los que creyeron en mí...

AGRADECIMIENTO

Agradezco primeramente a Dios por permitirme soñar y alcanzar mis metas.

A la Universidad Técnica Particular de Loja, de manera especial a la Escuela de Bioquímica y Farmacia por brindarnos los conocimientos teóricos y prácticos que me hicieron un buen profesional.

Al Departamento de Ciencias Naturales por poner a disposición el material necesario para el desarrollo de este proyecto.

A mi directora de tesis Ph.D. Augusta Cueva, por ser mi maestra y amiga y compartir conmigo sus sabios conocimientos.

Al Ing. José Miguel Romero por su colaboración en el presente trabajo.

A todos los docentes del Departamento de Ciencias Naturales, compañeros y pasantes por su apoyo incondicional.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CONTENIDO	PÁG.
Portada	I
Certificación	II
Contrato de Cesión de Derecho de Tesis	III
Dedicatoria	IV
Agradecimiento	V
Índice de Contenidos	VI
Índice de Figuras	VIII
Índice de Tablas	VIII
Artículo Científico	IX
1. PRESENTACIÓN DEL FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO.	1
1.1 Fin del proyecto.	1
1.2 Propósito del proyecto.	1
1.3 Componentes del proyecto.	1
2. INTRODUCCIÓN.	2
2.1 Almacenamiento de semillas forestales	2
2.1.1. Clasificación de las semillas según requerimientos para almacenaje.	2
2.2 Estrés hídrico.	3
2.3 Tolerancia a la deshidratación.	5
2.4 Embriogénesis.	6
2.5 Late Embryogenesis Abundant Proteins (LEA).	8
2.5.1 Clasificación de las proteínas LEA.	9
2.5.2 Estructura de las proteínas LEA.	10
2.5.3 Funciones fisiológicas de las proteínas LEA.	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	12
3.1. Selección de especie.	12
3.2. Extracción de ADN.	13
3.3. Diseño y estandarización de controles positivos.	13
3.3.1. Estandarización de genes de referencia.	14
3.3.2. Caracterización de actina.	14
3.4. Extracción de ARN y síntesis de cDNA.	14
3.5. Cebadores para la amplificación de proteínas LEA3.	15

3.6. Amplificación mediante PCR.	15
3.7. Electroforesis.	15
3.8. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.	16
3.8.1. Cepas bacterianas.	16
3.9. Cloning y amplificación de productos.	16
3.10. Protocolos de transformación.	16
3.10.1. Shock Térmico.	16
3.11. Extracción de ADN plasmídico.	17
3.12. Digestión enzimática.	17
3.13. Secuenciación.	17
3.14. Análisis de secuencias nucleotídicas.	18
4. RESULTADOS	19
4.1. Extracción de ADN.	19
4.2. Diseño y estandarización de controles positivos.	20
4.2.1. Estandarización de genes de referencia.	20
4.2.2. Caracterización de actina.	22
4.3. Extracción de ARN y síntesis de cDNA.	25
4.4. Cebadores para la amplificación de proteínas LEA 3.	26
5. DISCUSIÓN.	29
6. CONCLUSIONES.	32
7. ANEXOS.	33
7.1. Protocolo de extracción de ADN genómico (Wisard® de Promega).	33
7.2. Protocolo de extracción de ARN (kit Plant Rneasy Mini de Quiagen).	34
7.3. Protocolo de síntesis de cDNA (Applied Biosystem).	35
7.4. Protocolo de Cloning (kit Zero Blunt TOPO PCR Cloning de Invitrogen).	36
7.5. Protocolo de extracción de ADN plasmídico (kit GenElute™HP plasmid miniprep de Sigma Aldrich).	37

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS.	PÁG.
1. Hipótesis de señalización para la inducción de genes específicos.	5
2. Fases de la embriogénesis.	7
3. Semillas deshidratadas de la familia Fabaceae.	12
4. Vector TOPO Blunt II.	16
5. ADN de las especies <i>Senna alata</i> y <i>Senna mollisima</i> .	19
6. Productos amplificados de la especie <i>Senna alata</i> con distintos cebadores.	21
7. Productos amplificados de la especie <i>Senna mollisima</i> con distintos cebadores.	22
8. Producto de PCR de la especie <i>Caesalpinea spinosa</i> .	22
9. ADN de la especie <i>Caesalpinea spinosa</i> .	23
10. ARN de las especies <i>Caesalpinea spinosa</i> y <i>Senna mollisima</i> .	25
11. Producto de PCR- <i>Touch down</i> de la especie <i>Caesalpinea spinosa</i> .	27
12. Producto de PCR anidada de la especie <i>Caesalpinea spinosa</i> .	27

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA.	PÁG.
1. Clasificación de las proteínas LEA.	9
2. Especies de Fabáceas con diferente porcentaje de deshidratación y comportamiento de conservación.	13
3. Cebadores utilizados para la estandarización de actina en especies de Fabáceas.	20
4. Secuencia de nucleótidos a partir de los cuales se predijo la proteína actina de la especie <i>Caesalpinea spinosa</i> .	23
5. Porcentaje de aminoácidos en la proteína analizada.	24
6. Relación de la proteína actina de la especie <i>Caesalpinea spinosa</i> con proteína actina de otras especies.	25
7. Cebadores para la amplificación de las proteínas LEA, familia 3.	28
8. Similitud de la proteína codificada por las secuencias amplificadas con los cebadores seleccionados con otras proteínas caracterizadas.	29

RESUMEN

Uno de los principales problemas en el almacenamiento de semillas es que no toleran condiciones de deshidratación extrema. La acumulación de proteínas LEA (Por sus siglas en inglés, Late Embryogenesis Abundant) ha sido relacionada con la capacidad para tolerar condiciones de desecación durante el desarrollo vegetal y en la última etapa de desarrollo de la semillas, por lo que la caracterización y estudio funcional de estas proteínas es de gran importancia en la conservación de semillas a largo plazo.

En el presente estudio se realizaron varios ensayos con el fin de caracterizar una proteína LEA familia 3 en semillas con distinto porcentaje de deshidratación y diferente comportamiento de conservación, en especies de fabáceas *Senna alata*, *Senna mollissima* y *Caesalpineia spinosa*. Para la estandarización del método se secuenció un gen de *ACTINA* de la especie *Caesalpineia spinosa* con un cebador diseñado para el presente estudio: *Actin_Syzy-Fw* GCTGGATTCTGGTGATGGTG, *Actin_Syzy-Rv* TGGTTGGAACAGGACCTCTG. La caracterización del gen codificante para proteínas LEA se realizó con cebadores degenerados obtenidos de un estudio realizado por Yu. et al. 2010. Se obtuvo una proteína asociada a hidrolasa sugiriendo que las condiciones de almacenamiento como la humedad relativa y la temperatura provocaron que las semillas reasuman su actividad metabólica.

Palabras clave: Late Embryogenesis Abundant Proteins (LEA), condiciones de conservación, gen *ACTINA*, proteínas hidrolasas asociadas a la pared celular.



Characterization of LEA proteins III (Late Embryogenesis Abundant, family III) in species Fabaceae

Paola Ximena Dalgo^{a*}, Augusta Cueva A^a

^a Departamento de Ciencias Naturales

Universidad Técnica Particular de Loja/San Cayetano Alto

P.O.Box 11-01-608 Loja - Ecuador.

^{a*}pxdalgo@utpl.edu.ec

Abstract:

One of the major problems on seed's storage is the intolerance to extreme dehydration conditions. In the present study we performed several tests in order to characterize the Late Embryogenesis Abundant proteins family III, in seeds with different percentage of dehydration and conservation behavior in different species of Fabaceae: *Senna alata*, *Senna mollissima* and *Caesalpineia spinosa*. For the standardization of the method the *ACTIN* gene was sequenced of *Caesalpineia spinosa* using a primers designed for this study: *Actin_syzy-Fw* GCTGGATTCTGGTGATGGTG, *TGGTTGGAACAGGACCTCTG Actin_Syzy-Rv*. The characterized gene codify an Actin protein. We used degenerate primers obtained from a study by Yu et al. 2010 in order to characterize LEA genes, however with these primers, hydrolase protein associated to cell wall was obtained suggesting that the storage conditions such as relative humidity and temperature had caused that the seed resume their metabolic activity.

Key Words: Late Embryogenesis abundant proteins (LEA), conservation behavior, *ACTIN* gene, hydrolase protein associated to cell wall.

INTRODUCTION

The fundamental purpose of storing seeds forestry important is to have a viable genetic material available when required (Mayor et al. 2002). According to storage requirements seeds are classified in orthodox, recalcitrant and intermediate (Pammenter & Berjak. 1999). Plants grow in a dynamic environment that often imposes restrictions on their growth and development. The adverse environmental factors commonly encountered by land plants such as water deficit, soil salinity and extreme temperatures can limit growth plant and therefore productivity (Yancey et al. 1982). Water stress is the main barrier to the decline in production and plant quality (Cornejo. 2002). The genes induced under abiotic stress conditions codify proteins that have signaling functions, signal transduction and cell protection (Pence. 2005). The main genes involved in the synthesis of proteins against dehydration tolerance are those that codify the Late Embryogenesis Abundant proteins (LEA), the induction of these genes is considered to take place in the final stage of embryogenesis, during this stage the embryo becomes dormant, dehydrated to prepare the separation from the mother plant, the expression of genes and protein profiles change much and are usually associated with

the attainment of desiccation tolerance (Smalle & Vierstra. 2004).

LEA proteins were first described from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum*) and cotton (*Gossypium hirsutum*) (Cumming & Lane. 1999). A more common classification of LEA gene was then projected by deduces protein structural domains or chemical characteristics (Cumming. 1999). On the basis of amino acid sequence and conserved motifs, LEA proteins were classified into seven families, one of which is considered atypical LEA. The family LEA III proteins has a highly conserved domain of 11 amino acids (TAGAAKEKAXE), with makes different from the other families. It has been suggested to these proteins as one of the key factors in the acquisition of desiccation tolerance (Ried & Walker-Simmons. 1993).

The optimum conditions for the storage of long-term seeds are little known (Fonseca & Freire 2003). The GenBank UTPL has been doing from several years ago seeds storing of important forestry medicinal or agricultural plants of southern Ecuador, however some of these species are recalcitrant and can not be stored at low temperatures. The objective of this research is to contribute to the characterization of LEA proteins and knowledge of their role in seeds conservation, this knowledge will be useful to improve the storage conditions for viable seeds.

MATERIALS AND METHODS:

Selection of species

For this study we worked with dried seeds of the following Fabaceae species: *Senna mollisima*, *Senna alata*, and *Caesalpinea spinosa* (figure 1), species with different percentage of dehydration and conservation behavior (table 1), these species have high medicinal potential and are use for various pharmaceutical purposes, by their antibacterial, antifungal and anti-inflammatory properties. Recalcitrant behavior seeds were not used because they were not available to conduct the study.

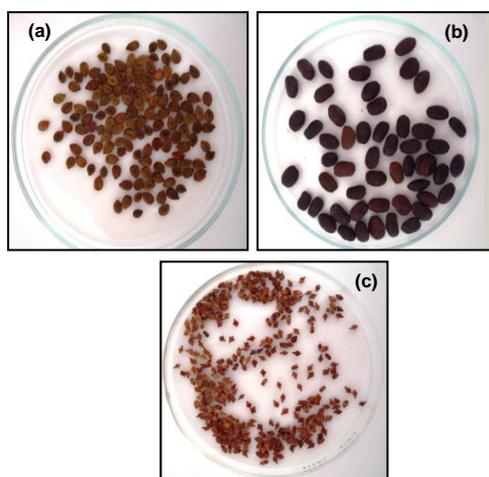


Figure 1. Dried seeds of the Fabaceae family (a) *Senna mollisima*, (b) *Caesalpinea spinosa*, (c) *Senna alata*.

Source: Author

Table 1. Fabaceae species with different percentage of dehydration and conservation behavior.

Species	Percentage of dehydration	Behavior Conservation
<i>Senna mollisima</i>	2%	Orthodox
<i>Senna alata</i>	3%	Orthodox
<i>Caesalpinea spinosa</i>	25%	Intermediate

Design and standardization of positive controls

DNA was extracted from dried seeds of the species *Senna alata* and *Senna mollisima*, 1 μ l DNA was directly used in the PCR. For standardizing positive control, searching in the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) was conducted and bibliographic information was collected by obtaining a pair of primers of actin and tubulin. Additionally we designed two actin primer pairs based on the nucleotide sequences of the species: *Syzygium malaccense* (GenBank: GU2333755.1) and *Eucalyptus camaldulensis* (GenBank: DF098129.1), species of the class Magnoliopsida, same to the species of this study.

For the standardization of reference genes we used Flexi Go-Taq polymerase, testing different annealing temperature conditions ranging

between 53°C and 60°C. In order to provide information for future studies in forest species with distribution in tropical ecosystems, *ACTIN* gene of *Caesalpinea spinosa* species was sequenced, considered a highly productive and widely distributed in South America.

Characterization of LEA protein.

To the milled seed was necessary remove the outer layer, due to the high percentage of protein and carbohydrates in tegument of the seeds not allow to obtain a good quality RNA. Of the three species *Senna alata* was excluded because RNA obtained was not optimal for the subsequent tests. For amplification of LEA III proteins, from used degenerate primers designed from Leguminosae or Fabaceae species obtained from a study by Yu et al. 2010.

The PCR reaction was performed with different polymerases: being the Phusion polymerase, one with which we obtained the best results. To amplify the gene *LEA* with an approximate weight of 600-1500 base pairs (defined in base of other proteins *LEA*), we started from a touch down PCR, the product served as a template for a second amplification nested PCR at 54°C.

Cloning

Cloning of the PCR products was performed using bacterial strains

TOP10 and *E.coli* and Zero Blunt TOPO cloning kit (Invitrogen). Later the plasmid DNA extraction was performed and the cloning method of diagnosis performed enzymatic digestion technique.

Sequencing

Some clones were sequenced by Macrogen Inc. (www.macrogen.com). Other clones were sequenced using Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer. For the nucleotide sequence cloned into the Zero Blunt TOPO vector universal primers: *M13-Fw*: 5'TGTAAAACGACGGCCAGT3' and *M13-Rv*: 5'TGCCAGGAAACAGCTATGAC3' were used. Some products directly sequenced PCR, for reference *ACTIN* gene of the *Caesalpinea spinosa* using the following primers: *Actin_Syzy-Fw*: 5'GCTGGATTCTGGTGATGGTG3' and *Actin_Syzy-Rv*: 5'TGGTTGGAACAGGACCTCTG3'.

Analysis of nucleotide sequence.

The obtained sequence analysis was performed using the VecScreen tool on the NCBI website.

Basic logistic alignment tool BLAST available at the same website: NCBI was also used. Prediction of protein and analysis of physical and chemical parameters was performed using ProtParam and Translate tools available in the ExPasy Bioinformatic.

Conserved motifs were analyzed using the tool CCD the NCBI website.

RESULTS

Design and standardization of positive controls

The DNA quality was verified through spectrophotometry (Nanodrop 2000) give the following concentrations: *Senna alata* 86 ng/μl and *Senna mollisima* 114 ng/μl. Table 2 shows the nucleotide sequence of the specific primers taken from the literature review and primers designed in this study. This table also indicates the annealing temperature (Tm) of the primers. These primers were tested at different annealing temperatures (53°C, 55°C, 56°C, 58°C and 60°C). The primers selected were *Actin_syzy* (Fw-Rv) and the appropriate temperature annealing at 58°C, amplified a band of near 500 bp.

The primer was used for amplification of the reference gene in both species *Senna alata* (figure 2) in *Senna mollisima* (figure 3). Note that this was one of the primer designed from sequences available in GenBank, this shows that the methodology is appropriate and that the genes may be similar between these species. The PCR product of the *Caesalpinea spinosa* species had the expected size for this *ACTIN* gene region because of is decided sequencing. Sequencing was performed with the specific primer previously chosen (*Actin_syzy*). We obtained a nucleotide sequence of 147 bp codify a partial protein of 49 amino acids (table 3). According ProtParam tool found on ExPasy portal this protein is considered a stable protein (Nakai & Kanehisa. 1992).

Table 2. Primers used for the standardization of species Fabaceae actin.

Primer name	Sequence	Tm°C		Reference
		Net Primer	DNAMAN	
<i>Actin_Caesalp-Fw</i>	CTGTACGCCAGTGGTCGTAC	56.2	59.2	Choi et al. 2006
<i>Actin_Caesalp-Rv</i>	TCCTGATATCAACATCGCACTTCA	62.22	68.2	Choi et al. 2006
<i>Tubul_Caesalp-Fw</i>	TGTGGGATTCCAAGAACATGATGTG	65.65	67.1	Choi et al. 2006
<i>Tubul_Caesalp-Rv</i>	TTCATACTCATCCTCCTCTGCAGTA	60.21	61.5	Choi et al. 2006
<i>Actin_Syzy-Fw</i>	GCTGGATTCTGGTGATGGTG	58.17	61.5	Autora
<i>Actin_Syzy-Rv</i>	TGGTTGGAACAGGACCTCTG	57.82	61.5	Autora
<i>Actin_Eucalyp-Fw</i>	CGGAAACATCGTCCTCAGTG	58.53	61.7	Autora
<i>Actin_Eucalyp-Rv</i>	CCTGGCAATCCACATCTG	56.57	60.2	Autora

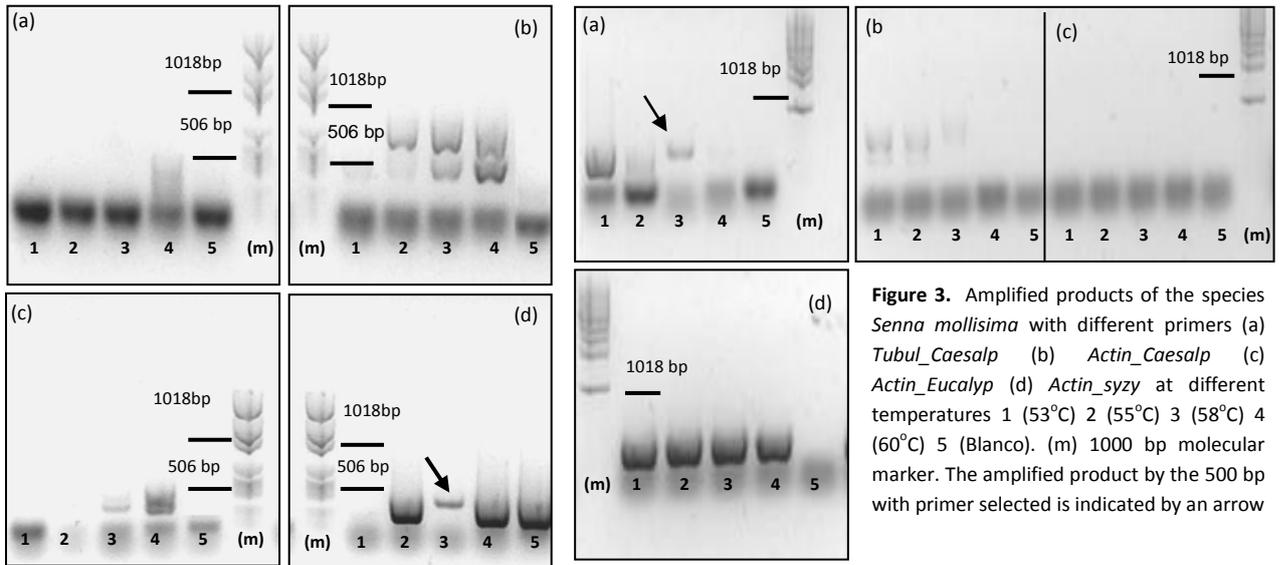


Figure 2. Amplified products of the species *Senna alata* with different primers (a) *Tubul_Caesalp* (b) *Actin_Caesalp* (c) *Actin_Eucalyp* (d) *Actin_syzy* at different temperatures 1 (53°C) 2 (55°C) 3 (58°C) 4 (60°C) 5 (Blanco). (m) 1000 bp molecular marker. The amplified product around the 500 bp with primer selected is indicated by an arrow

Figure 3. Amplified products of the species *Senna mollisima* with different primers (a) *Tubul_Caesalp* (b) *Actin_Caesalp* (c) *Actin_Eucalyp* (d) *Actin_syzy* at different temperatures 1 (53°C) 2 (55°C) 3 (58°C) 4 (60°C) 5 (Blanco). (m) 1000 bp molecular marker. The amplified product by the 500 bp with primer selected is indicated by an arrow

Table 3. Nucleotide sequence and predicted actin protein for *Caesalpinea spinosa* species.

GGA	TTC	TGG	TGA	TGG	TGT	CAG	CCA	CAC	AGT	TCC	TAT	CTA	CRA	GGG
D	S	G	D	G	V	S	H	T	V	P	I	Y	X	G
TTA	TGC	CCT	CCC	TCA	GCC	ATT	YTT	CGT	CTT	GAC	CTG	GCK	GGT	CGT
Y	A	L	P	H	A	I	X	R	L	D	X	X	G	R
GAT	CTC	ACT	GAA	TAC	TTG	ATG	AAA	ATT	TTG	ACG	GAA	CGT	GGG	TAT
D	L	T	E	Y	L	M	K	I	L	Y	S	F	T	Y
TCT	TTT	ACC	ACC											
S	F	T	T											

The analysis of the CDD (Marchler & Bryan. 2004) determined that the sequenced protein having high similarity to proteins belonging to the family of actin with a standard error of 1.34×10^{-25} that was confirmed in the Pfam program (Punta et al. 2012).

The protein belongs to actin family, Accession number (PTHTR11937). The nucleotide sequence was analyzed using. The selected protein is related to other proteins found in different species actins (table 4), with a similarity of 100% and maximum identity 90%, confirming

that the sequence obtained refers to an actin type protein.

Characterization of LEA protein

After quantification of RNA concentration was 75.2 ng/μl in *Caesalpinea spinosa* and 64.4 ng/μl in *Senna mollisima*. The primers were chosen to have the ability to amplify LEA proteins from different species families. The product-touch down PCR served as template for a nested PCR at 54°C obtaining an amplified product of 1600 bp (figure 4).

The sequences cloning from this PCR product results in 6 quality sequences. Following the analysis we found that the proteins obtained did not belong to the family of LEA III proteins, and were associated with hydrolases proteins. However it showed the similarity and percentage covering the hydrolase protein sequence was relatively low (table 5) as it was not considered appropriate for further analysis.

Table 4. Relationship of actin protein species spinosa *Caesalpinea actin* protein with other species

Species	Family	Percentage of similarity	Identities	GenBank
<i>Mimosa pudica</i>	Fabaceae	100%	90%	AB0.323621
<i>Oriza sativa</i>	Poaceae	100%	90%	ACD02024.1
<i>Phaseolus lunatus</i>	Fabaceae	100%	89%	DQ159907.1
<i>Ficus caricia</i>	Moraceae	100%	87%	AYA87315.1
<i>Caragana korshinskii</i>	Fabaceae	99%	80%	FJ485727.1
<i>Gossypium hirsutum</i>	Malvaceae	99%	92%	ABR14735.1
<i>Secale cereale</i>	Poaceae	99%	90%	ACI22695.1

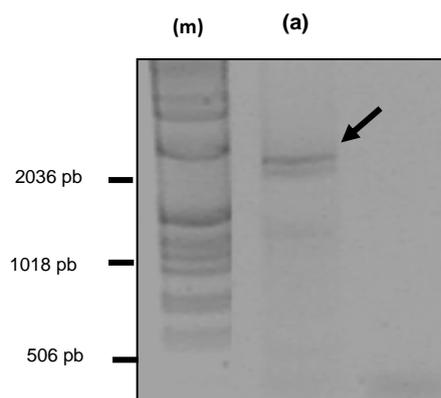


Figure 4. (a) Amplified product (1600 bp) by a nested PCR of a product obtained from a first PCR at 54°C of *Caesalpinia spinosa* species. (m) 1000 bp molecular marker.

Table 5. Similarity of protein encoded by the sequences amplified with the primers from other LEA characterized proteins.

Hydrolases proteins associated to cell wall (NCBI accession number)	Percentage of similarity	Identities
Cw-AH: XP_003604156.1	62%	88%
Cw-AH: XP_003638717.1	85%	96%
Cw-AH: XP_003604156.1	93%	96%
Cw-AH: XP_003637074.1	66%	97%
Cw-AH: XP_003638717.1	98%	97%
Cw-AH: XP_003604156.1	98%	100%

DISCUSSION

The high concentration of LEA protein family in the plant kingdom and its strong association between the abundance of these proteins and water deficit conditions denote a role of proteins in

this environment. Although circumstantial evidence have suggested the involvement of these proteins in the adaptation of higher plants to the low availability of water, no direct genetic evidence to that effect has been reported, still (Arrobo Garay et al. 2000). In this work we performed some tests in order to characterize a protein belonging to the family LEA III, this family was chosen because some works made by Jeffrey & Walker. (1993), Ried & Walker. (1993), Wise, MJ (2003), and Yu et al. (2010) suggested the arrangement of charged amino acid residues within the conserved motifs of the protein accumulate under dehydrating conditions. Taking this premise if we can characterize the LEA III protein in dehydrated seeds could study its role in desiccation tolerance. According to Dure, L. (1993) the typical structure of these proteins have a conserved domain of 11 amino acids (TAQAAKEKAGE) so the identification would be more practical agreeing to the author we believe that the wide variety of LEA III proteins caused by the number of tandem repeats and conserved domain facilitate of molecular characterization.

Since there was no literature review to the species chosen for this study (*Senna alata*, *Senna mollissima* and *Caesalpinia spinosa*) it was needed to standardize

the use of a positive control necessary for a successful conclusion. The primers selected for the identification of LEA proteins were (Actin_syzy). The results obtained were as expected; a protein related to the actin family. Huggett et al. (2005) considers that the validation of reference genes for each experimental situation is a prerequisite for the acquisition of biologically meaningful data. Dheda et al. (2004) mentioned that the most common method in the standardization of methods is the analysis of a co-expressed endogenous control (reference genes), whose relative expression should not change with the treatment or test conditions, is therefore we focus on the selection of an appropriate normalization strategy.

After analysis of the cloned sequence of LEA amplification of *Caesalpinia spinosa* desired results were not obtained, the protein obtained did not correspond to LEA, according Kikawada et al. (2006) the LEA protein expression occurs only under conditions of water stress, possibly there were many factors that influenced the success of the characterization of the LEA protein, family III. Although the primers used in this study were used to the amplification of LEA in different species, possibly they are not specific to the Fabaceae species used in this study.

Another possible factor in the success of the characterization of the proteins was the extraction of mRNA, dried seeds were used had a hard coated preventing crushing and consequently easy RNA extraction (Esau, K. 1928).

The outer layer of the seed consists of large amounts of carbohydrates and proteins that confer protection, preventing direct exposure of the embryo, carbohydrates do not allow proper cell lysis, because of it is difficult to extract.

LEA proteins have been associated with cellular dehydration tolerance, which can be induced by freezing conditions, saline, or drying (Singh et al. 2005) this is why their characterization is necessary be done in a state of water stress. Possibly the seeds used in this study were not in conditions of high water stress even though had a relatively low moisture content, the behavior of selected seed conservation, orthodox and intermediate suggests that dehydration could withstand high and prolonged storage periods, however based on our results we believe that the seeds were not subjected to extreme dehydration.

Garcia & Pita. (2000) mentioned that the viability of the seeds is a complex trait controlled by genetic factors, and environmental development. We believe that external factors influence the seed

moisture regain and resume their metabolic activity, we base our theory with the results of associated proteins such as hydrolases appointment. According to Jaima et al. (2007), Fernandez & Johnston. (2006) when the seed resume its metabolic activity is observed at first and increase in respiratory activity, with significant initial oxygen consumption by hydrolases that are present in the dry seed. As quoted by Delauche et al. (1993) during storage there are environmental factors affecting the maintenance of the quality of the seeds such as relative humidity and temperature. So we believe that the selected seeds were influenced by these external storage conditions accordingly began to emerge from its state of latency caused by extreme dehydration and decreasing moisture winning the LEA protein synthesis.

CONCLUSIONS

- As a possible role of LEA proteins tolerance to dehydration, characterization occurs only in seeds subjected to high levels of water stress, in the case of the studied species despite of their level of dehydration was high possibly, prolonged storage and external factors such as temperature and relative humidity caused the seeds resume their metabolic activity.

- When the seeds pass from a dormant state to a state of activity the synthesis of LEA proteins decreases and there is an increase in the enzymatic activity, synthesizing precursors of germination as hydrolases associated proteins that assist the initiation of the germination seed process.

ACKNOWLEDGEMENTS

I am very grateful to Ph.D. Augusta Cueva and Ing. José Miguel Romero and to Department of Natural Sciences for financial support.

REFERENCES

- Cornejo, O.E. (2002). Factores ambientales que originan el estrés. *Ecofisiología y química del estrés en plantas*. Departamento de agricultura.
- Cumming, A. (1999). LEA proteins. In: Shewry PR, Casey R (Eds) *Seed proteins*. Kluwer Academic Publishers, *Dordrecht, the Netherlands*, pp.753–780.
- Cumming, A. C. & Lane, B. G. (1999). Protein synthesis in imbibing wheat embryos. *European Journal of Biochemistry*. 99:217–224.
- Dheda, K., Huggett, J.F., Bustin, S.A., Johnson, M.A., Rook, G. & Zumla, A. (2004). Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques*. 37:112–119.
- Dure, L. (1993). Structural motifs in LEA proteins. In TJ Close, EA Bray Eds, *Plant responses to cellular dehydration during*

- environmental stress. Am. Soc. Plant Physiologists, Rockville, MD, pp. 91-103.
- Esau, K. (1982). Anatomía de las plantas con semilla. Editorial. Hemisferio Sur. Buenos Aires.p.8-19 y 423-464.
- Fernández, G. & Johnston, M. (2006). Fisiología Vegetal capítulo XX: Crecimiento y Temperatura. Chile.
- Fonseca, S. & Freire, H. (2003). Semillas recalcitrantes. *Bragantia Campinas*. 62: 297-303.
- Garay-Arroyo, A., Colmenero-Flores, J.M., Garcarrubio, A. & Covarrubias, A. (2000). Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *J Biol Chem*. 275: 5568-5674.
- García, P. & Pita, J.M. (2000). Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas. Departamento de Biología vegetal, E.U.I. Técnico agrícola. Universidad Politécnica de Madrid.
- Giorgio, Ernesto, M. (2000). Introducción a la Bioinformática: Introducción al diseño de primers. (LEA14) from *Arabidopsis thaliana Arabidopsis thaliana, a cellular stress protein*. *Protein Sci*. 14:2601-2609.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S. & Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. *Genes Immun*. 6:279-284.
- Jaima, A., Arbevez, J. & Clavijo, J. (2007). Germinación de *Ischoemum rugosum* salisb. En respuesta a estímulos ambientales y químicos. *Temas Agrarios*. 12: 31-41.
- Jeffrey R, Walker-Simmons MK. (1993). Group 3 Late Embryogenesis Abundant Proteins in Desiccation-Tolerant Seedlings of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol*. 102: 125-131.
- Kikawada, T., Nakahara, Y., Kanamori, Y., Iwata, K., Watanabe, M., McGee, B., Tunnaclyffe, A. & Okuda, T. (2006). Dehydration-induced expression of LEA proteins in an anhydrobiotic chironomid. *Biochem Biophys Res*. 34: 56-61.
- Marchler, Bauer. & Bryan, SH. (2004). CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res*. 32: 327-331.
- Mayor, P., Escudero, M. C., Catalá, M. S. & Costa, J. (2002). Conservación de Recursos Filogenéticos Agrícolas *Agrícola Vergel*.
- Nakai, E. & Kanehisa, M. (1992). A Knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics*. 14: 897-911.
- Pammenter, N.W. & Berjak, P. (1999). A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. *Seed Science Research* 9: 13-38.
- Pence, V.C., Dunfor, S.S. & Redella, S. (2005). Differential effects on abscisic acid on desiccation tolerance and carbohydrates in three species of liverworts. *Plant Physiology*, 162: 1331-1337.
- Punta, M.,Coggill, P.C., Eberhardt, R.Y., Mistry, J., Tate, J., Boursnell, C., Pang, N., Forslund, K, Geric, G., Clements, J., Heger, A., Holm, L., Sonnhammer, E.L.L., Eddy, S.R., Bateman, A. & Finn, R.D. (2012). The pfam protein families database. *Nuclein Acis Res*. 40: 290-301.
- Ried JL, Walker-Simmons MK. (1993). Group 3 late embryogenesisabundant proteins in desiccation-tolerant seedlings of wheat

- (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol.* 102: 125-131.
- Singh, S., Cornilescu, C.C., Tyler, R.C., Cornilescu, G., Tonelli, M., Lee, M.S. & Markley, J.L. (2005). Solution structure of a late embryogenesis abundant protein.
- Wise, MJ. (2003). LEA ping to conclusions: a computational reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles. *BMC Bioinformatics.* 4: 52.
- Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D. & Somero, G.N. (1982). Living with Water Stress: Evolution of Osmolyte System. *Science.* 217: 1214–1222.
- Yu, L., Wu, X. & Yan. B. (2010). Simple and efficient method for isolating cDNA fragments of *lea3* genes with potential for wide application in the grasses (*Poaceae*). *Genetic and Molecular Research.* 9: 1321-1325.

1. PRESENTACIÓN DEL FIN, PROPÓSITO Y COMPONENTES DEL PROYECTO

1.1 Fin del proyecto

Contribuir a la identificación de la familia 3 de las proteínas Late Embryogenesis Abundant (LEA) en semillas deshidratadas de especies Fabaceae.

1.2 Propósito del proyecto

Identificar mediante PCR familia 3 de las proteínas LEA, conociendo la secuencia de nucleótidos, aminoácidos, y presencia de dominios conservados, para poder predecir la posible funcionalidad de estas proteínas en la tolerancia a la desecación, en especies de distinto comportamiento de conservación

1.3 Componentes del proyecto

Tablas de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las proteínas identificadas.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Almacenamiento de Semillas Forestales.

El propósito fundamental del almacenamiento de semillas con importancia forestal, es tener a disposición material genético viable en el momento que se requiera, para la utilización con fines productivos o bien la reintroducción de especies o variedades en zonas en que se han perdido o dejado de cultivar¹.

El almacenamiento mantiene la semilla viva conservando su capacidad germinativa desde la cosecha hasta la siembra². La clave del almacenamiento consiste en el manejo del contenido de humedad; por lo que es de gran interés la distinción de semillas según sus requerimientos para almacenaje (ortodoxas, recalcitrantes, e intermedias).

2.1.1. Clasificación de las semillas según requerimientos para almacenaje:

Ortodoxas: Toleran contenido de humedad del 5-10%, temperaturas bajas, y periodos largos de almacenamiento.

Las semillas ortodoxas adquieren la capacidad de tolerar la desecación durante la última etapa de desarrollo, detectándose cambios físicos (reducción de las vacuolas, reacción del esqueleto y desdiferenciación intracelular), fisiológicos (presencia y uso eficiente de sistemas antioxidantes) y bioquímicos (acumulación de moléculas de proteínas LEAs, sacarosa y oligosacáridos) que en conjunto confieren protección a las células durante la pérdida de agua y prolongan la longevidad de las semillas³.

Recalcitrantes: No toleran contenido de humedad < 20-30%, no sobreviven en condiciones de sequedad y frío cuando son conservadas *ex situ*². La viabilidad de las semillas recalcitrantes se pierde considerablemente cuando el contenido de agua se reduce por debajo del 30%⁴, por lo tanto resulta difícil el manejo ya que existen pocos métodos para mantenerlas viables y poderlas almacenar.

¹Mayor, P., Escudero, M. C., Catalá, M. S. & Costa, J. (2002). Conservación de Recursos Filogenéticos Agrícolas *Agrícola Vergel*.

²Ramírez, G.M. (1982). Almacenamiento y conservación de granos y semillas. Editorial CECOSA. México.

³Pammenter, N.W. & Berjak, P. (1999). A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. *Seed Science Research* 9: 13-38.

⁴Greggains, V., Finch, W. & Quick, W. (2000). Putative desiccation tolerance mechanisms in orthodox and recalcitrant seeds of the genus *Acer*. *Seed Science Research* 10: 317-327.

Intermedias: La principal característica de este comportamiento es cierta sensibilidad a la desecación hasta un nivel de humedad relativamente bajo de 7 a 10% en equilibrio con una humedad relativa ambiental de 30-50%⁵.

El comportamiento de conservación de las semillas depende de la capacidad de interrelación de estos organismos con su medio⁶. Las características del medio ambiente, condiciones y recursos naturales disponibles determinan dónde los individuos podrán sobrevivir y reproducirse.

Las plantas crecen en un entorno dinámico que con frecuencia impone restricciones sobre su crecimiento y desarrollo, entre los factores ambientales adversos comúnmente encontrados por las plantas terrestres el estrés abiótico como, el déficit de agua, la salinidad del suelo y extremas temperaturas puede limitar el crecimiento de la planta y por lo tanto su productividad⁷.

2.2 Estrés hídrico.

El estrés hídrico es la principal barrera para incrementar la producción y la calidad de las plantas, en conjunto con las plagas, enfermedades y dinámica nutrimental, en la actualidad son objetivo de los sistemas de producción tecnificados⁸. Las plantas muestran ante el estrés hídrico respuestas que tienden a evitarlo o bien mecanismos o adaptaciones que permiten tolerarlo, ambas estrategias coexisten en cualquier tipo de sistemas. El estudio de las respuestas de las plantas al estrés permite conocer como éstas funcionan en sus ambientes naturales y cuáles son los patrones que determina su distribución, supervivencia y crecimiento⁹.

El estrés hídrico a nivel celular genera:

- concentración de solutos
- pérdida de turgencia

⁵Baskin, C.C. y J.M. Baskin. 2000. Ecology and evolution of specialized seed dispersal, dormancy and germination strategies. *Plant Spec. Biol.* 2, 95-96.

⁶Begon, H. & Townsend. (1998). *Ecología: Individuos, poblaciones y comunidades. Invitación a la Ecología: La Economía de la Naturaleza.* Editorial Médica Panamericana. 692 pp.

⁷Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D. & Somero, G.N. (1982). Living with Water Stress: Evolution of Osmolyte System. *Science.* 217: 1214– 1222.

⁸Cornejo, O.E. (2002). Factores ambientales que originan el estrés. *Ecofisiología y química del estrés en plantas.* Departamento de agricultura.

⁹Ackerly, D., Knight, C., Weiss, S., Barton, K. & Starmer, K. (2002). Leaf size, specific leaf area and microhabitat distribution of chaparral woody plants: contrasting patterns in species level and community level analyses. *Oecologia* 130: 449-457.

- cambios en el volumen celular
- trastorno en los gradientes de proteínas y diversos componentes fisiológicos y moleculares.

Los efectos del estrés dependen del grado y de la duración del mismo, de la etapa de desarrollo de la planta, de la capacidad genotípica de la especie y de las interacciones ambientales¹⁰.

Los genes inducidos bajo condiciones de estrés abiótico, tales como las bajas temperaturas, la salinidad y la sequía, codifican proteínas que tienen funciones de señalización, transducción de señales y protección celular¹¹. Las vías de transducción de señales que detectan el estrés juegan un papel crucial en la inducción a genes específicos¹² (Figura 1).

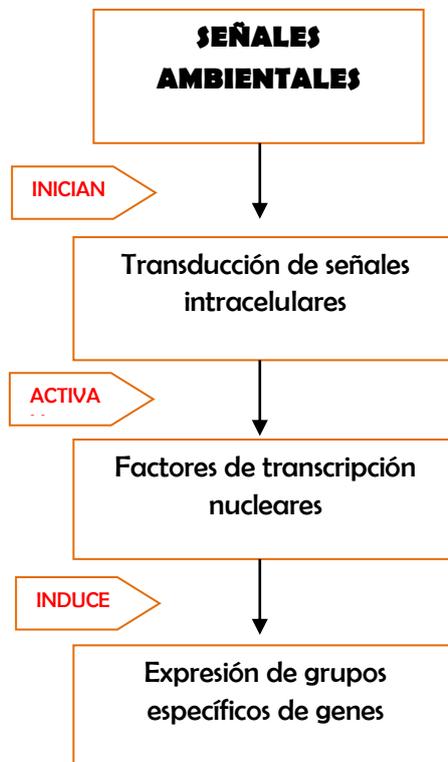


Figura 1. Hipótesis de señalización para la inducción de genes específicos

Fuente: ¹³Greggains et al. 2000

Modificado: Autora

¹⁰Madhaya, K.V., Raghavendra, A.S. & Reddy, J. (2006). Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plant. Published by Springer, pp 2-6.

¹¹Pence, V.C., Dunfor, S.S. & Redella, S. (2005). Differential effects on abscisic acid on desiccation tolerance and carbohydrates in three species of liverworts. *Plant Physiology*, 162: 1331-1337.

¹²Smalle, J. & Vierstra, R.D. (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu. Rev. Plant Biol* 55: 555-590.

La expresión de genes específicos en semillas recalcitrantes, ortodoxas y de comportamiento intermedio constituye un mecanismo de protección molecular frente al déficit hídrico, estos genes confieren la capacidad de tolerancia a la deshidratación en todas las semillas y el grado de tolerancia varía de una planta a otra, del punto mínimo al punto más elevado. Los mecanismos de tolerancia a la deshidratación empiezan con la percepción del mismo, seguido de la formación de productos de genes que están implicados en la protección celular y en la reparación¹³.

2.3 Tolerancia a la deshidratación

El agua constituye el elemento más importante para cualquier organismo vivo. La deshidratación de una célula viva tiene grandes efectos físicos y químicos sobre su estructura celular y molecular, causando cambios irreparables e inclusive en última instancia provoca la muerte celular¹⁴.

Algunos organismos pueden sobrevivir con la aridez extrema incluso con la eliminación del 99% de su agua corporal,¹⁵ debido a su capacidad de tolerancia a la deshidratación que depende de la capacidad de las células para mantener la integridad de las membranas celulares.

La tolerancia a la deshidratación está determinada por múltiples vías bioquímicas que facilitan la retención y /o adquisición de agua, que protegen las función de los cloroplastos, y mantienen la homeóstasis iónica. Las rutas esenciales incluyen aquellas que conducen a la síntesis de metabolitos osmóticamente activos y de proteínas específicas que controlan el flujo de iones y de agua¹⁶.

Se han descrito tres tipos de sistemas protectores frente a la tolerancia a la deshidratación:

- La acumulación de azúcares no reducidos que estabilizan las membranas y proteínas en condiciones de sequía¹⁷.

¹³ Greggains, V., Finch, W. & Quick, W. (2000). Putative desiccation tolerance mechanisms in orthodox and recalcitrant sees of the genus *Acer*. *Seed Science Research* 10: 317-327 .

¹⁴ Shih, M.D., Hoekstra, F. & Hsing, Y.I. (2008). Late Embryogenesis Abundant Proteins. *Advances in Botanical Research*, Vol 48. Editorial Elsevier Ltd. Taiwan.

¹⁵ Bartels, D. & Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Plant Sciences*. 24: 23-58.

¹⁶ Chinnusamy, V. & Zhu jion-Khong. (2004). Plant salt tolerance. Published by Springer pp.241-251.

¹⁷ Kermode, A. (1997). Approaches to elucidate the basis of desiccation tolerance in seeds. *Seed Sci. Res* 7: 75:95.

- La capacidad para impedir o tolerar la acumulación de radicales libres durante la desecación¹⁸.
- Las proteínas protectoras abundantes de la etapa final de la embriogénesis (LEA, por sus siglas en inglés, Late Embryogenesis Abundant) inducidas ante estrés hídrico o contenidos elevados de ácido abscísico¹⁹.

Se considera que la inducción de genes implicados en la traducción de proteínas LEA frente a la tolerancia a la deshidratación tiene lugar en la etapa final de la embriogénesis.

2.4 Embriogénesis

La embriogénesis se define como la suma de todos los procesos de crecimiento y diferenciación durante el desarrollo de un cigoto²⁰, puede dividirse en tres fases principales (Figura 2).

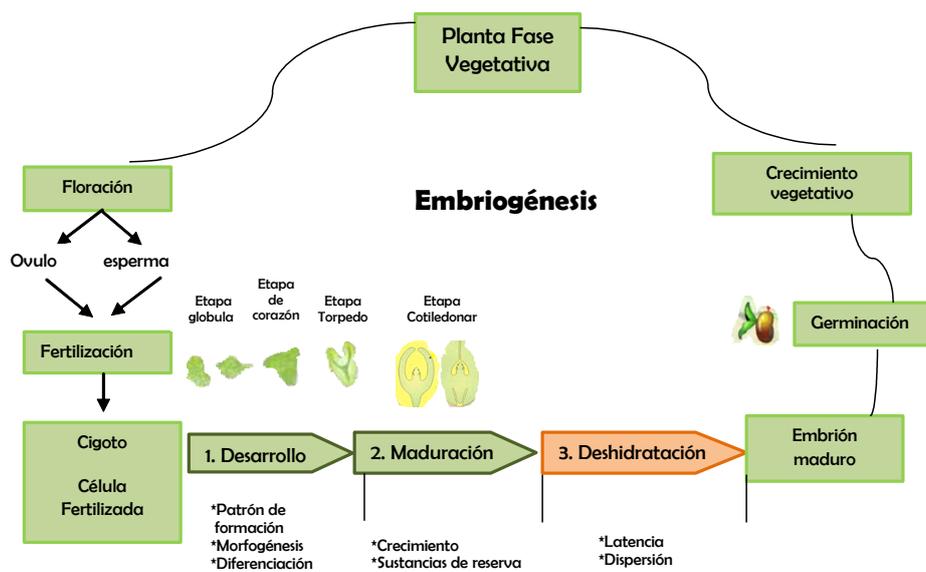


Figura 2. Fases de la embriogénesis.
Fuente: ²⁰ Vernoud et al. 2005

¹⁸Hendry, G., Finch, S., Thorpe, P., Atherton, N., Buckland, S., Nilsson, K. & Seel, D. (1995). Free radical processes and loss of seed viability during desiccation in the recalcitrant species *Quercus rubur* L. *New Phytol.* 122: 273-279.

¹⁹ Lane, B. (1991). Cellular desiccation and hydration: developmentally regulated proteins, and the maturation and germination of seed embryos. *FASEB Journal* 5: 2893-2901.

²⁰Vernoud, V., Hajduch, M., Khaled, A.S. Depége, N. & Rogowshy, P.M. (2005). Maize Embryogenesis. *Maydica* 50: 469-483.

La primera de ellas está dedicada a los eventos del desarrollo, como la formación del patrón responsable de la polaridad y la posición de órganos, morfogénesis²¹ formación del órgano embrionario y sistemas de tejidos (tejido fundamental y tejido vascular). La segunda fase o maduración se caracteriza por la detención de la morfogénesis embrionaria, la síntesis y acumulación de macromoléculas de almacenamiento, adquisición de tolerancia a la desecación, la inhibición de la germinación precoz, y el reposo metabólico que resulta de la desecación de la semilla.¹⁹

Durante la tercera fase el embrión deshidratado entra en latencia para prepararse para su separación de la planta madre durante la dispersión de la semilla, en esta etapa, la expresión de los genes y los perfiles de proteínas cambian mucho y generalmente están asociados con el logro de tolerancia a la desecación, el aumento de ácido abscísico (ABA) y el desarrollo de la capacidad de germinación de las semillas.^{22 23}

Las proteínas, lípidos, almidón y azúcares que se acumulan durante la embriogénesis sirven para proteger al embrión de desecación y proporcionan nutrientes para las plántulas jóvenes.

La detención del desarrollo y la capacidad de soportar la deshidratación permite al embrión permanecer en un estado inactivo y / o latente hasta que las semillas encuentren condiciones que promuevan la germinación²⁰. Esta capacidad de soportar la deshidratación esta posiblemente asociada a la síntesis de proteínas LEA que tiene lugar en esta etapa final de la embriogénesis.

2.5 Late Embryogenesis Abundant Proteins (LEA)

Durante los procesos de desarrollo y maduración, cuando ocurre la desecación natural, las semillas acumulan transcritos y proteínas en una concentración relativamente alta, por esta razón, las proteínas encontradas fueron denominadas “Abundantes en Embriogénesis Tardía” (LEA) y a los genes correspondiente genes *Lea*²⁴.

²¹Braybrook, S.A. & Harada, J.J. (2008) LECs go crazy in embryo development. *Plant Science* (13): 624-630.

²²Matilla, A. (2003). *Ecofisiología de la germinación de semillas*. Cap. 29 pp. 901-922.

²³Hughes, D. W. & Galau, G. A. (1991). Developmental and environmental induction of *Lea* and *LeaA* mRNAs and the post abscission program during embryo culture. *Plant Cell*. 3:605-618.

²⁴Campos, F., Cruz, F., Espinoza, A., Sánchez, M.P, Colmenera, J.M. & Smith, C. (2002). Expresión de genes codificantes para proteína abundantes en embriogénesis tardía (LEA) durante el osmocondicionamiento de semillas de maíz y frijol. *Agrociencia*. 36: 464-470.

Las proteínas LEA se describieron por primera vez a partir de embriones de trigo maduro (*Triticum aestivum*) y algodón (*Gossypium hirsutum*)²⁵. Análisis de la transcripción de todas las etapas de la embriogénesis de algodón indicaron que el ARNm apareció durante la embriogénesis tardía y se mantuvo en un nivel alto en los embriones maduros deshidratados²⁶. De igual manera algunos genes *LEA* pueden ser inducidos en embriones inmaduros disecados con tratamientos exógenos de ABA (ácido abscísico). Después de la germinación, estos ARNms y sus correspondientes proteínas redujeron rápidamente en su nivel²⁷. Posteriormente se identificaron secuencias homólogas en otras especies (zanahoria, cebada, trigo, arroz)²⁸.

2.5.1 Clasificación de las Proteínas LEA

Las proteínas LEA se clasifican de acuerdo a un patrón de expresión o considerando las características de las proteínas²⁹. La clasificación más común relaciona los dominios de las proteínas, estructural y químicamente³⁰. Sobre la base de la secuencia de aminoácidos y motivos conservados se clasifican al menos en 7 familias, una de las cuales se considera LEA atípicas.

²⁵Cumming, A. C. & Lane, B. G. (1999). Protein synthesis in imbibing wheat embryos. *European Journal of Biochemistry*. 99:217–224.

²⁶Dure, L., III. Greenway, S. C. & Galau, G. A. (1981). Developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination: Changing messenger ribo-nucleic acid populations as shown by in vitro and in vivo protein synthesis. *Biochemistry*. 20:4162–4168.

²⁷Galau, G. A. & DURE, L., III (1981). Developmental biochemistry of cotton seed embryogenesis and germination: Changing messenger ribonucleic acid populations as shown by reciprocal heterologous complementary deoxyribonucleic acid-messenger ribonucleic acid hybridization. *Biochemistry* .20: 4169–4178.

²⁸Choi, J. H., Liu, L. S., Borkird, C. & Sung, Z. R. (1987). Cloning of genes developmentally regulated during plant embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84:1906–1910.

²⁹Dure, L. (1981). Developmental Biochemistry of Cotton Seed Embryogenesis and Germination: Changing mRNA Populations as Shown in Vitro and In Vivo Pro-tein Synthesis. *Biochemistry*. 20:4162– 4168.

³⁰Cumming, A. (1999). LEA proteins. In: Shewry PR, Casey R (Eds) *Seed proteins*. Kluwer Academic Publishers, *Dordrecht, the Netherlands*, pp.753–780.

Tabla 1. Clasificación de proteínas LEA según ³¹Shin et al (2008).

FAMILIA	CARACTERÍSTICAS	ESPECIES ENCONTRADAS
LEA I	Ricas en glicina en un (20%) y aminoácidos cargados (40%). El promedio del peso molecular es de 11.5 KDa, la mayoría son proteína pequeñas y ácidas neutras.	Aisladas de trigo (Em) y su homólogo el algodón (D-19).
LEA II	Presentan 3 segmentos conservados: segmento K (EKKGIMDKIDEKLPG) cerca del extremo carboxilo terminal, segmento Y (DEYGNP) cerca del extremo amino-terminal y segmento S rico en residuos de Serina. Tienen un peso molecular de 5.3 a 66.3 KDa.	Identificadas en angiospermas, gimnospermas, helechos, briofitas, hongos, algas y cianobacterias. Las proteínas más representativas de esta familia son las Dehidrinas.
LEA III	Tienen un dominio altamente conservado de 11 aminoácidos (TAGAAKEKAXE), unidos por puentes iónicos, la variedad en el peso molecular se debe al número de secuencias repetidas.	Hasta la fecha más de 100 entradas pueden ser identificadas en bases de datos públicos.
LEA IV	Tiene un peso molecular de 12.56 KDa, no presentan dominios o motivos conservados, se las considera altamente hidrofílicas y solubles en calor.	Aislado del algodón, son denominadas proteínas LEA D-113.
LEA V	Peso molecular promedio es de 18.1 KDa, se consideran proteínas ácidas y a diferencia de las otras familias son hidrofóbicas y carecen de la función de ebullición.	
LEA VI y VII	Posteriormente se fue designando con los números consecutivos a las siguientes proteínas LEA que se iban encontrando, proteínas que no presentaban características similares a las anteriormente descritas.	Aisladas de trigo y cebada.

³¹ Shin, M.D., Hoekstra, A. & Hsing, Y. (2008). Late Embryogenesis Abundant Proteins. *Botanical Research*. Vol 48.

LEA Atípicas

Se las llama LEA debido a que se acumulan durante la germinación, sin embargo no presentan características similares con las proteínas LEA, su función posiblemente está relacionada como proteínas transportadoras o constituyentes de la membrana plasmática.

2.5.2 Estructura de las proteínas LEA

Debido a la importancia de las proteínas LEA en la tolerancia a la desecación, muchos estudios han sido realizados para determinar la estructura de estas proteínas. La estructura secundaria de las proteínas LEA ha sido caracterizada por distintas técnicas como diroísmo circular (CD), espectroscopia por resonancia magnética nuclear (RMN) o espectroscopia con rayos infrarrojos (IR).³² La determinación de la estructura constituye una pieza clave en los estudios funcionales de las proteínas.

2.5.3 Funciones fisiológicas de las proteínas LEA

Teniendo en cuenta la abundancia de proteínas LEA en este periodo de deshidratación se ha sugerido a estas proteínas como uno de los factores clave en la adquisición de tolerancia a la desecación.

Estudios realizados con plántulas de soya demostraron que el aumento del nivel de proteínas LEA podría reducir la salida de electrolitos en la deshidratación y posterior rehidratación³³.

En plantas de trigo jóvenes varias proteínas LEA III se acumularon en los brotes y tejidos en un estado de deshidratación severa (pérdida de agua alrededor del 90%) después de la rehidratación se reanudó el crecimiento en brotes y tejidos, así la acumulación de las proteínas LEA III en una deshidratación grave en plántulas está asociada con la tolerancia de los tejidos deshidratados³⁴. El aumento de las proteínas LEA o la adición de

³²Gilles, G. J., Hines, K. M., Manfre, A. J. & Marcotte, W. R., Jr. (2007). A predicted N-terminal helical domain of a Group 1 LEA protein is required for protection of enzyme activity from drying. *Plant Physiology and Biochemistry*. 45: 389–399.

³³Blackman, S. A., Obendorf, R. L. & Leopold, A. C. (1995). Desiccation tolerance in developing soybean seeds: The role of stress proteins. *Physiologia Plantarum*. 93:630–638.

³⁴Ried, J. L. & Walker-Simmons, M. K. (1993). Group 3 late embryogenesis abundant proteins in desiccation-tolerant seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology*. 102: 125–131.

proteínas LEA pueden aumentar la adaptabilidad de las plantas en ambientes extremos³⁵. En las plantas anhidrobióticas tales como plantas de resurrección, musgos y algas verdes, muchas proteínas LEA aparecieron durante la sequía o incluso durante un estado de anhidrobiosis³⁶ sugiriendo así la presencia de éstas proteínas en un estado en donde las células buscan la sobrevivencia frente a la desecación.

Como ya se ha mencionada las condiciones óptimas para el almacenamiento de las semillas a largo plazo son poco conocidas³⁷. En el banco de germoplasma de la UTPL, se realiza desde hace años el almacenamiento de especies con importancia forestal, medicinal o agrícola de la región sur del Ecuador, sin embargo algunas de estas especies son recalcitrantes y no pueden ser almacenadas a bajas temperaturas.

El objetivo de la presente investigación es contribuir a la caracterización de proteínas LEA y al conocimiento de su función en la conservación de semillas, este conocimiento será útil para mejorar las condiciones de almacenamiento viable de semillas.

³⁵Danyluk, J., Perron, A., Houde, M., Limin, A., Fowler, B., Benhamou, N. & Sarhan, F. (1998). Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *Plant Cell*. 10: 623–638.

³⁶Bewley, J. D., Reynolds, T. L. & Oliver, M. J. (1993). Evolving strategies in the adaptation to desiccation. In "Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress" (T. J. Close and E. A. Bray, eds.), pp. 193–201. American Society of Plant Physiologists Series, USA.

³⁷Fonseca, S. & Freire, H. (2003). Semillas recalcitrantes. *Bragantia Campinas*. 62: 297-303.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Selección de especies

Para el presente estudio se seleccionaron tres especies del Banco de Germoplasma– Departamento de Ciencias Naturales de la Universidad Técnica Particular de Loja pertenecientes a la familia *Fabaceae*, especies con un alto potencial medicinal utilizadas con diversos fines farmacéuticos, por sus propiedades antibacterianas, antifúngicas y antiinflamatorias.

Se trabajó con semillas deshidratadas de las siguientes especies: *Senna mollisima* (Humb. & Bonpl. ex Willd), *Senna alata* (L.Rox) y *Caesalpinea spinosa* (Molina). (Figura. 3), especies con distinto porcentaje de deshidratación y comportamiento de conservación³⁸ (Tabla. 2).

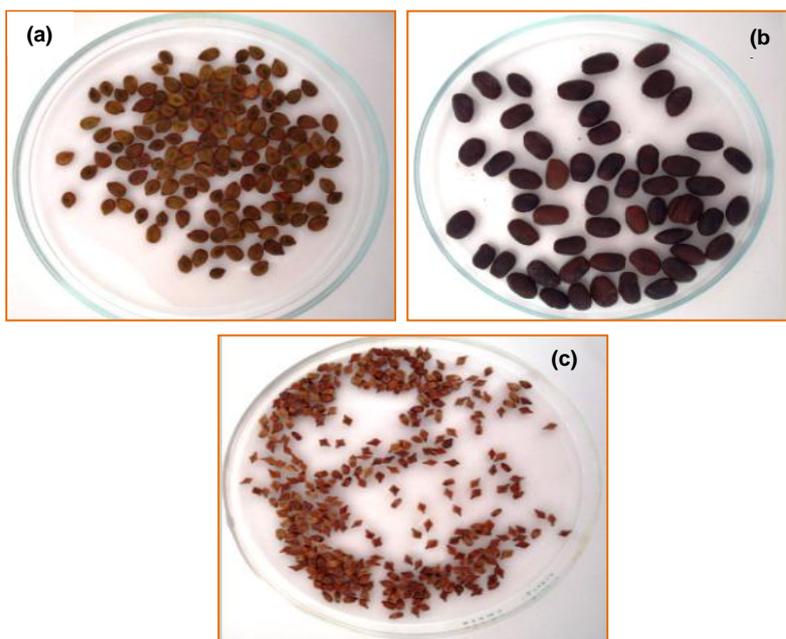


Figura 3. Semillas deshidratadas de la familia Fabaceae (a) *Senna mollisima* (b) *Caesalpinea spinosa* (c) *Senna alata*.

Fuente: Autora

³⁸Magnitsking, S. & Plaza, Guido. (2007). Physiology of recalcitrant seeds of tropical trees. *Agronomía Colombiana*. 25: 96-103.

Tabla 2. Especies de Fabáceas con diferente porcentaje de deshidratación y comportamiento de conservación

Especie	Porcentaje de Deshidratación	Comportamiento de Conservación
<i>Senna mollisima</i>	2%	Ortodoxo
<i>Senna alata</i>	3%	Ortodoxo
<i>Caesalpineia spinosa</i>	25%	Intermedio

Se trató de utilizar especies con distinto porcentaje de deshidratación considerando la probabilidad de que a mayor porcentaje de deshidratación las semillas presenten mayor cantidad de proteínas LEA. Las especies del presente estudio tienen un comportamiento de conservación ortodoxo e intermedio, no se utilizaron semillas con comportamiento recalcitrante debido a que no estaban disponibles para realizar el estudio.

3.2 Extracción de ADN

El ADN fue extraído de las semillas deshidratadas de las especies *Senna mollisima* y *Senna alata* usando el Sistema de Purificación de ADN genómico Wisard® (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante (Anexo 1), 1 µl de ADN fue directamente usado en la PCR para la estandarización de controles positivos.

3.3 Diseño y estandarización de controles positivos

Para el diseño de cebadores de amplificación de genes de referencia, muy importantes en la validación de métodos a nivel molecular, se realizó una búsqueda en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) que constituye una biblioteca mundial para la obtención de secuencias de ADN en especies Fabáceas y se recopiló información bibliográfica obteniendo un par de cebadores de actina y un par de tubulina que han sido utilizados como controles positivos en especies Fabáceas.

Adicionalmente se diseñaron dos pares de cebadores de actina en base a las secuencias nucleotídicas de las especies: *Syzygium malaccense* (GenBank: GU2333755.1) y *Eucalyptus camaldulensis* (GenBank: DF098129.1), especies de la clase Magnoliopsida, igual que las especies de este estudio.

La temperatura adecuada para el anillamiento de los cebadores se determinó en los programas NetPrimer³⁹ y DNAMAN⁴⁰ para lograr que los cebadores se unan al ADN monocatenario (ADN de una sola hebra).

3.3.1 Estandarización de genes de referencia

Para la estandarización de genes de referencia se utilizó la Go-Taq polimerasa Flexi, probando distintas condiciones de temperatura de anillamiento que oscilaban entre 53°C y 60°C.

3.3.2 Caracterización de actina

Con el fin de aportar información para futuros estudios realizados en especies forestales con distribución en ecosistemas tropicales se secuenció el gen de actina de la especie *Caesalpinia spinosa*, considerada una especie altamente productiva y de amplia distribución en Sudamérica.

3.4 Extracción de ARN y síntesis de cDNA

En la extracción del ARN se utilizaron diversas estrategias. Para el molido de las semillas fue necesario quitarles la testa, debido a que el alto porcentaje de proteínas y carbohidratos de la misma no permitía obtener un ARN de buena calidad. De las tres especies se excluyó *Senna alata* ya que el ARN que se obtuvo no era óptimo para los ensayos posteriores.

El ARN total fue extraído de las semillas usando el kit Planta RNeasy Mini (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Anexo 2). Se llevó a cabo una digestión del ADN con la enzima DNase I en la columna antes de la elución con un volumen final de 40 µl, garantizando así la extracción únicamente de ARN de las semillas, eliminando la totalidad de ADN. Posteriormente las muestras fueron analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. El cDNA se sintetizó utilizando 9 µl del ARN total usando el protocolo para síntesis de cDNA de Applied Biosystem (Anexo 3).

³⁹<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html>

⁴⁰www.codoncode.com/aligner

3.5. Cebadores para la amplificación de las proteínas LEA3

Para la amplificación de las proteínas LEA, familia 3 se utilizaron cebadores degenerados diseñados para especies de Leguminosas o Fabáceas obtenidos de un estudio realizado por Yu, L. et al (2010).

3.6 Amplificación mediante PCR

Los productos de la PCR fueron amplificados usando el termociclador para PCR (Applied Biosystem), la reacción de la PCR se realizó con distintas polimerasas: Go-TAQ Flexi polimerasa, Long Templated polimerasa, Platinum Pfx polimerasa y Phusion polimerasa, siendo la Phusion la enzima con la que se obtuvo mejores resultados.

Se probaron distintas condiciones para la amplificación del producto deseado variando los programas de corrida en el termociclador con distintas temperaturas. Para amplificar el gen *LEA*, que tendría un peso aproximado de 600-1500 pares de bases (definido en base a otras proteínas LEA). Se probó con modificaciones de PCR como *touch down* y *touch up*, variantes de la PCR que permiten la amplificación más eficiente al final de la reacción, eliminando amplificaciones inespecíficas al variar la temperatura de anillamiento.

Partimos de una PCR *touch down* cuyo producto sirvió como molde para una segunda amplificación, una PCR anidada a 54°C con la finalidad de brindar alta sensibilidad y especificidad al producto amplificado y obtener como resultado un solo producto.

3.7 Electroforesis

Para el análisis de los productos de la PCR se probó con distintos porcentajes de agarosa siendo el más óptimo a una concentración del 2% de agarosa, se utilizó un marcador molecular 1000 pares de bases (Invitrogen).

3.8 Cepas bacterianas y condiciones del cultivo

3.8.1 Cepas Bacterianas

El Cloning de los productos de PCR se realizó usando cepas bacterianas de *E.coli* TOP10.

Las células de *E.coli* transformadas se cultivaron a 37°C toda la noche en medio sólido LB (Bacto-Agar) con kanamicina en cantidad 100mg/μl.

3.9 Cloning y amplificación de productos

El Cloning se lo realizó utilizando el vector Zero Blunt TOPO PCR (Figura 4) y el kit de Cloning (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante (Anexo 4).

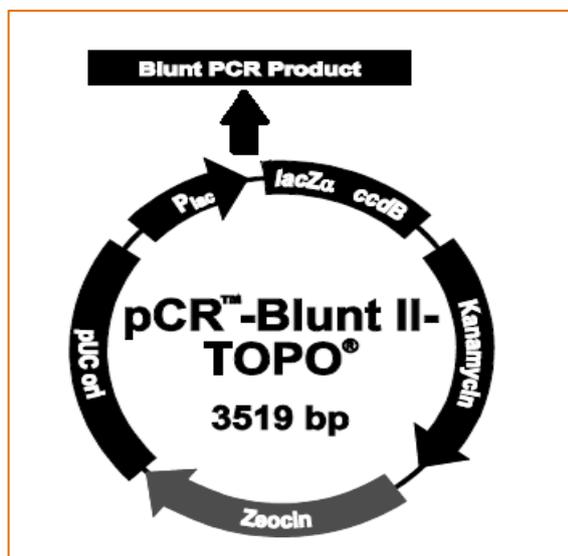


Figura 4. Vector TOPO- Blunt II
Fuente: Invitrogen

3.10 Protocolos de transformación

3.10.1 Shock-Térmico

A la mix del clonaje se le añadió 16.5 µl de células competentes de *E.coli* y se incubó en hielo por 10 minutos, posteriormente se las sometió a shock térmico a 42°C durante 60 segundos, finalmente se las incubó en hielo durante 5 minutos adicionales. Inmediatamente se le agregó 1 ml de medio LB a la suspensión bacteriana y se incubó por 1 hora a 37°C en agitación. Luego de la incubación las células fueron esparcidas en cajas con agar LB sólido y kanamicina 100mg/µl. Transcurridas las 12 horas de crecimiento bacteriano se tomó una colonia y se la inoculó en medio LB líquido con antibiótico dejando en agitación durante 12 horas para la posterior extracción de ADN plasmídico.

3.11 Extracción de ADN plasmídico

El ADN plasmídico recombinante se aisló por un método rápido y sencillo, que consistía en lisis bacteriana, la precipitación de proteínas y ADN genómico y finalmente la precipitación del ADN plasmídico.

Se utilizó el kit de extracción de ADN plasmídico GenELute™ HP Plasmid Miniprep (Sigma-Aldrich) siguiendo el protocolo del fabricante (Anexo 5).

3.12 Digestión enzimática

Como método de diagnóstico del clonaje se utilizó la técnica de digestión enzimática. Para detectar las secuencias específicas de ADN provocamos corte en la cadena utilizando 1µl de la enzima de restricción EcoR1, 1µl del Buffer, 3µl de H₂O destilada-desionizada estéril y 5µl de ADN plasmídico, obteniendo un volumen final de 10µl que se incubó a 37°C durante 3 horas.

Posteriormente para la observación del producto se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %.

3.13 Secuenciación

Algunos clones fueron secuenciados por MacroGen Inc. (www.macrogen.com). Otros clones fueron secuenciados utilizando 3500 Genetic Analyzer Applied Biosystem y la reacción de secuenciación se desarrolló bajo las siguientes condiciones:

Big dye® Terminador del ciclo de la secuenciación	1µl
Cebador de Secuenciación 5µM	1µl
ADN Plasmídico 10ng/µl	1µl
5x Buffer	2µl
Agua Destilada-Desionizada estéril	10µl

Para la reacción de secuenciación se utilizó un termociclador y las siguientes condiciones: desnaturalización de 96°C durante 1 minuto, 50 ciclos (considerando que trabajamos con fragmentos largos de amplificación) de 96°C por 10 segundos, la temperatura apropiada de anillado 60°C por 4 minutos.

Después de la amplificación para obtener mejores resultados se retiró por completo los colorantes antes de la electroforesis. El exceso de colorantes en la reacción de secuenciación puede interferir con los datos en la primera fase de secuenciación. La purificación fue realizada usando el kit BigDye XTerminator™: 20µl de muestra de solución SAM y 5µl del ADN amplificado posteriormente, se aplica vortex por 30 minutos. La muestra se centrifuga por 2 minutos y 10µl del sobrenadante se usa para correr la secuencia de análisis.

Para la secuencia de nucleótidos clonados dentro del vector Zero Blunt TOPO usamos los cebadores universales:

M13-Fw: 5'TGTAACGACGGCCAGT3'
M13-Rv: 5'TGCCAGGAAACAGCTATGAC3'

Algunos productos fueron secuenciados directamente de PCR por lo que se usaron cebadores específicos. Para la secuenciación del gen de referencia de actina de *Caesalpinia spinosa* se utilizó los siguientes cebadores:

Actin_Syzy-Fw: 5'GCTGGATTCTGGTGATGGTG3'
Actin_Syzy-Rv: 5'TGGTTGGAACAGGACCTCTG3'

3.14 Análisis de secuencia de nucleótidos

- El análisis de las secuencias obtenidas se realizó usando la herramienta VecScreen del sitio web NCBI, este análisis inicial fue importante porque nos permitió identificar rápidamente las secuencias de interés eliminando las secuencias contaminadas por vector.

- La herramienta Basic logistic alignmnt de *BLAST* disponible en el mismo sitio web: NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), nos permitió comparar nuestra secuencia con una gran cantidad de secuencias que se encuentran en una base de datos.
- La Predicción de la proteína y el análisis de los parámetros físicos y químicos se realizó usando las herramientas *Translate* y *ProtParam*, disponibles en el porta ExPASy Bioinformatic (<http://www.expasy.ch/>).
- Los motivos conservados se analizaron usando la herramienta CCD ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/edd\(ccd.shtml](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/edd(ccd.shtml)) del sitio web NCBI y la herramienta InterProScan, análisis importantes para obtener información explícita de los límites del dominio proporcionando una visión de la secuencia y su relación estructura-función.

4. RESULTADOS

4.1 Extracción de ADN

En estudios moleculares es necesario verificar la calidad del ADN para garantizar que los resultados obtenidos no tengan un factor alineado. La calidad de ADN se puede medir mediante electroforesis o cuantificación en el Nanodrop. Se verificó la calidad del ADN a través de espectrofotometría (Nanodrop 2000) obteniéndose las siguientes concentraciones: *Senna alata* 86 ng / μ l y *Senna mollisima* 114 ng / μ l, además se verificó mediante electroforesis (Figura 5).

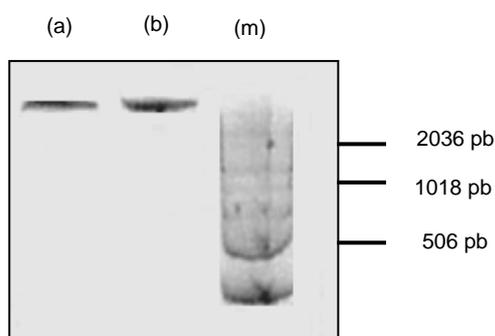


Fig.5. Bandas de ADN de las especies (a) *Senna alata* (b) *Senna mollisima* observadas en gel de agarosa al 1%. (m) marcador 1000 pb.

4.2 Diseño y estandarización de controles positivos

En la tabla 3 se indica la secuencia nucleotídicas de los cebadores específicos tomados de revisión bibliográfica y de los cebadores diseñados en este trabajo.

El diseño de los cebadores se lo realizó en el programa Vector NTI basándonos en las secuencias nucleotídicas de las especies *Syzygium malaccense* y *Eucalyptus camaldulensis*, secuencias que sirvieron como molde para el diseño de cebadores aplicados a nuestras especies de Fabaceas.

Como se especifica en la tabla 3 para la predicción exacta de temperatura de anillamiento (Tm) se utilizó los programas NetPrimer y DNAMAN, minimizando así la formación de dímeros y asegurando la disponibilidad de los cebadores a las futuras reacciones. Para la selección de los cebadores se consideró el hecho de que la temperatura de fusión entre el par de cebadores (Fw-Rv) no sea mayor a 5°C.

RESULTADOS

Tabla 3. Cebadores utilizados para la estandarización de Actina en especies de Fabáceas.

Nombre del Cebador	Secuencia	Tm°C		Referencia
		Net Primer	DNAMAN	
<i>Actin_Caesalp-Fw</i>	CTGTACGCCAGTGGTCGTAC	56.2	59.2	Choi et al. 2006
<i>Actin_Caesalp-Rv</i>	TCCTGATATCAACATCGCACTTCA	62.22	68.2	Choi et al. 2006
<i>Tubul_Caesalp-Fw</i>	TGTGGGATTCCAAGAACATGATGTG	65.65	67.1	Choi et al. 2006
<i>Tubul_Caesalp-Rv</i>	TTCATACTCATCCTCCTCTGCAGTA	60.21	61.5	Choi et al. 2006
<i>Actin_Syzy-Fw</i>	GCTGGATTCTGGTGTGGTG	58.17	61.5	Autora
<i>Actin_Syzy-Rv</i>	TGGTTGGAACAGGACCTCTG	57.82	61.5	Autora
<i>Actin_Eucalyp-Fw</i>	CGGAAACATCGTCCTCAGTG	58.53	61.7	Autora
<i>Actin_Eucalyp-Rv</i>	CCTTGGAATCCACATCTG	56.57	60.2	Autora

4.2.1 Estandarización de genes de referencia

Tanto a los cebadores diseñados como a los obtenidos por revisión bibliográfica se los sometió a diversas condiciones de temperatura de anillamiento (53°C; 55 °C, 56 °C y 58°C), la corrida de la PCR se realizó con una temperatura de desnaturalización de 95 °C por 5 min., 34 ciclos de 95 °C por 30s., extensión 72 °C por 1min.30s., y una extensión final de 72 °C durante 10 min.

Los cebadores seleccionados fueron **Actin_Syzy (Fw y Rv)** y la temperatura adecuada de anillamiento a **58°C** (tabla 3), con estos cebadores se amplificó un producto de aproximadamente 500 pares de bases y el cebador sirvió para la amplificación del gen de referencia tanto en *Senna alata* (Fig. 6) como en *Senna mollisima* (Fig. 7). Cabe mencionar que este cebador fue uno de los diseñados a partir de las secuencias disponibles en el GenBank, esto demuestra que la metodología utilizada es adecuada y que los genes pueden ser similares entre estas especies.

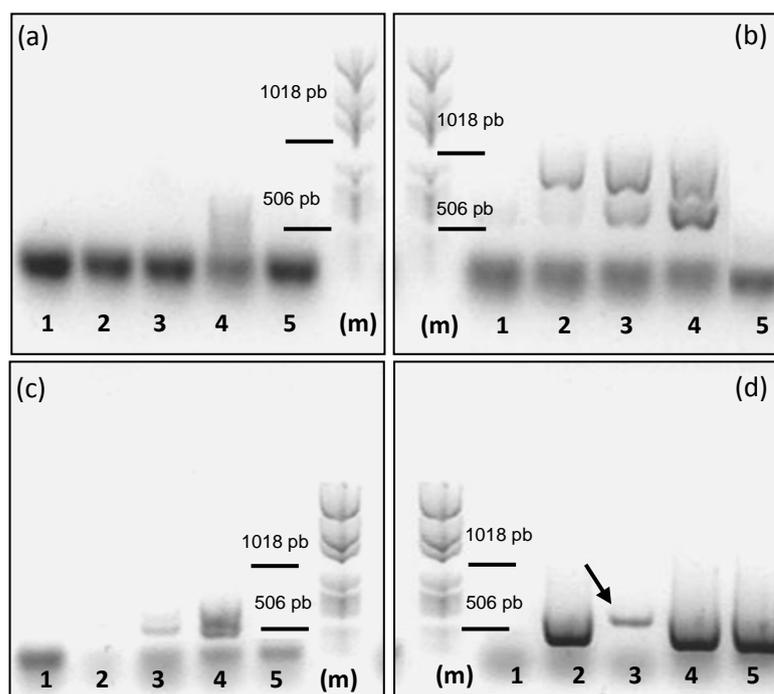


Fig. 6. Productos amplificados de la especie *Senna alata* con distintos cebadores (a) *Tubul_Caesalp* (b) *Actin_Caesalp* (c) *Actin_Eucalyp* (d) *Actin_Syzy* a diferentes temperaturas 1 (53°C) 2 (55 °C) 3 (58 °C) 4 (60 °C) 5 (Blanco). (m) marcador molecular 1000 pb. El producto amplificado por el cebador seleccionado ~500 pb se indica con una flecha.

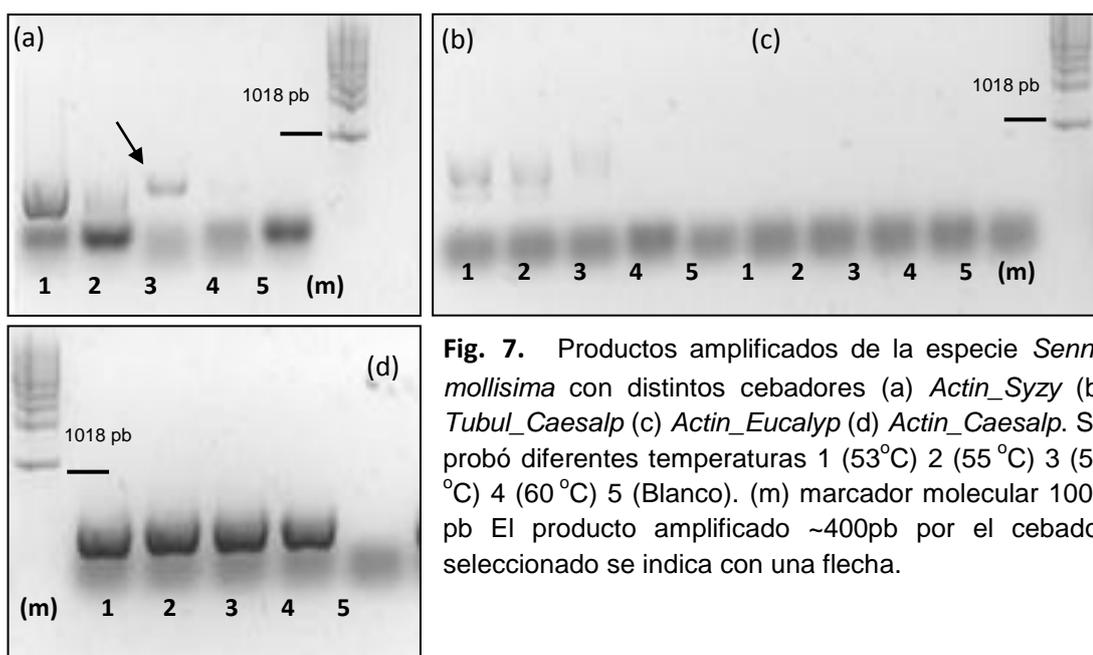


Fig. 7. Productos amplificados de la especie *Senna mollissima* con distintos cebadores (a) *Actin_Syzy* (b) *Tubul_Caesalp* (c) *Actin_Eucalyp* (d) *Actin_Caesalp*. Se probó diferentes temperaturas 1 (53°C) 2 (55 °C) 3 (58 °C) 4 (60 °C) 5 (Blanco). (m) marcador molecular 1000 pb El producto amplificado ~400pb por el cebador seleccionado se indica con una flecha.

4.2.2 Caracterización de actina

El producto de PCR (Fig. 8) que se obtuvo a partir de ADN (Fig.9) de la especie *Caesalpinea spinosa* presentaba el tamaño previsto para esta región del gen *ACTINA* por lo que se decidió secuenciar. La secuenciación se la realizó con el cebador específico previamente escogido (Actin_Syzy).

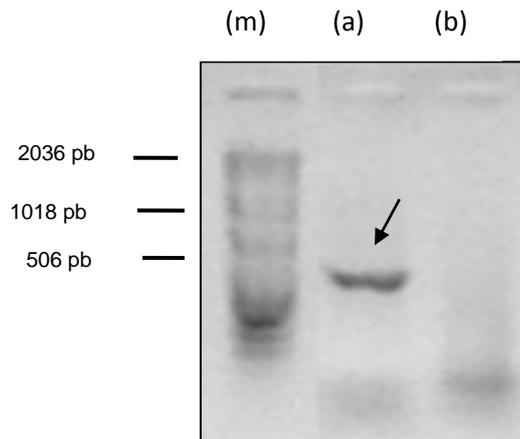


Fig. 8. (a) Producto de PCR de la especie *Caesalpinea spinosa*, el producto amplificado se indica con una flecha. (b) Blanco. (m) marcador molecular de 1000 pb.

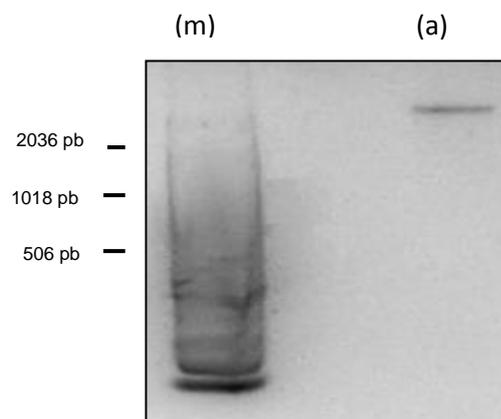


Fig. 9. (a) ADN de la especie *Caesalpinea spinosa*. La banda se observó en gel de agarosa al 1%. (m) marcador molecular 1000 pb.

RESULTADOS

Se obtuvo una secuencia de nucleótidos de 147 pares de bases que codifican una proteína parcial de 49 aminoácidos. La secuencia de nucleótidos fue analizada con la herramienta *Translate* del portal *ExPASy* se obtuvo la secuencia de aminoácidos (tabla 4) que se analizó en el *ProtParam* para obtener el porcentaje de aminoácidos presentes en la proteína como se especifica en la tabla 5.

Tabla 4. Secuencia de nucleótidos a partir de los cuales se predijo la proteína actina de la especie *Caesalpinia spinosa*.

GGA	TTC	TGG	TGA	TGG	TGT	CAG	CCA	CAC	AGT	TCC	TAT	CTA	CRA	GGG
D	S	G	D	G	V	S	H	T	V	P	I	Y	X	G
TTA	TGC	CCT	CCC	TCA	GCC	ATT	YTT	CGT	CTT	GAC	CTG	GCK	GGT	CGT
Y	A	L	P	H	A	I	X	R	L	D	X	X	G	R
GAT	CTC	ACT	GAA	TAC	TTG	ATG	AAA	ATT	TTG	ACG	GAA	CGT	GGG	TAT
D	L	T	E	Y	L	M	K	I	L	Y	S	F	T	Y
TCT	TTT	ACC	ACC											
S	F	T	T											

Tabla 5. Porcentaje de aminoácidos en la proteína analizada.

Aminoácido	Cantidad en %	Aminoácido	Cantidad en %
Leu(L)	10.2%	Ala(A)	4.1%
Lys(K)	2.0%	Arg(R)	6.1 %
Met(M)	2.0%	Asn(N)	0.0 %
Phe(F)	2.0%	Asp(D)	8.2 %
Pro(P)	4.1%	Cys(C)	0.0%
Ser(S)	6.1%	Gln(Q)	0.0%
Thr(T)	10.2%	Glu(E)	4.1%
Tyr(Y)	8.2%	Gly(G)	10.2%
Val(V)	4.1%	His(H)	4.1%
Pyl(O)	0.0%	Ile(I)	6.1%

RESULTADOS

La proteína no contiene ningún residuo de Triptófano y según los análisis del *ProtParam* herramienta del portal *ExPASy* se puede considerar una proteína estable⁴¹.

Mediante el análisis de los dominios conservados (CDD)⁴² se determinó que la proteína secuenciada tiene una alta similitud con proteínas pertenecientes a la superfamilia de Actina con un error estándar de $1.34e^{-25}$, dato que se corroboró en el programa PFam⁴³: Familia actina (PTHTR11937) e InterProScan⁴⁴ Clan (CL0108). La secuencia amplificada codifica una proteína que está relacionada con otras proteínas actinas encontradas en distintas especies (Tabla.6), con una similaridad del 100% y máxima identidad del 90%, confirmando que la secuencia obtenida hace referencia a una proteína tipo Actina.

Tabla 6. Relación de la proteína actina de la especie *Caesalpinea spinosa* con la proteína actina de otras especies

Espece	Familia	Similaridad	Error estándar	Máxima Identidad	GenBank
<i>Mimosa pudica</i>	Fabaceae	100%	7e-48	90%	AB0.323621
<i>Oriza sativa</i>	Poaceae	100%	1e-23	90%	ACD02024.1
<i>Phaseolus lunatus</i>	Fabaceae	100%	3e-46	89%	DQ159907.1
<i>Ficus caricia</i>	Moraceae	100%	3e-41	87%	AYA87315.1
<i>Caragana korshinskii</i>	Fabaceae	99%	2e-23	80%	FJ485727.1
<i>Gossypium hirsutum</i>	Malvaceae	99%	2e-23	92%	ABR14735.1
<i>Secale cereale</i>	Poaceae	99%	1e-23	90%	ACI22695.1

⁴¹Nakai, E. & Kanehisa, M. (1992). A Knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells. *Genomics*. 14: 897-911.

⁴²Marchler, Bauer. & Bryan, SH. (2004). CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res.* 32: 327-331.

⁴³Punta, M., Cogill, P.C., Eberhardt, R.Y., Mistry, J., Tate, J., Boursnell, C., Pang, N., Forslund, K, Geric, G., Clements, J., Heger, A., Holm, L., Sonnhammer, E.L.L., Eddy, S.R., Bateman, A. & Finn, R.D. (2012). The pfam protein families database. *Nuclein Acis Res.* 40: 290-301.

⁴⁴ <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>

4.3 Extracción de ARN y síntesis de cDNA

En la figura 10 se indica las bandas de ARN de las dos especies de Fabáceas, su cuantificación se la realizó en el Nanodrop 2000 obteniendo una concentración de ARN 75.2 ng/μl en *Caesalpinea spinosa* y 64.4 ng/μl en *Senna mollisima*.

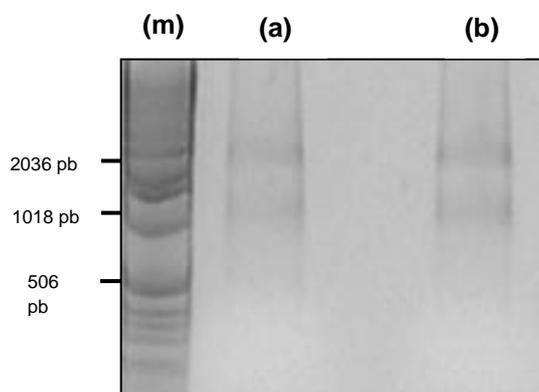


Fig. 10. Amplificación de las bandas de ARN de las especies (a) *Caesalpinea spinosa* (b) *Senna mollisima* observadas en gel de agarosa al 2%. (m) marcador 1000 pb.

4.4 Cebadores para la amplificación de proteínas LEA 3

En la tabla 7 se indica la bibliografía revisada que relaciona a las proteínas LEA 3 con una función de tolerancia a la deshidratación y su capacidad de expresión frente al estrés hídrico, los cebadores fueron escogidos por tener la capacidad de amplificar proteínas LEA en especies de diferentes familias.

En vista de que los productos inicialmente amplificados eran pequeñas se vio la necesidad de realizar una *PCR-touch down* con la Taq Phusion polimerasa, las condiciones de la PCR se desarrollaron con una desnaturalización inicial de 95 °C por 5 min; la temperatura de anillamiento se bajó dos grados centígrados a partir de 60 °C hasta llegar a una temperatura de 48 °C; en las tres primeras temperaturas de anillamiento se corrió 4 ciclos y para las temperatura de anillamiento siguientes se realizó 6 ciclos de corrida, extensión de 72 °C por 1 min.30s., y extensión final de 72 °C durante 10 min.

Partiendo del producto amplificado (Fig. 11), se realizó una PCR anidada a 54 °C con la Taq Phusion polimerasa la PCR se desarrolló con una desnaturalización inicial de 95 °C por 5 min, y 34 ciclos (desnaturalización de 94 °C por 30s, anillamiento 58 °C por 40 s, extensión 72 °C por 1 min.30s) extensión final de 72 °C por 10 min. Se obtuvo un producto de 1600 pb aproximadamente (Fig 12). Posteriormente se realizó el clonaje del producto de la PCR anidada, y se obtuvo 6 secuencias de buena calidad.

Mediante los análisis subsiguientes se determinó que las proteínas obtenidas no pertenecían a la familia de las Proteínas LEA 3, y que eran similares a proteínas hidrolasas asociadas a la pared celular de *Medicago Trucatula*. Sin embargo no presentaban una similitud alta y el porcentaje que cubría a la secuencia de las proteínas hidrolasa era relativamente bajo (tabla 8) por lo que no se creyó conveniente realizar más análisis.

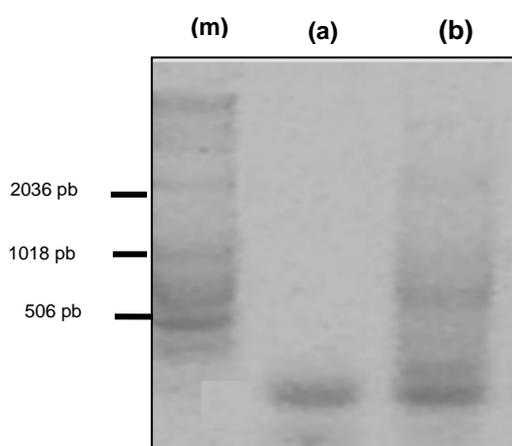


Fig. 11. (b) Producto amplificado mediante PCR touch down de la especie *Caesalpinea spinosa*. (a) blanco. (m) marcador molecular 1000 pb.

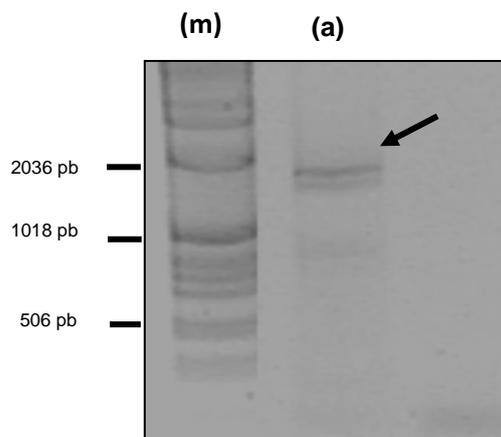


Fig. 12. (a) Producto amplificado 1600 pb por una PCR anidada a 54°C de la especie *Caesalpinea spinosa*. (m) marcador molecular 1000 pb.

RESULTADOS

Tabla 7. Cebadores para amplificación de las Proteínas LEA, familia 3 en distintas especies

Especie	Familia	Gen LEA 3 Accesión GenBank	Función	Cebador	Referencia
<i>Triticum aestivum</i>	Poaceae	AY148492.1	Tolerancia a la deshidratación	ATGGCCTCCAACCAGAACC GTGATTGCCGGTGATCTTC	Zhao et al. 2010 ⁴⁵
<i>Sorghum bicolor</i> <i>Oryza officinalis</i> <i>Zizania latifolia</i>	Poaceae	GQ494000 GQ 433601 GQ494017	Expresión frente al estrés hídrico	GCCGGCGAGRCCAAGGSMC GSCGGWYTTGTCCTTGCCGG	Yu et al. 2010 ⁴⁶
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicaceae	BT003165.1	Tolerancia a la deshidratación	ATGGCCGCTCGTTCACTCTC CGGTGCCGTTAAATCTCTTT	Hundermark & Hinch. 2008 ⁴⁷
<i>Prosopis juliflora</i>		DQ645423.1		GGAGCGATGGTGAGGTGGAAC GATAGGTTAGGGTGATGAATACAAG	Suja et al. 2009 ⁴⁸
<i>Glycine max</i>	Fabaceae	Z22872.1	Expresión de la proteína en tejidos sometidos a estrés hídricos o bajas temperaturas.	AGAGACCGTGAGGAATGC GATGTCCGAGAGGTTGCT	Hsing et al. 1995 ⁴⁹
<i>Triticum aestivum</i>	Poaceae	AF255052.1	Adquisición de tolerancia a la desecación.	AACCCCTACTCCCCTCCAT CCGACCCTCATCTCGTAGTC	Tsudak et al. 2000 ⁵⁰
<i>Oryza sativa</i>	Poaceae	D26538.1	Tolerancia frente al estrés hídrico	ATCTGCTCCGCGTCAACTAC AGCTGTGTTGCCCTGCT	Taka hashi et al. 1994

⁴⁵Zhao, Yan., Jinfeng, Y., Fengmin, Shi., Junjie, Wang., Qingchuan, Y. & Chao Yuehui. (2010). Molecular cloning and characterization of a group 3 LEA gene from *Agropyron mongolicum keng*. *Biotechnology*. 9: 6040-6048.

⁴⁶Yu, L., Wu, X. & Yan. B. (2010). Simple and efficient method for isolating cDNA fragments of *lea3* genes with potential for wide application in the grasses (*Poaceae*). *Genetic and Molecular Research*. 9: 1321-1325.

⁴⁷Hundermartmark, M. & Hinch, D. (2008). LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*. 9:118.

⁴⁸Suja G., Usha, B. & Ajay P. (2009). Isolation and Characterization of an Atypical LEA Protein Coding cDNA and its Promoter from Drought-Tolerant Plant *Prosopis juliflora*. *Biochem Biotechnol*. 157:244-253.

⁴⁹Hsing, Y., Chen, Z.Y., Zhin, M.D., Hsieh, J.S. & Chow, J.Y. (1995). Unusual sequences of group 3 LEA mRNA inducible by maturation of drying in soybean seeds. *Plant Mol Biol*. 29: 863-871.

⁵⁰Tsudak, T., Takumi, S., Mori, N., Atanassov, A. & Nakaruma, C. (2000). New members of a cold-responsive group-3 LEA/Rab-related Cor gene family from common wheat (*Triticum aestivum*). *Genes Genet Syst*. 75: 179-190.

RESULTADOS

Tabla 8. Similitud de la proteína codificada por las secuencias amplificadas con los cebadores seleccionados.

Proteínas hidrolasas asociadas a la pared celular (Cw-AH):accesión: NCBI	Porcentaje de similitud	Identidad *
Cw-AH: XP_003604156.1	62%	88%
Cw-AH: XP_003638717.1	85%	96%
Cw-AH: XP_003604156.1	93%	96%
Cw-AH: XP_003637074.1	66%	97%
Cw-AH: XP_003638717.1	98%	97%
Cw-AH: XP_003604156.1	98%	100%

*El error estándar para todas las secuencias es $4e^{09}$.

5. DISCUSIÓN

La elevada concentración de la familia de proteínas LEA en el reino vegetal y su alta relación entre la abundancia de estas proteínas y las condiciones de déficit hídrico denotan un papel relevante de las proteínas en este entorno (Garay-Arrobo et al. 2000)⁵¹ siendo necesario caracterizar la proteína y estudiar su función. Aunque las pruebas circunstanciales han sugerido la participación de estas proteínas en la adaptación de las plantas superiores a la baja disponibilidad de agua, no existe aún evidencia genética directa que en este sentido se haya informado.

En el presente trabajo se realizaron algunos ensayos con el objetivo de caracterizar una proteína LEA perteneciente a la familia 3, se escogió esta familia porque algunos trabajos realizados por Jeffrey & Walker. (1993)⁵², Ried & Walker. (1993)⁵³, Wise, M.J. (2003)⁵⁴, Yu et al. (2010)⁵⁵ sugieren, por la disposición de aminoácidos cargados dentro de los motivos conservados de la proteína, una posible función de secuestros de iones que se acumulan bajo condiciones de deshidratación. Según Dure, L. (1993)⁵⁶ la estructura típica de estas proteínas presentan un dominio conservado de 11 aminoácidos (TAQAAKEKAGE) por lo que su identificación resultaría más práctica, en concordancia con el autor creemos que la gran variedad de proteínas LEA 3 causada por el número de repeticiones en tándem del dominio conservado facilitaría su caracterización molecular.

En vista de que no existía revisión bibliográfica para trabajos moleculares en las especies escogidas para el presente estudio (*Senna alata*, *Senna mollissima* y *Caesalpinia spinosa*) se vio la necesidad de estandarizar el uso de un control positivo necesario para concluir de forma acertada en el éxito de los cebadores seleccionados para la identificación de proteínas LEA; para lo cual se diseñó cebadores específicos (Actin_syzy), los resultados que se obtuvieron fueron los esperados, una proteína que se relacionaba con la superfamilia de las actinas.

⁵¹Garay-Arroyo, A., Colmenero-Flores, J.M., Garcarrubio, A. & Covarrubias, A. (2000). Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *J Biol Chem.* 275: 5568-5674.

⁵²Jeffrey R, Walker-Simmons MK. (1993). Group 3 Late Embryogenesis Abundant Proteins in Desiccation-Tolerant Seedlings of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol.* 102: 125-131.

⁵³Ried JL, Walker-Simmons MK. (1993). Group 3 late embryogenesis abundant proteins in desiccation-tolerant seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol.* 102: 125-131.

⁵⁴Wise, MJ. (2003). LEA ping to conclusions: a computational reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles. *BMC Bioinformatics.* 4: 52.

⁵⁵Yu, L., Wu, X. & Yan. B. (2010). Simple and efficient method for isolating cDNA fragments of *lea3* genes with potential for wide application in the grasses (*Poaceae*). *Genetic and Molecular Research.* 9: 1321-1325

⁵⁶Dure, L. (1993). Structural motifs in LEA proteins. In TJ Close, EA Bray Eds, Plant responses to cellular dehydration during environmental stress. Am. Soc. Plant Physiologists, Rockville, MD, pp. 91-103.

Hugget et al. (2005)⁵⁷ considera que la validación de los genes de referencia para cada situación experimental es un requisito indispensable para la adquisición de datos biológicamente significativos. Dheda et al. (2004)⁵⁸ menciona que el método más común en la estandarización de los métodos es el análisis de un control endógeno co-expresado (es decir, genes de referencia), cuya expresión relativa no debe cambiar con las condiciones de tratamiento o estudio; es por ello que nos enfocamos en la selección de una adecuada estrategia de normalización.

Luego del análisis de las secuencias clonadas para *Caesalpinea spinosa* con cebadores usados para la amplificación de proteínas LEA de otras especies no se obtuvo los resultados esperados, la proteína obtenida no correspondía a una proteína Late Embryogenesis Abundant, Según Kikawada et al. (2006)⁵⁹ la expresión de las proteínas LEA tiene lugar únicamente en condiciones de estrés hídrico, posiblemente existieron numerosos factores que a continuación mencionamos que influyeron en el éxito de la caracterización de la proteína LEA, familia 3.

Los cebadores específicos a utilizar deben ser complementarios a cada uno de los extremos 3' de la región que se quiere amplificar y son necesarios para la actividad de la polimerasa (Giorgio, E. 2000)⁶⁰, si bien es cierto el cebador que seleccionamos fue utilizado para la amplificación en distintas especies, posiblemente no era específico para las especies de Fabáceas utilizadas en este estudio.

Otro posible factor que influyó en el éxito de la caracterización de las proteínas fue la extracción de ARNm, las semillas deshidratadas que se utilizaron presentaban una testa dura que impedía su fácil trituración y consecuentemente la extracción de ARN. Según Esau, K. (1928)⁶¹ la testa es el tegumento exterior de la semilla constituida por gran cantidad de carbohidratos y proteínas que confieren protección, impidiendo así la exposición directa del embrión, los carbohidratos no permiten una correcta lisis celular, motivo por el cual creemos que se dificultó el proceso de extracción.

⁵⁷Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S. & Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. *Genes Immun.* 6:279–284.

⁵⁸Dheda, K., Huggett, J.F., Bustin, S.A., Johnson, M.A., Rook, G. & Zumla, A. (2004). Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques.* 37:112–119.

⁵⁹Kikawada, T., Nakahara, Y., Kanamori, Y., Iwata, K., Watanabe, M., McGee, B., Tunnacliffe, A. & Okuda, T. (2006). Dehydration-induced expression of LEA proteins in an anhydrobiotic chironomid. *Biochem Biophys Res.* 34: 56-61.

⁶⁰Giorgio, Ernesto, M. (2000). Introducción a la Bioinformática: Introducción al diseño de primers.

⁶¹Esau, K. (1982). Anatomía de las plantas con semilla. Editorial. Hemisferio Sur. Buenos Aires.p.8-19 y 423-464.

Las proteínas LEA han sido asociadas con la tolerancia a la deshidratación celular, que puede ser inducida por condiciones de congelación, solución salina, o secado (Singh et al. 2005)⁶² es por ello que para su caracterización es necesario que la semilla se encuentre en un estado de estrés hídrico. Posiblemente las semillas utilizadas en el presente estudio no se encontraban en condiciones elevadas de estrés hídrico a pesar de que presentaban un contenido de humedad relativamente bajo. El comportamiento de conservación de las semillas seleccionadas, ortodoxo e intermedio sugiere que podrían soportar condiciones de deshidratación elevadas y periodos prolongados de almacenamiento, sin embargo basándonos en el presente estudio creemos que las semillas no estaban sometidas a deshidratación extrema. García & Pita. (2000)⁶³ menciona que la viabilidad de las semillas es un rasgo complejo controlado por factores genéticos, de desarrollo y medio ambiente. Como consecuencia creemos que factores externos influyeron para que las semillas recuperen humedad y reasuman su actividad metabólica, apoyamos nuestra teoría con los resultados obtenidos de proteínas hidrolasas asociadas a la pared celular que como cita Jaima et al. (2007)⁶⁴ y Fernández & Johnston. (2006)⁶⁵ cuando la semilla reasume su actividad metabólica lo primero que se observa es el aumento de la actividad respiratoria, con un importante consumo inicial de oxígeno gracias a las hidrolasas que están presentes en la semilla seca.

Como cita Delauche et al. (1993)⁶⁶ durante el almacenamiento existen factores ambientales que afectan al mantenimiento de la calidad de la semilla como la humedad relativa y la temperatura. Por lo que creemos que las semillas seleccionadas influidas por estos factores externos consecuencia del almacenaje empezaron a salir de su estado de latencia ocasionado por la deshidratación extrema ganando humedad y disminuyendo así la síntesis de las proteínas LEA.

⁶²Singh, S., Cornilescu, C.C., Tyler, R.C., Cornilescu, G., Tonelli, M., Lee, M.S. & Markley, J.L. (2005). Solution structure of a late embryogenesis abundant protein (LEA14) from *Arabidopsis thaliana* *Arabidopsis thaliana*, a cellular stress protein. *Protein Sci.* 14:2601-2609.

⁶³García, P. & Pita, J.M. (2000). Viabilidad, vigor, longevidad y conservación de semillas. Departamento de Biología vegetal, E.U.I. Técnico agrícola. Universidad Politécnica de Madrid.

⁶⁴Jaima, A., Arbevez, J. & Clavijo, J. (2007). Germinación de *Ischoemun rugosum* salisb. En respuesta a estímulos ambientales y químicos. *Temas Agrarios.* 12: 31-41.

⁶⁵Fernández, G. & Johnston, M. (2006). Fisiología Vegetal capítulo XX: Crecimiento y Temperatura. Chile.

⁶⁶Delauche, J., Matthes, R., Dougherty, g. & Boyd, A. (1993). Storage for seed in subtropical and tropical regions. *Seed Science and technology.* 1: 671-700.

6. CONCLUSIONES

- Siendo una posible función de las proteínas LEA la tolerancia a la deshidratación, su caracterización tendrá lugar únicamente en semillas sometidas a niveles elevados de estrés hídrico, en el caso de las especies estudiadas a pesar de que su nivel de deshidratación era alto posiblemente el tiempo prolongado de almacenamiento y factores externos como la humedad relativa y la temperatura provocaron que las semillas reasuman su actividad metabólica, dificultando la amplificación de las proteínas LEA.
- En la semilla de la especie *Caesalpinea spinosa*, en los ensayos de amplificación de proteínas LEA, se encontró proteínas hidrolasas asociadas a la pared celular, las mismas que son sintetizadas cuando una semilla pasa de un estado latente a un estado de actividad, aumentando su actividad enzimática, esto confirma que las semillas utilizadas habían reasumido su actividad metabólica.
- Se ha establecido los controles positivos que pueden ser utilizados para las tres especies de este estudio posibilitando trabajos moleculares futuros.
- Se ha obtenido la secuencia parcial para el gen de Actina de la especie *Caesalpinea spinosa* con uno de los cebadores diseñados para este estudio: *Actin_Syzy* y se ha verificado su pertenencia a la familia de las ACTINA.

7. ANEXOS

7.1 Extracción de ADN Genómico (Wisard® de Promega)

1. Triturar el tejido siempre en nitrógeno líquido hasta que éste sea un fino polvo.
2. Antes de que se evapore el nitrógeno líquido añada 600 µl de la solución de lisis Nucleic Lysis Solution y aplique vortex por no más de 3 seg.
3. Incubar la mezcla a 65oC por 15 min.
4. Añadir 3 µl RNase Solution y mezclar por inversión de 2 a 5 veces. Incubar la mezcla a 37 oC por 15 min. Dejar enfriar la muestra a temperatura ambiente por 5 min.
5. Añadir 200 µl de la solución de precipitación de proteínas Protein Precipitation solution y aplicar vortex vigorosamente a alta velocidad por 20 seg.
6. Centrifugar por 3 min., a 13000 rpm. El precipitado de las proteínas formará un pellet.
7. Remover cuidadosamente el sobrenadante que contiene el ADN y colocarlo en los tubos con membrana. Incubar a temperatura ambiente por 2 min.
8. Centrifugar por 30 seg y conservar el sobrenadante en un tubo etiqueta en hielo.
9. Lavar dos veces con 650 µl de la solución Wizard® SV Wash Solution. Centrifugar durante 2 min. en un tubo nuevo para eliminar el exceso de etanol.
10. Centrifugar durante 2 min. en un tubo nuevo para eliminar exceso el exceso etanol.
11. Colocar la membrana en un tubo nuevo y colocar 100 µl de agua libre nucleasas. Incubar a temperatura ambiente por 1 min y centrifugar a velocidad máxima por 1 min.
12. Inmediatamente colocar en hielo hasta almacenar a -20°.

5.2 Extracción de ARN (Plant Rneasy Mini de Quiagen)

1. La extracción debe ser realizada a partir de no más de 60 mg de tejido.
2. Colocar e un tubo de 1.5 ml, 175µl de RNA Lysis buffer (con β-mercaptoetanol).
Pesar el tubo y registrar el peso.
3. Triturar el material vegetal en nitrógeno líquido sin dejar que se descongele.
4. Añada el material vegetal (que debe ser casi un polvo triturado) al tubo con el buffer de lisis. Pese el tubo y registre el peso del material (restando el nuevo peso del valor registrado en el paso 2), pues el rango de buffer de lisis debe ser de 175 µl por cada 30 mg de material.
5. Añada 350 µl de RNA Dilution Buffer (azul) a los 175µl de lisado. Mezcle por inversión 3-4 veces. Coloque la mezcla a calentar a 70°C máximo por 3 min. (periodos mayores de incubación puede dañar la calidad de ARN).
6. Centrifugar 10 min. A 12000 rpm
7. Transfiera el sobrenadante a un nuevo tubo, sin tocar el pellet.
8. Añada 200 µl de etanol al 95 % al lisado y mezcle pipeteando de 3-4 veces.
Transfiera esta mezcla a la columna. Centrifugue a 12000 rpm
9. Descarte el líquido y vuelva a colocar la membrana en el tubo de colección.
10. Verifique que se ha añadido el etanol a la "RNA Wash solution".
11. Añada 600 µl de "RNA Wash solution" a la columna y centrifugue por 1 min.
12. Descarte el líquido y vuelva a colocar la membrana en el tubo de colección.
13. Para cada extracción prepare la mix de incubación de DNase: Mezcle en el siguiente orden: 40 µl de "Yellow Core Buffer", 5µl 0.09M MnCl₂ y 5 µl de cantidad necesaria para cada extracción y mantenga en hielo.
14. Añada 50 µl de esta mezcla a cada membrana.
Incube a 20-25°C por 15 min.

15. Añada 200 μ l de “DNase Stop solution” (con etanol añadido) y centrifugue a 12000 rpm.
16. Elimine el líquido y añada 250 μ l de “RNA Wash Solution” y centrifugue a máxima velocidad por 2 min.
17. Transfiera la columna a un tubo nuevo y centrifugue por 2 min. a máxima velocidad.
18. Transfiera la columna a un nuevo tubo y añada 100 μ l de “Elution Buffer” y mantenga por 1 min. a temperatura ambiente.
19. Centrifugue por 1 min a 12000 rpm. Elimine la membrana y almacene el RNA en alícuotas de 20 μ l a -80°C .

7.3 Síntesis de cDNA (Enzima Applied)

1. Descongelar el ARN y los reactivos en hielo
2. Preparar una mix con los reactivos necesarios.

Reactivo	1x
2x RT Buffer	10 μ l
20 x RT Enzyme Mix	1 μ l
RNA	9 μ l
Volumen Final	20 μ l

3. Mezclar bien por pipeteo y recoge todo el volumen.

Realizar en el termociclador la siguiente incubación.

Temperatura	Tiempo
37 °C	60 min
95 °C	5 min
4 °C	Hold

7.4 Protocolo de Cloning (Estandarizado por el grupo de micorrizas de la UTPL)

- Incubar los medios sólidos, aproximadamente 1 hora antes de empezar el cloning.
- Descongelar de -80°C las bacterias *E. coli* al momento de iniciar el cloning, pero mantenerlas de 0 a 4 °C.
- Calentar el bloque a 42 °C al empezar el mix.

Cloning

1. Preparar Mix (tubos de 500 µl)
 - Solución Salina 0.33 µl
 - Vector (Zero Blunt) 0.33 µl
 - Producto de PCR 1.33 µl
2. Realice una pequeña centrifugación de 30 seg. a 14000 rpm.
3. Incubación del mix a temperatura ambiente TA por 20 min.
4. Dividir 16.5 µl del tubo de células *E. coli*. A dos tubos de 2 ml o 1.5 ml (mantenerlas a 0°C)
5. Tomar 2 µl de cada mix y colocarla en cada tubo de células anteriormente dividida por 10 min a 0°C

6. Colocar los tubos (células+mix) por 60 seg. a 42°C
7. Pasar los tubos a 0°C por 5 min.
8. Añadir 83.5 µl de medio S.O.C. a todos los tubos
9. Incubar durante 1 hora a 37°C en agitación a 195 rpm.
10. Sembrar e incubar durante 12 horas.

7.5 Extracción de ADN plasmídico (GenElute™HP Plasmid miniprep de Sigma Aldrich)

1. Cultivo de Células

Cultivar toda la noche a 37 °C y 200 rpm.

2. Colección de las células

Realizar el pellet del cultivo, a partir de 1-5 ml (Dependiendo del crecimiento del cultivo). Para esto colocar el cultivo en un Eppendorf de 2 ml y centrifugar a 12000 rpm por 6 min, eliminar el sobrenadante. Si se utiliza más de 2 ml, repetir el paso anterior en el mismo Eppendorf.

3. Resuspensión

Resuspender totalmente el pellet de las bacterias con 200µl de la solución de resuspensión.

4. Lisis

Añadir 200 µl de Buffer de Lysis. Inmediatamente mezclar por inversión dando vuelta a los tubos no más de 6 veces, despacio hasta que la mezcla quede clara y viscosa.

5. Neutralización

Precipitar los desechos de las células: Añada 350 µl de buffer Neutralización Binding Buffer mezclar por inversión-dando vuelta a los tubos 4-6 veces despacio. Peletar los desechos de las células: Centrifugar a máxima velocidad

durante 10 min, los desechos de las células se quedan pegados a las paredes del Eppendorf: Colecte el sobrenadante en un tubo Eppendorf nuevo.

6. Preparación de la columna

Inserte la columna GelElute dentro del tubo de colección provisto por el kit. Añada 500 µl de la solución Column Preparation Solution a cada columna y centrifugue por 1 min. Elimine el líquido del tubo de colección.

7. Cargado en la columna

Transfiera el líquido del paso 6 a la columna. Centrifugue por 1 min. Elimine el líquido del tubo de colección

8. Lavado

Añada 500 µl de la solución de lavado-1 Wash solution1- a la columna y centrifugue a 12000 rpm por 1 min. Elimine el líquido del tubo de colección. Añada 750 µl de la solución de lavado 2- Wash solution2- a la columna y centrifugue a 12000 rpm. Elimine el líquido del tubo de colección. Centrifugue la columna con el tubo nuevo de colección vacío, durante 20 min. A 12000 rpm, para eliminar el exceso de etanol.

9. Elución

Transfiera la columna a un tubo de colección nuevo, añada 100 µl de H₂O libre de nucleasas. Incube 1 min a temperatura ambiente para que la columna se empape. Centrifugue a 12000 rpm por 1 min. Elimine la columna y almacene inmediatamente a -20°C.