

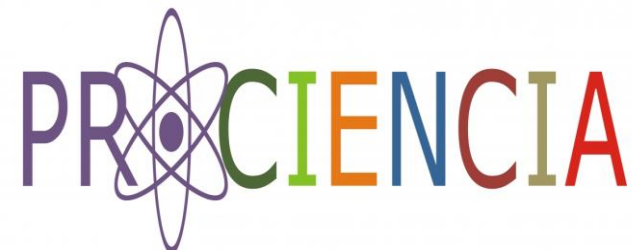
# Aislamiento de genes homeóticos y de resistencia de *Stevia rebaudiana*

*Bioq. M.Sc Rubén Darío Duré*

*Centro de Investigación Científica de Yucatán*

*CEMIT-DGICT-UNA*

*Programa de vinculación de Científicos y tecnólogos del  
CONACYT*



PROGRAMA PARAGUAYO PARA EL DESARROLLO DE LA CIENCIA Y TECNOLOGÍA

# INTRODUCCIÓN



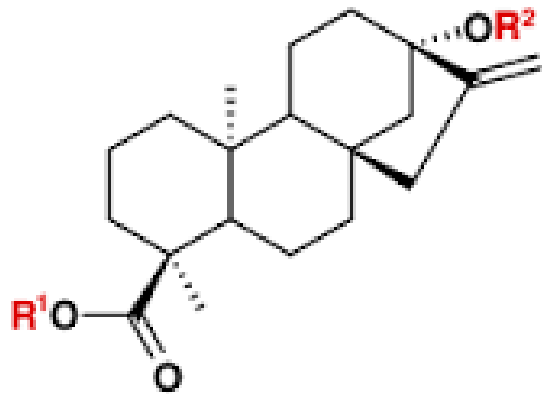
*Stevia rebaudiana*  
Familia Asteraceae  
con 154 sp del género.  
*S. aristata* y *S. rebaudiana* Bertoni  
producen esteviol  
glicosidos  
Hábitat natural: 22°-  
24° L.S y 55°-56° L.O  
de la Reg. Del  
Paraguay incluyendo  
parte del Brasil.



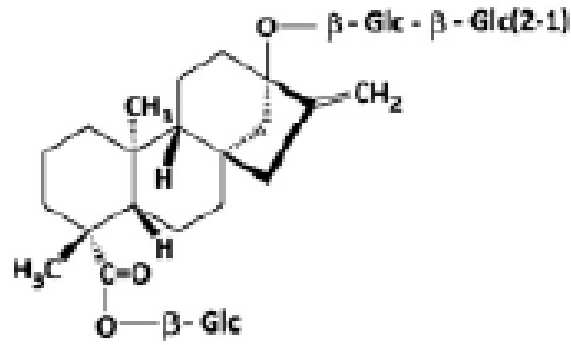


**Edulcorante unas 300 veces mas dulce que la sacarosa, No calórico  
Se le atribuye propiedades medicinales: Acción hipoglicemiante, cardiovascular, antimicrobiana, tónica digestiva, previene las caries y formación de placas, y muchas otras**

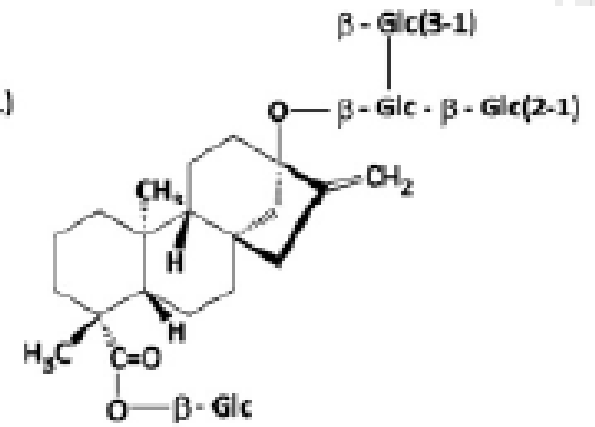




**Steviol Glycosides**



**Stevioside**



**Rebaudioside A**

Tienen origen biosintético similar al del ácido giberélico . Bandle . 1998





## **Cultivo alternativo para la agricultura familiar**

Rubro agrícola más a ser utilizado en pro de la diversificación agrícola del pequeño productor



- El sistema de producción es por propagación clonal, ya que sus semillas poseen bajo poder de germinación y alto grado de heterocigosidad, por lo que no se conservaría las características varietales.
- El cuello de la botella del cultivo de Stevia es la propagación de la planta madre.



- Las técnicas de cultivo de tejidos proporcionan una poderosa tecnología
- Aumentar el potencial de proliferación celular contribuirá en la eficiencia de las técnicas de cultivo in vitro



- Objetivo general

- Aislar genes homeóticos y de resistencia (SERK1, WOX4, LEC1, BBM) de *Stevia rebaudiana*

- Objetivos específicos

- Optimizar protocolos de extracción de ARN totales de raíz, hojas y ápice.
- Sintetizar cDNA de los genes de interés a partir de cebadores degenerados
- Clonar y secuenciar las secuencias amplificadas.





# New Insights into Somatic Embryogenesis: *LEAFY COTYLEDON1*, *BABY BOOM1* and *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN4* Are Epigenetically Regulated in *Coffea canephora*

Geovanny I. Nic-Can<sup>1</sup>, Adolfo López-Torres<sup>3</sup>, Felipe Barredo-Pool<sup>4</sup>, Kazimierz Wrobel<sup>3</sup>, Víctor M. Loyola-Vargas<sup>2</sup>, Rafael Rojas-Herrera<sup>1</sup>, Clelia De-la-Peña<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup> Campus de Ciencias Exactas e Ingeniería, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México, <sup>2</sup> Centro de Investigación Científica de Yucatán, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Mérida, Yucatán, México, <sup>3</sup> Facultad de Química, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México, <sup>4</sup> Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán, México



# ESTRATEGIA

- I. Obtención del material vegetal
- II. Preparación del material para extraer ARN total
- III. Extracción de las poblaciones de ARN mensajero
- IV. Síntesis de amplicones por RT-PCR con cebadores degenerados
- V. Clonación de amplicones en *E. coli*.
- VI. Secuenciación de amplicones

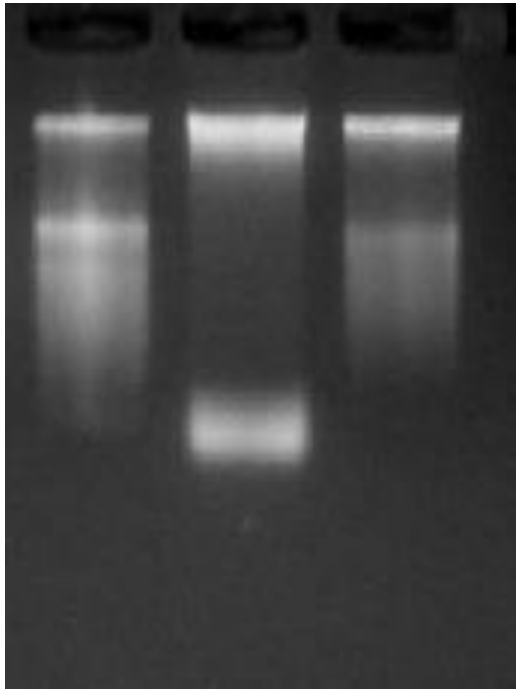


# RESULTADOS



# EXTRACCIÓN ARN TOTALES MEDIANTE KIT COMERCIAL

Raíz      Hoja      Hoja



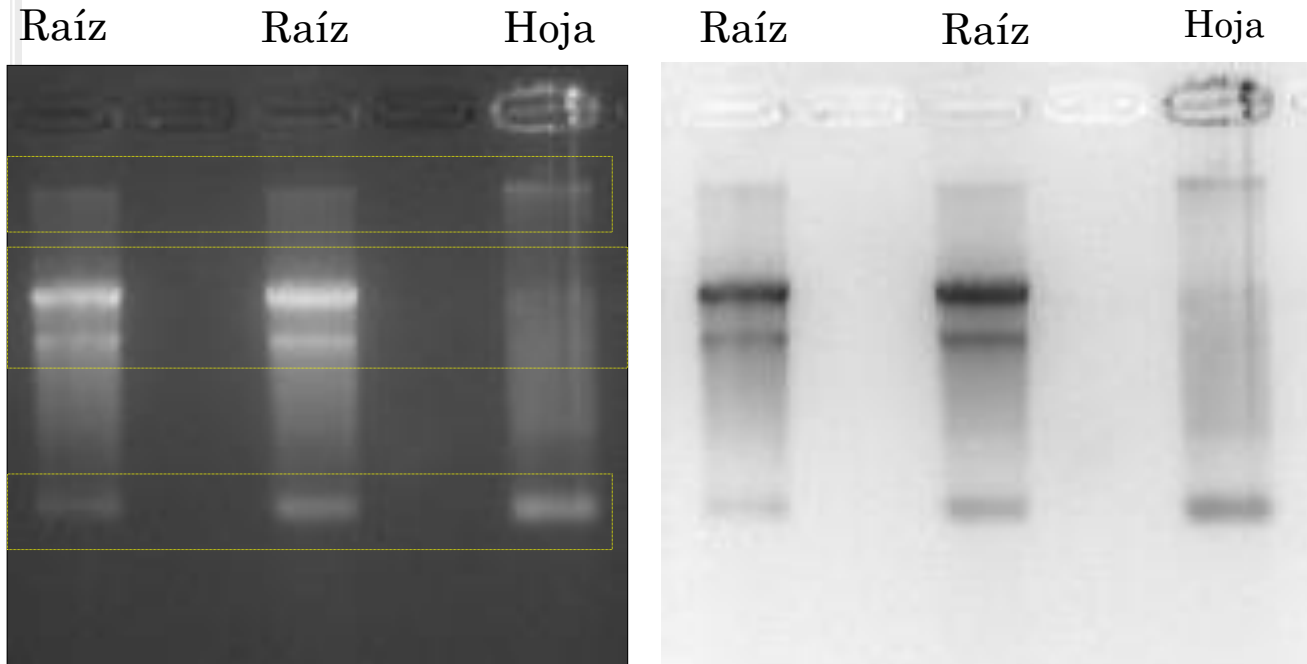
Extracción de ARN totales  
Kit Norgen Biotec.

Se pueden observar las bandas de ADN como contaminante.

El perfil de la muestra del carril cuatro sugiere degradación. Se recomienda el uso de la técnica del Trizol

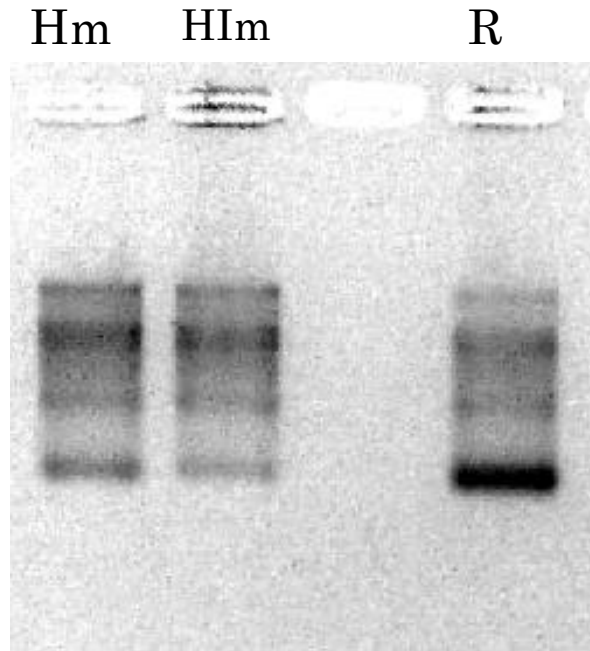
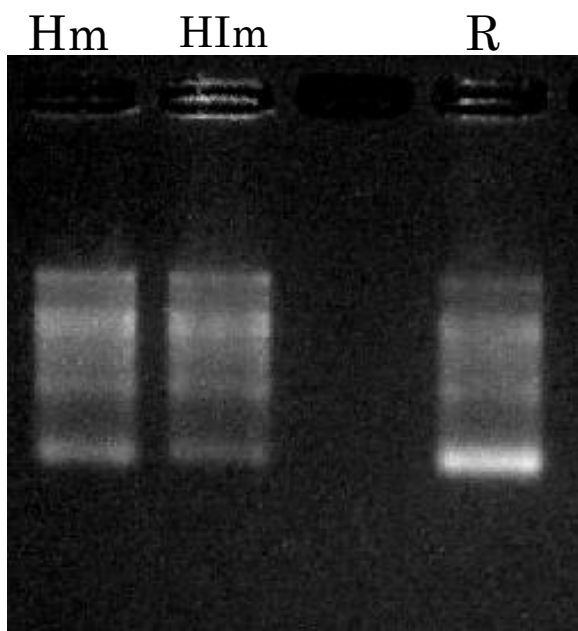
Setiembre 4, 2015

# EXTRACCIÓN MEDIANTE MÉTODO DE TRIZOL



Tanto para raíz como para hojas se puede observar presencia de ADN genómico, se procedió a la cuantificación por nanodrop 2000.

# EXTRACCIÓN DE ARN TOTALES MÉTODO DE TRIZOL



Setiembre 10,  
2015



# CUANTIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLÉICOS POR NANODROP 2000

Muestra	Conc. (ng/uL)	260/280	260/230
Ápice	1,416	2.17	1,57
Hoja In.	127,9	2,03	0,27
Hoja Mad	43,1	1,62	0,11

Las muestras corresponden a ápice, hojas inmaduras y hojas maduras, extraídas por el protocolo de TRIzol modificado (lavados con sales de NaCl y acetato de sodio).



**TECHNICAL NOTE**

**Open Access**

## An RNA isolation system for plant tissues rich in secondary metabolites

Sanjay Ghawana<sup>1,2</sup>, Asosii Paul<sup>1</sup>, Hitesh Kumar<sup>1,3</sup>, Arun Kumar<sup>1</sup>, Harsharan Singh<sup>1,4</sup>, Pardeep K Bhardwaj<sup>1,5</sup>, Arti Rani<sup>1,6</sup>, Ravi S Singh<sup>1</sup>, Jyoti Raizada<sup>1</sup>, Kashmir Singh<sup>1,7</sup> and Sanjay Kumar<sup>1\*</sup>

### (b) Protocol for Isolation of RNA

- i. Grind 10-100 mg of tissue to a fine powder in liquid nitrogen using a mortar and pestle.
- ii. Add 2 ml of solution I, grind further. Solution I gets frozen as added; make fine powder of the frozen material; continue grinding so as to make a homogenous mixture; this ensures close contact of the tissue ingredients and the reagents that would help in instantaneous denaturation of protein. Allow to thaw completely with intermittent grinding.
- iii. Add 800  $\mu$ l of DEPC-treated water, and mix it by grinding.
- iv. Transfer the contents to two, 2 ml micro-centrifuge tubes and leave for 5 min at room temperature.
- v. Add 200  $\mu$ l of chloroform to each tube, vortex briefly (< 10 s) and leave for 10 min at room temperature.
- vi. Centrifuge at 13,000 rpm for 10 min at 4 °C and transfer the upper aqueous phase into fresh tubes.
- vii. Add 0.6 volumes of isopropanol, vortex briefly (< 10 s) and leave for 10 min at room temperature.
- viii. Centrifuge at 13,000 rpm for 10 min at 4 °C and discard the supernatant.
- ix. Wash RNA pellet with 70% ethanol, air dry and dissolve in 20 to 50  $\mu$ l of DEPC-treated water.

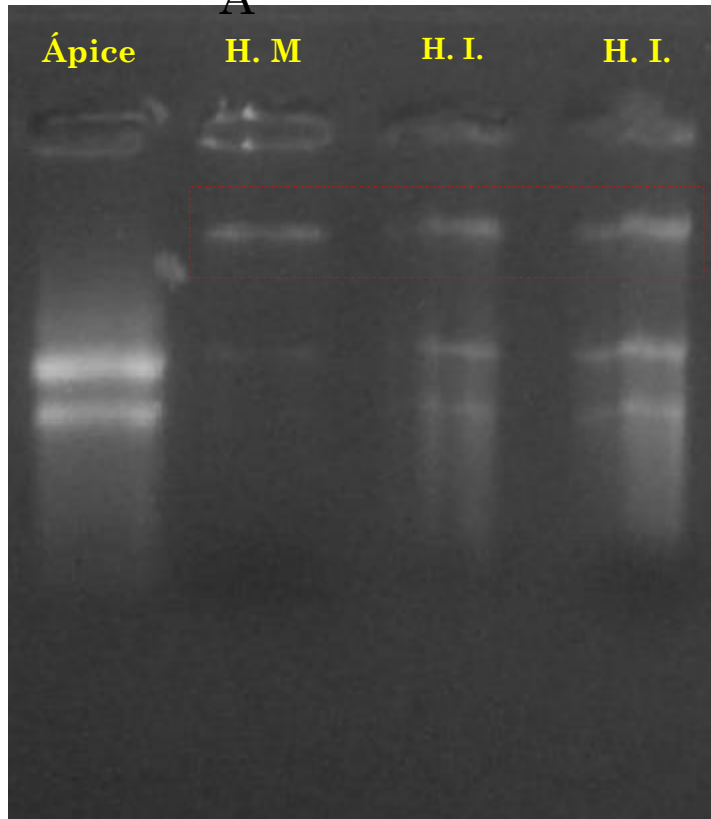




# PERFIL DE ARN TOTALES

Trizol    Fenol/SDS/NaOAC/EDT

A



**Ápice:** fue extraído el día jueves 24.09. según el protocolo de TRIZOL modificado por el maestro Ramón, consistente en lavados con sales

**H.M.:** Hojas Maduras. Extracción según protocolo de Ghawana *et al.*, 2011 para materiales con alto contenido de metabolitos secundarios.

**H.I.:** Hojas Inmaduras. Extracción según protocolo de Ghawana *et al.*, 2011 para materiales con alto contenido de metabolitos secundarios.

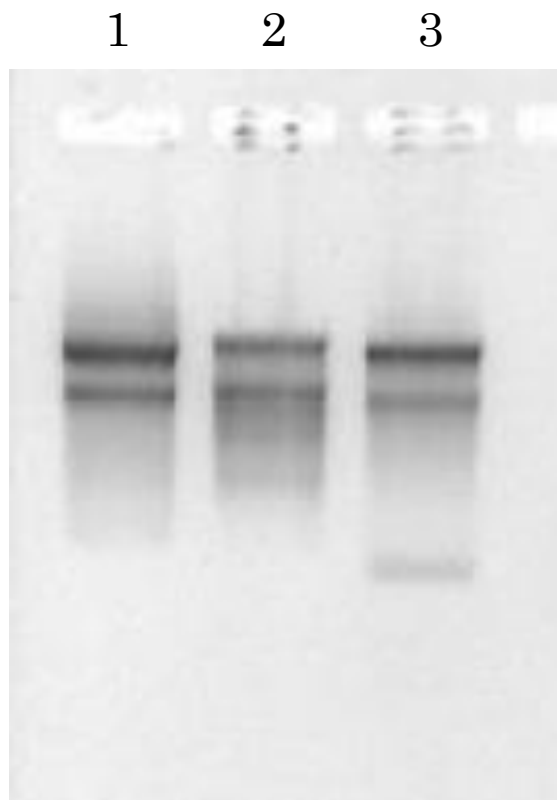
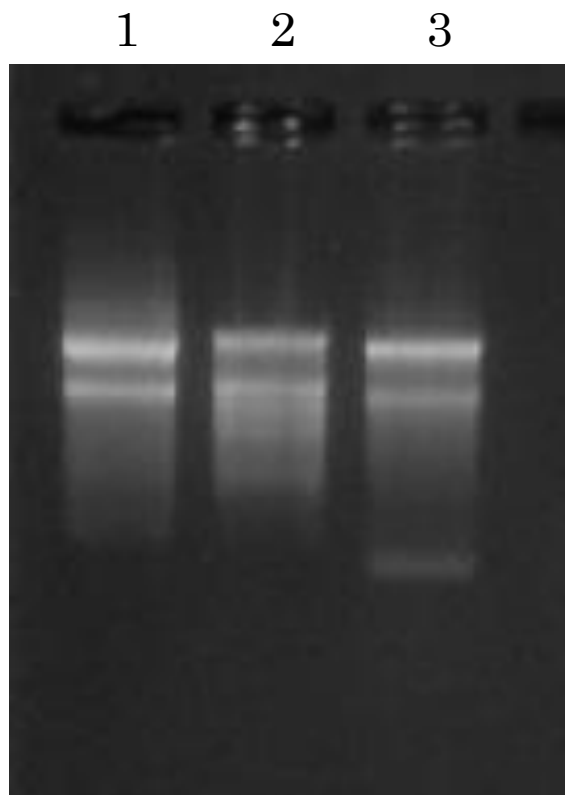
# Tratamiento con DNasa

## **DNA-free™ Kit** **DNase Treatment and Removal Reagents**

Catalog Number AM1906

Publication Number 1906M **Revision E**





Postratamiento  
con DNAsa:

1: Ápice  
2: Hoja inmadura  
3: Raíz

Muestra	Conc. (ng/uL)	260/280	260/230
Ápice	516,1	2,21	1,58
Hoja In.	406,1	2,02	2,15
Raíz	342,5	2,01	1,72

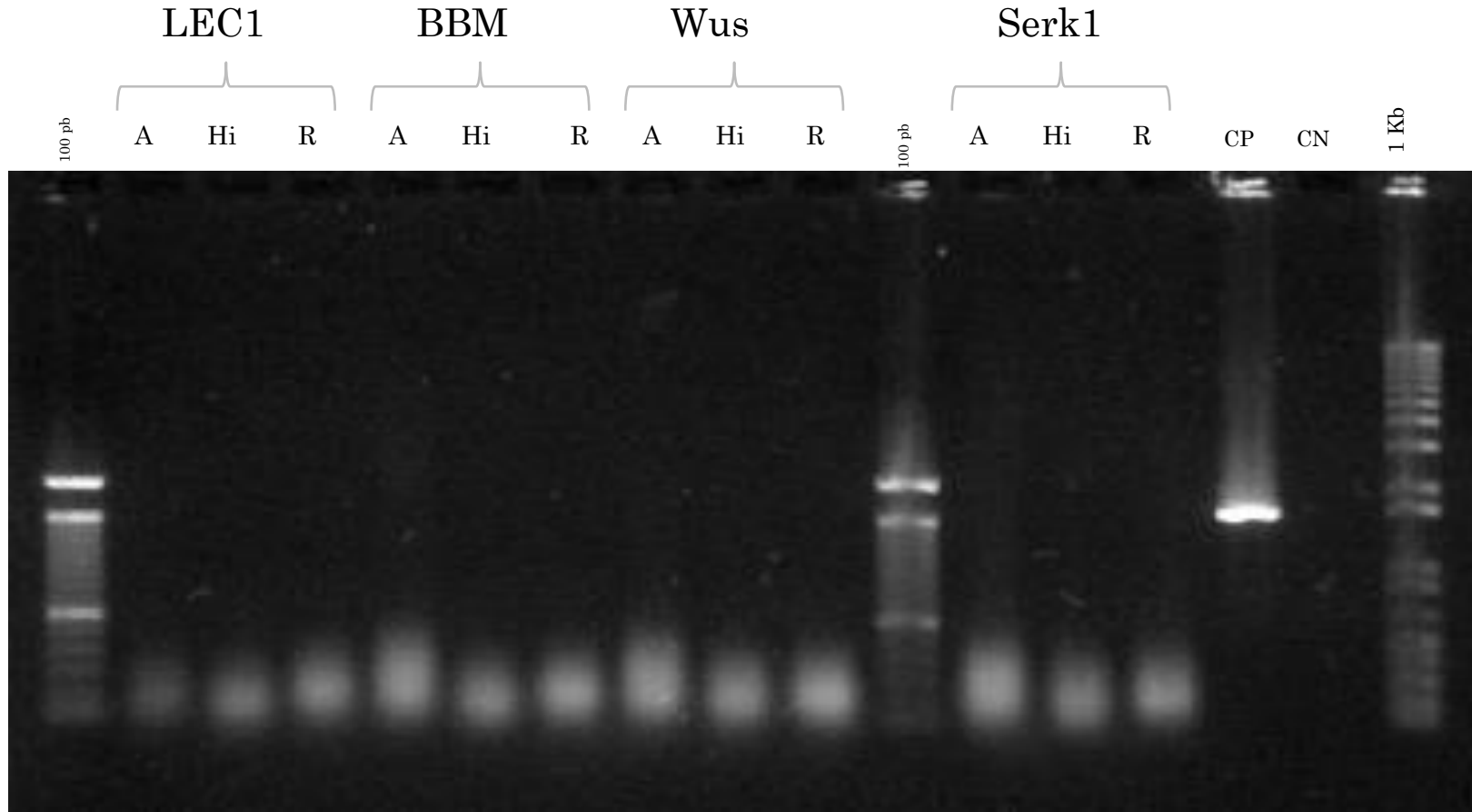
- Amplificación de los genes Serk1, Lec 1, Wus y Bbm mediante la tecnología SuperScript One-Step RT-PCR

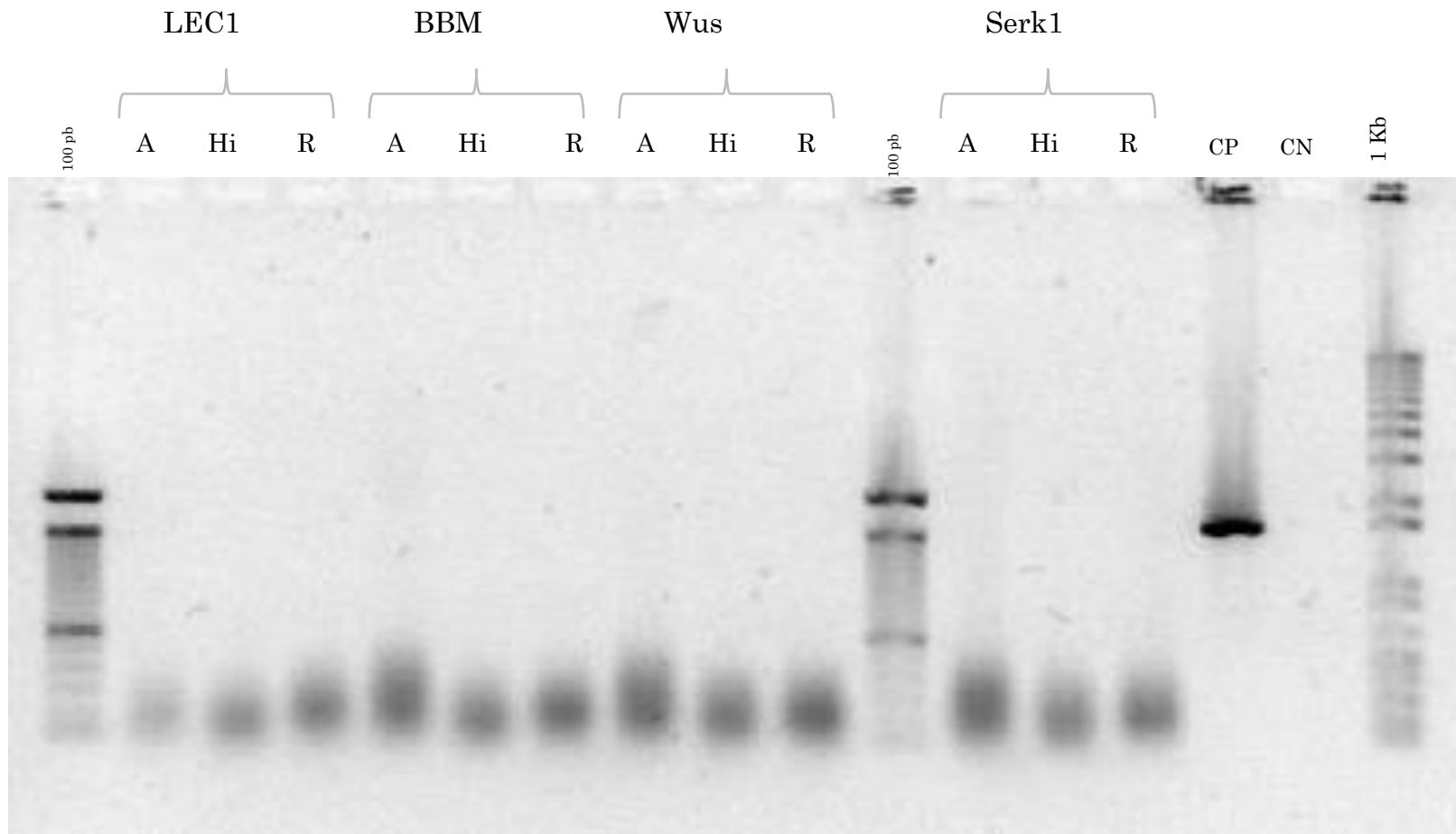


**SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq**



Síntesis de cADN mediante RT-PCR con SuperScript. One-Step RT-PCR con cebadores degenerados (0.8 µg de ARN de Raíz)



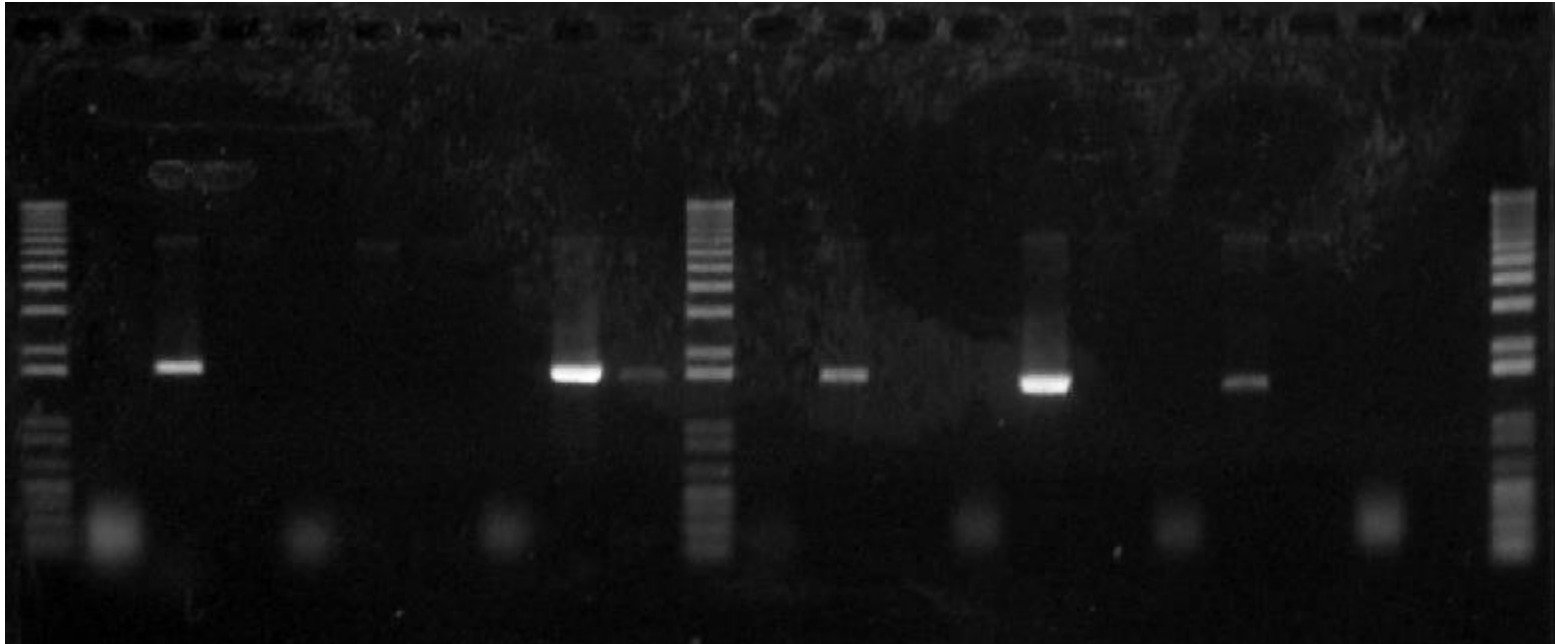


A: Ápice, Hi: Hoja inmadura, R: raíz

Octubre 01,  
2015

# Productos de RT-PCR-OneStep/Serk1; combinaciones de cebadores serk1 (0.4 µg ARN de Raíz, control plasmido SerK1C.a)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23



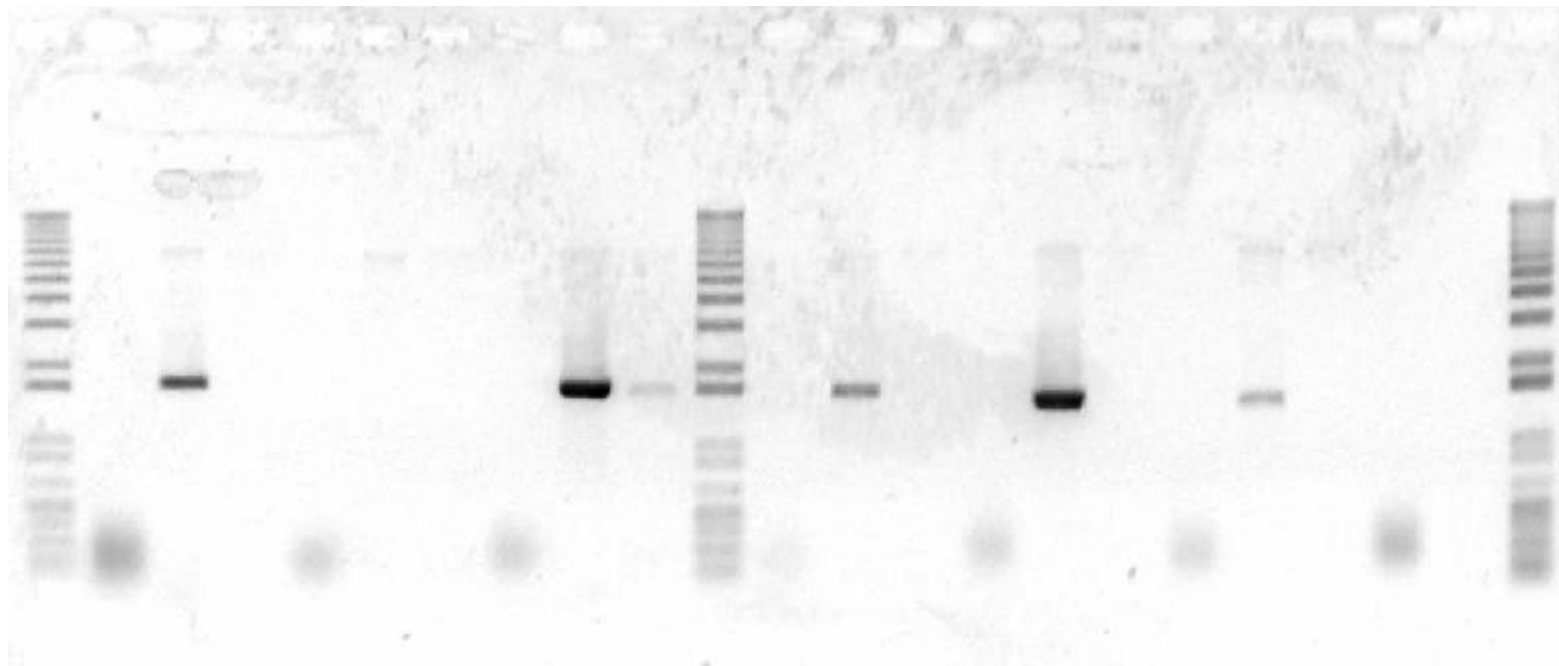
1: Kb  
2: **Dir 1 – Rev 2**  
3: Control Dir 1 – Rev 2  
4: Control Dir 1 – Rev 2 (d)  
5: **Dir 1 – Seco Rev**  
6: Control Dir 1 – Seco Rev  
7: Control Dir 1 – Seco Rev (d)  
8: **Dir 2 – Rev 2**  
9: Control Dir 2 – Rev 2  
10: Control Dir 2 – Rev 2(d)

11: Kb  
12: **Dir 2 – Seco Rev**  
13: Control Dir 2 – Seco Rev  
14: Control Dir 2 – Seco Rev (d)  
15: **Dir 3 – Rev 2**  
16: Control Dir 3 – Rev 2  
17: Control Dir 3 – Rev 2(d)  
18: **Dir 3 – Seco Rev**  
19: Control Dir 3 – Seco Rev  
20: Control Dir 3 – Seco Rev (d)

21: Control 18S  
22: Control MAPK  
23: 1Kb

Octubre 2,  
2015

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23



1: Kb  
2: **Dir 1 – Rev 2**  
3: Control Dir 1 – Rev 2  
4: Control Dir 1 – Rev 2 (d)  
5: **Dir 1 – Seco Rev**  
6: Control Dir 1 – Seco Rev  
7: Control Dir 1 – Seco Rev (d)  
8: **Dir 2 – Rev 2**  
9: Control Dir 2 – Rev 2  
10: Control Dir 2 – Rev 2(d)

11: Kb  
12: **Dir 2 – Seco Rev**  
13: Control Dir 2 – Seco Rev  
14: Control Dir 2 – Seco Rev (d)  
15: **Dir 3 – Rev 2**  
16: Control Dir 3 – Rev 2  
17: Control Dir 3 – Rev 2(d)  
18: **Dir 3 – Seco Rev**  
19: Control Dir 3 – Seco Rev  
20: Control Dir 3 – Seco Rev (d)

21: Control 18S  
22: Control MAPK  
23: 1Kb

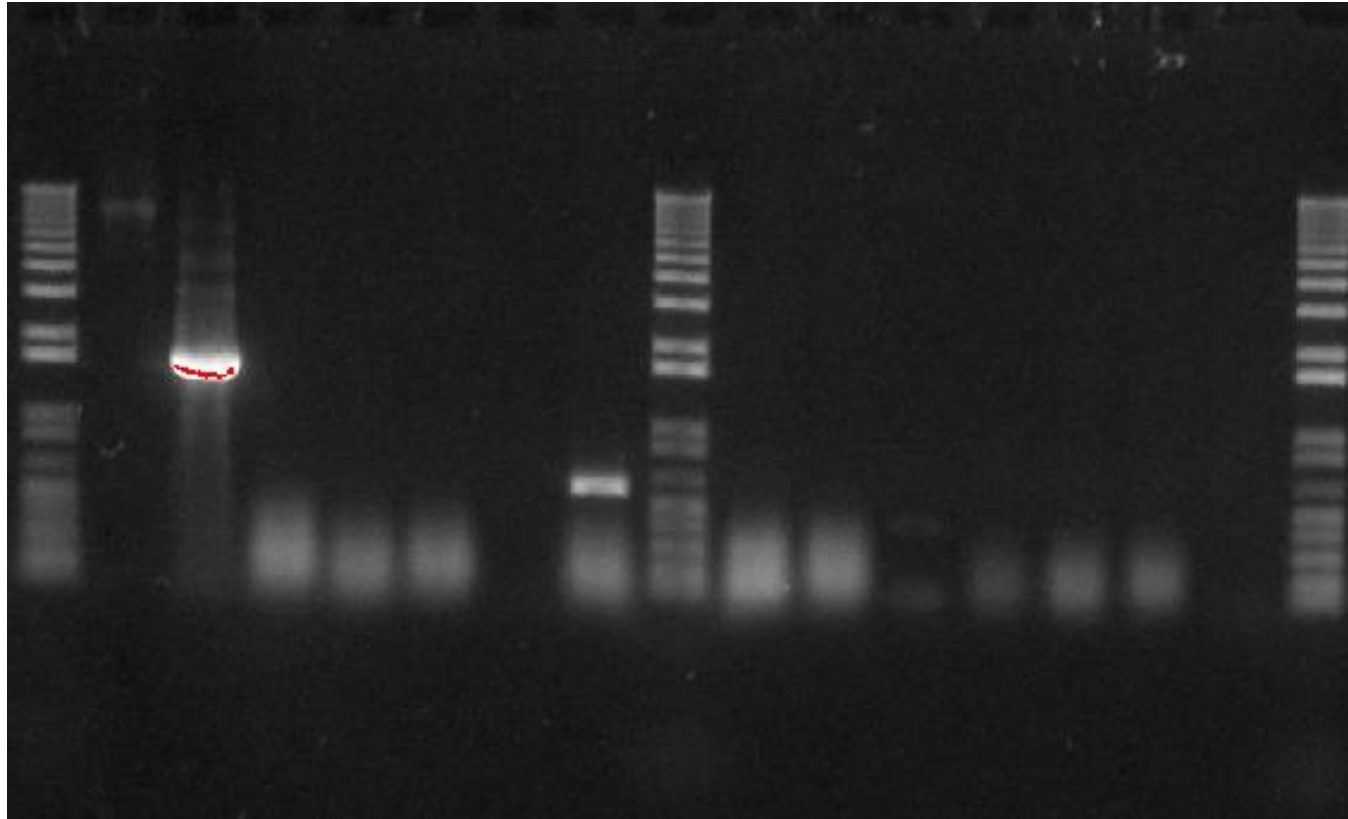




# Productos de RT-PCR, OneStep (Diferentes RNA's / cebadores específicos)

D2 x R2: Serk-1

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17



1: 1kB  
2: pAtSerk /cebadores esp. serk1  
3: pAtSerk /cebadores deg serk1  
4: Stevia /cebadores esp serk1  
5: Stevia /cebadores deg serk1  
6: Stevia /cebadores actina

7: Stevia/cebadores MAPK  
8: Cafe/cebadores específicos serk1  
9: 1Kb  
10: Cafe/cebadores degenerados serk1  
11: Cafe/cebadores específicos actina  
12: Cafe/cebadores MAPK

13: Chile hab/ cebadores específicos serk1  
14: Chile hab/ cebadores degenerados serk1  
15: Chile hab/cebadores actina  
16: Chile hab/cebadores MAPK  
17: 1 Kb

Octubre 5, 2015

# Generación de un pool de dcADNc

Clontech Laboratories, Inc.

## SMART® cDNA Library Construction Kit User Manual

Cat. No. 634901  
PT3000-1  
(041315)

Clontech Laboratories, Inc.  
A Takara Bio Company  
1290 Terra Bella Avenue, Mountain View, CA 94043, USA  
U.S. Technical Support: [tech@clontech.com](mailto:tech@clontech.com)

United States/Canada 800.662.2566 Asia Pacific +1.650.919.7300 Europe +33.(0)1.3904.6880 Japan +81.(0)77.543.6116

### SMART cDNA Library Construction Kit User Manual

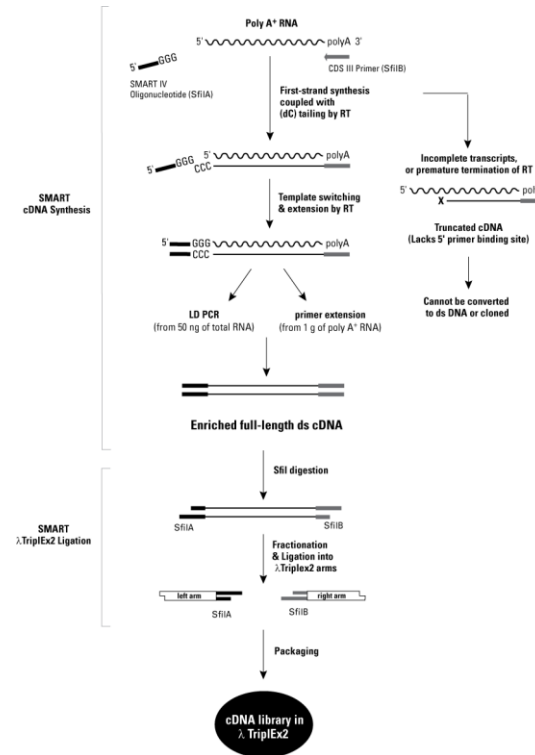


Figure 1. Flow chart of the SMART cDNA Library Construction Kit protocols. The right side of the flow chart shows the fate of incomplete transcripts caused by RNA degradation or premature termination of reverse transcription.

Síntesis de csADN y  
dcADN (1  $\mu$ g de RNA de  
Raíz)

1

2

3

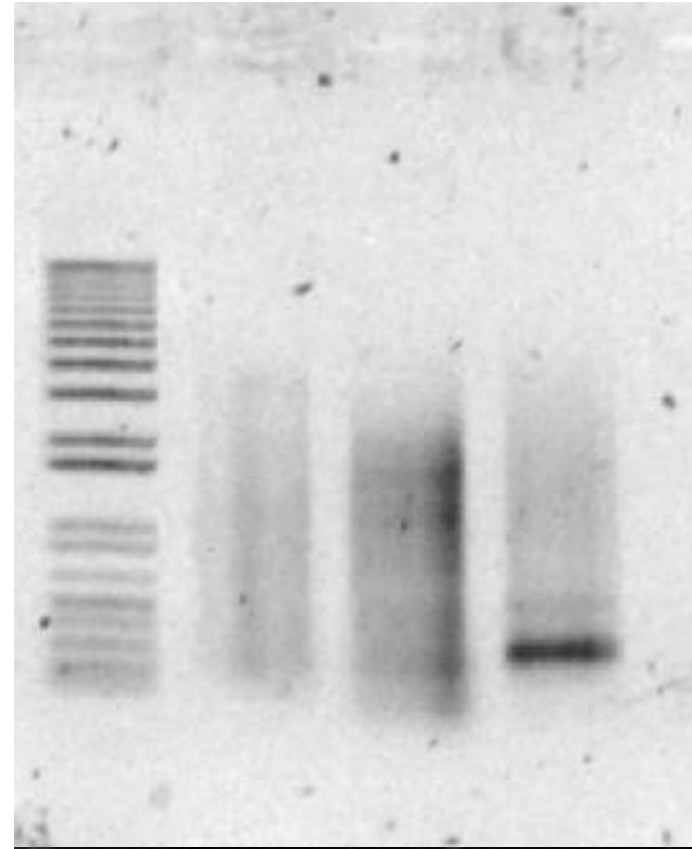
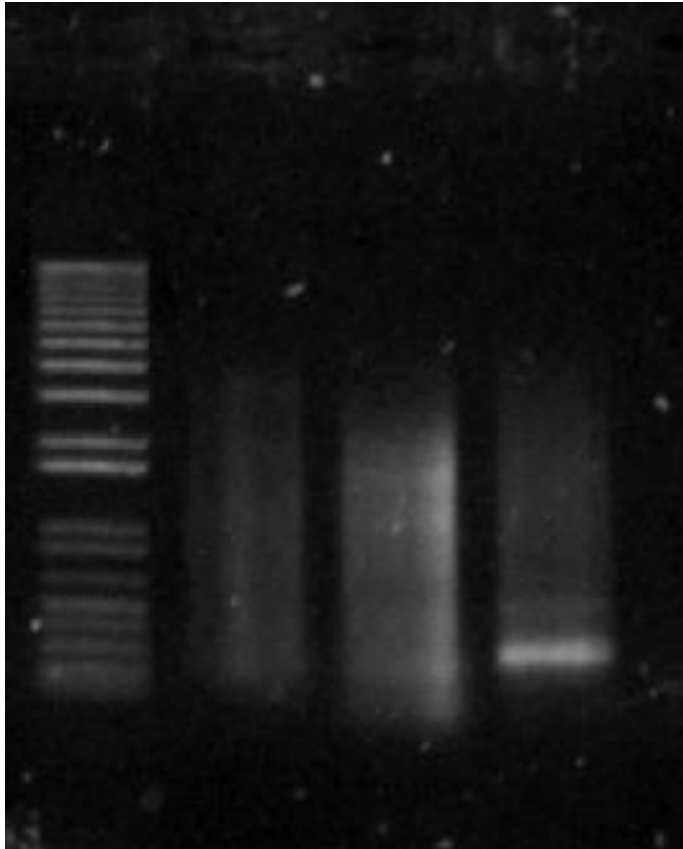
4

1

2

3

4



1: 1Kb, 2: oligo d(T) 3: SMART, 4: dcADNc



**FINNZYMES**

Part of Thermo Fisher Scientific

# Phire<sup>®</sup> Plant Direct PCR Kit

## Product code:

F-130, 200 PCR reactions 50 µl each

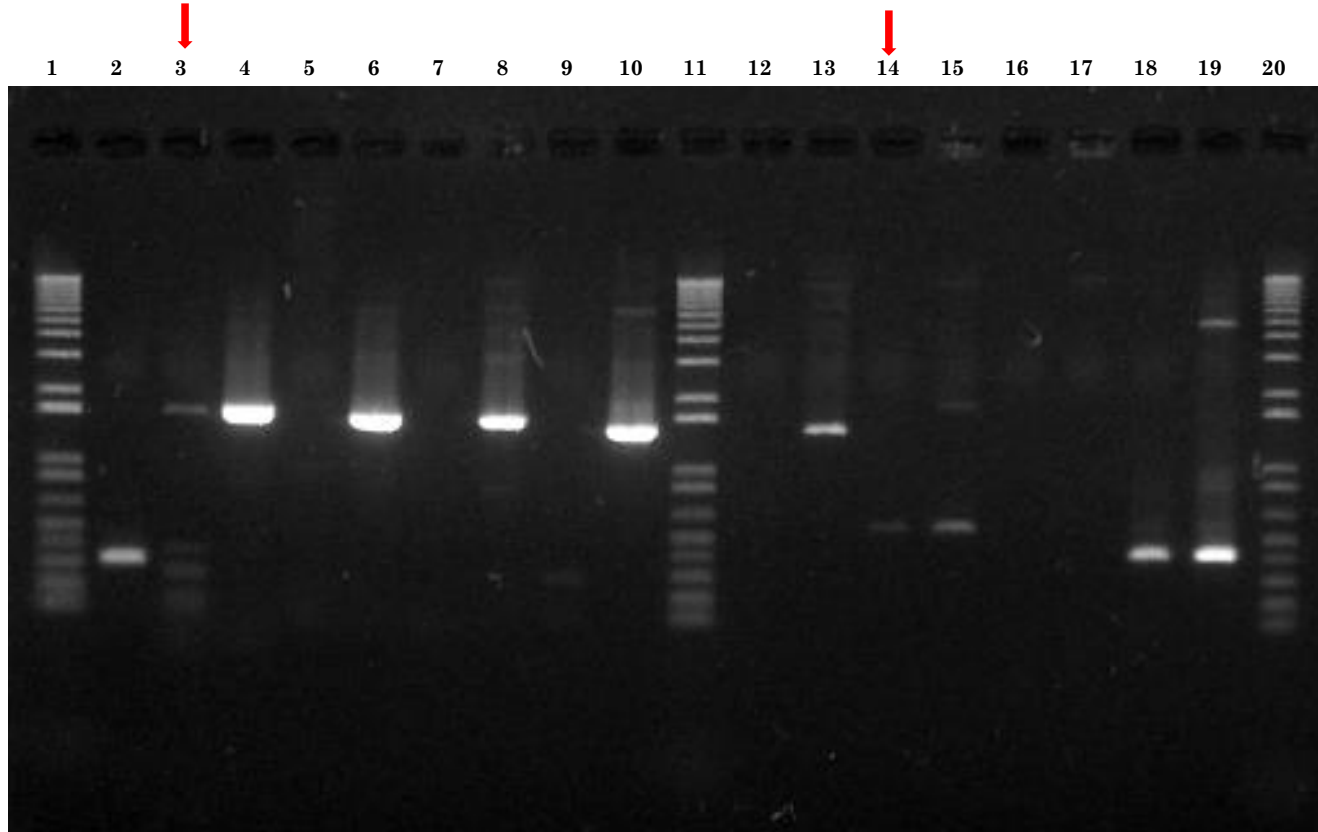
The Dilution Buffer is sufficient for 250 dilution reactions 20 µl each.

Stable for one year from the packaging date. Store the kit at -20°C. The Dilution Buffer can also be stored at +4°C once it is thawed.

Components	20 µl reaction	50 µl reaction	Final conc.
H <sub>2</sub> O	add to 20 µl	add to 50 µl	
2x Phire <sup>®</sup> Plant PCR Buffer	10 µl	25 µl	1x
primer A	x µl	x µl	0.5 µM
primer B	x µl	x µl	0.5 µM
Phire <sup>®</sup> Hot Start II DNA Polymerase	0.4 µl	1 µl	
Plant tissue (see Section 4)			
Direct protocol	0.5 mm punch/ small sample of seed	0.5 mm punch/ small sample of seed	
Dilution protocol	0.5 µl	1.25 µl	

Cycle step	2-step protocol		3-step protocol		Cycles
	Temp.	Time	Temp.	Time	
Initial denaturation	98°C	5 min	98°C	5 min	1
Denaturation	98°C	5 s	98°C	5 s	40
Annealing (see 6.2)	-	-	X°C	5 s	
Extension (see 6.3)	72°C	20 s ≤ 1 kb 20 s/kb >1 kb	72°C	20 s ≤ 1 kb 20 s/kb >1 kb	
Final extension	72°C 4°C	1 min hold	72°C 4°C	1 min hold	1

# Productos de PCR de dcADNc-SMART de raíz con cebadores degenerados y específicos de Serk1



1: 1kB

2: Stevia (ceb 18S)

3: Stevia (Comb cebadores serk1 D1 y R2)

4: pBSAtSerk1 (Comb cebadores serk1 D1 y R2)

5: Stevia (Comb cebadores serk1 D2 y R2)

6: pBSAtSerk1 (Comb cebadores serk1 D2 y R2)

7: Stevia (Comb cebadores serk1 D2 y Seco R)

8: pBSAtSerk1 (Comb cebadores serk1 D2 y Seco R)

9: Stevia (Comb cebadores serk1 D3 y R2)

10: pBSAtSerk1 (Comb cebadores serk1 D3 y R2)

11: 1Kb

12: Stevia (Comb cebadores serk1 D3 y Sec R)

13: pBSAtSerk1 (Comb cebadores serk1 D3 y Sec R)

14: Stevia (cebadores Serk1 cafeto Dir 1 – Rev)

15: pBSAtSerk1 (cebadores Serk1 cafeto Dir 1 – Rev)

16: Stevia (cebadores Serk1 chile Dir 1 – Rev)

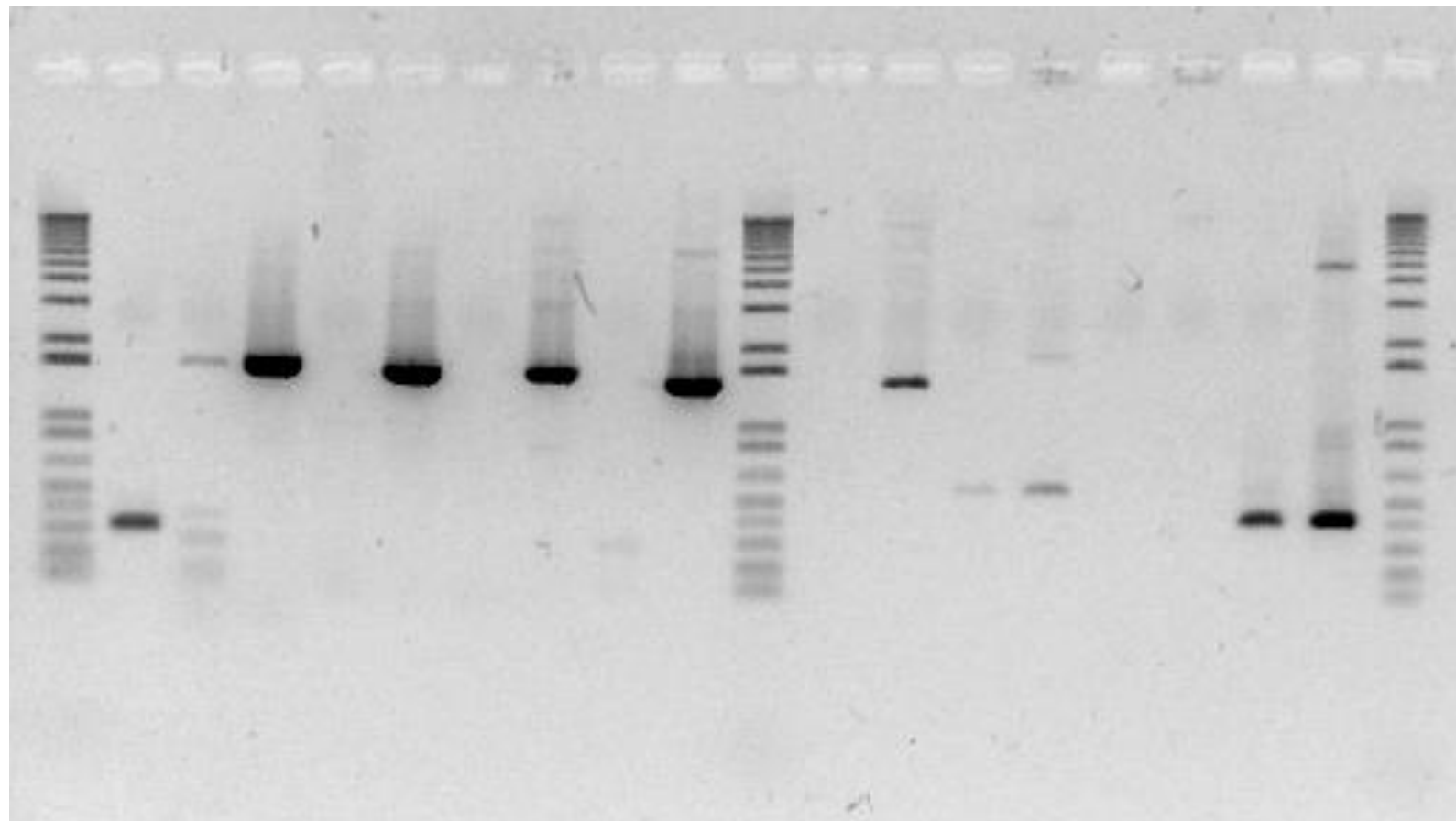
17: pBSAtSerk1 (cebadores Serk1 chile Dir 1 – Rev)

18: Stevia (cebadores MAPK PIG y Juglar)

19: pGEMMapk (cebadores MAPK PIG y Juglar)

20: 1 Kb

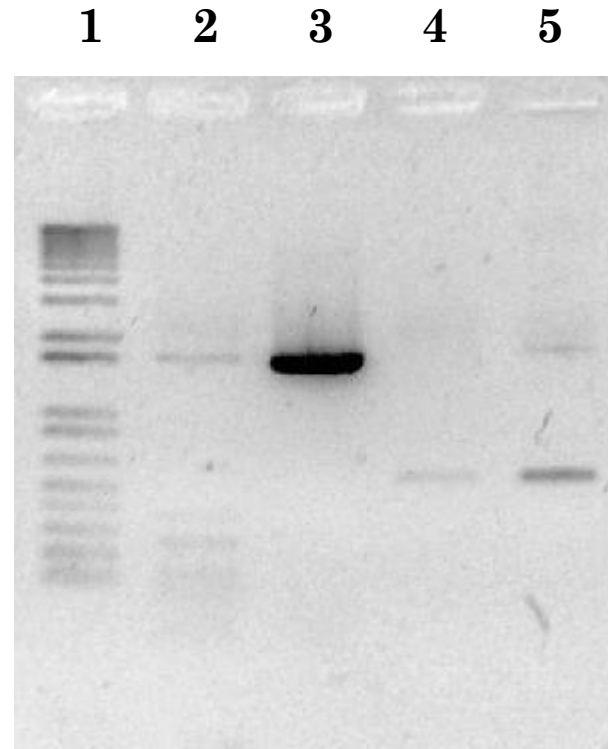
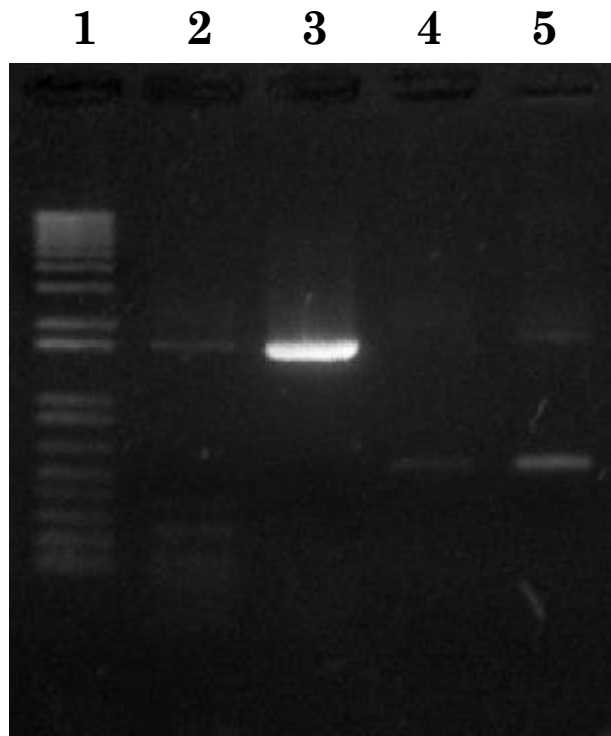
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20



- 1: 1kB
- 2: Stevia (ceb 18S)
- 3: Stevia (Comb cebadores serk1 D1 y R2)
- 4: pBSAtSerk1 (Comb cebadores serk1 D1 y R2)
- 5: Stevia (Comb cebadores serk1 D2 y R2)
- 6: pBSAtSerk1 (Comb cebadores serk1 D2 y R2)
- 7: Stevia (Comb cebadores serk1 D2 y Seco R)
- 8: pBSAtSerk1 (Comb cebadores serk1 D2 y Seco R)
- 9: Stevia (Comb cebadores serk1 D3 y R2)
- 10: pBSAtSerk1 (Comb cebadores serk1 D3 y R2)

- 11: 1Kb
- 12: Stevia (Comb cebadores serk1 D3 y Sec R)
- 13: pBSAtSerk1 (Comb cebadores serk1 D3 y Sec R)
- 14: Stevia (cebadores Serk1 cafeto Dir 1 – Rev)
- 15: pBSAtSerk1 (cebadores Serk1 cafeto Dir 1 – Rev)
- 16: Stevia (cebadores Serk1 chile Dir 1 – Rev)
- 17: pBSAtSerk1 (cebadores Serk1 chile Dir 1 – Rev)
- 18: Stevia (cebadores MAPK PIG y Juglar)
- 19: pGEMMapk (cebadores MAPK PIG y Juglar)
- 20: 1 Kb

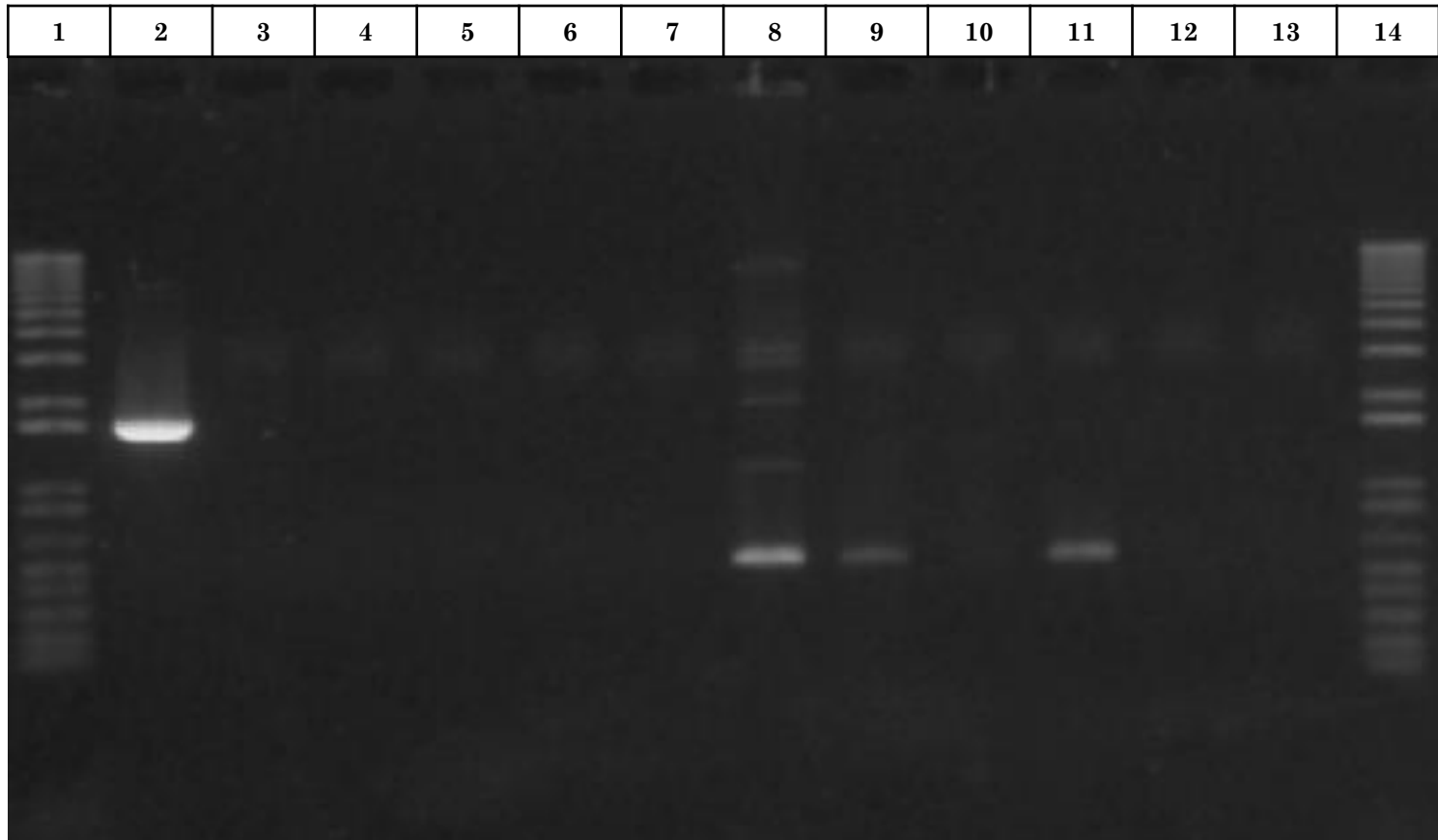
Segunda carga del gel para descartar posibles contaminaciones entre pozas.



- 1: 1Kb
- 2: Stevia (combinaciòn cebadores Serk1 Dir 1 – R2)
- 3: pBSAtSerk1 (combinaciòn cebadores Serk1 Dir 1 – R2)
- 4: Stevia (cebadores Serk1 cafeto Dir 1 – Rev)
- 5: pBSAtSerk1 (cebadores Serk1 cafeto Dir 1 – Rev)



# Amplificación de dcADNc de raíz, cebadores degenerados de Serk1 D1 y Rev 2 y cebadores específicos de serk1 cafeto, a varias temperaturas



1: 1 Kb

2: pBSAtSerk1 (ceb deg. Dir1 y Rev 2) a 59.2 °C

3: dcADNc de raíz (ceb deg. Dir1 y Rev 2) a 54,8 °C

4: dcADNc de raíz (ceb deg. Dir1 y Rev 2) a 57.5 °C

5: dcADNc de raíz (ceb deg. Dir1 y Rev 2) a 59.2 °C

6: dcADNc de raíz (ceb deg. Dir1 y Rev 2) a 61.2 °C

7: dcADNc de raíz (ceb deg. Dir1 y Rev 2) a 63.2 °C

8: 1 Kb

9: pBSAtSerk1 (ceb esp de chile) a 62.5 °C

10: dcADNc de raíz (ceb esp de chile) a 67 °C

11: dcADNc de raíz (ceb esp de chile) a 68.5 °C

12: dcADNc de raíz (ceb esp de chile) a 70.1 °C

13: Control negativo

14: 1 Kb



# Clonación de productos de PCR de acuerdo al protocolo de pJET2.1 Blunt



PRODUCT INFORMATION  
Thermo Scientific  
pJET PCR Cloning

1231                      20 rxns  
t                              Expiry Date  
re at -20 °C

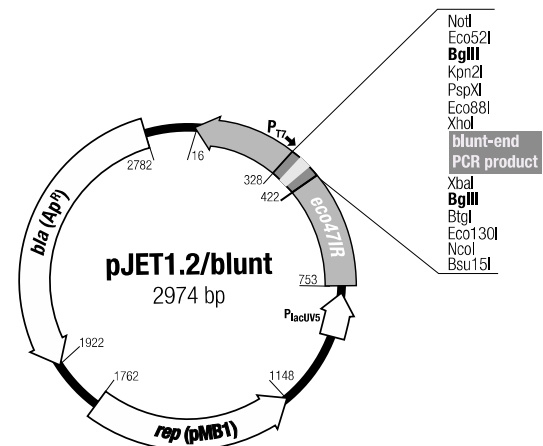
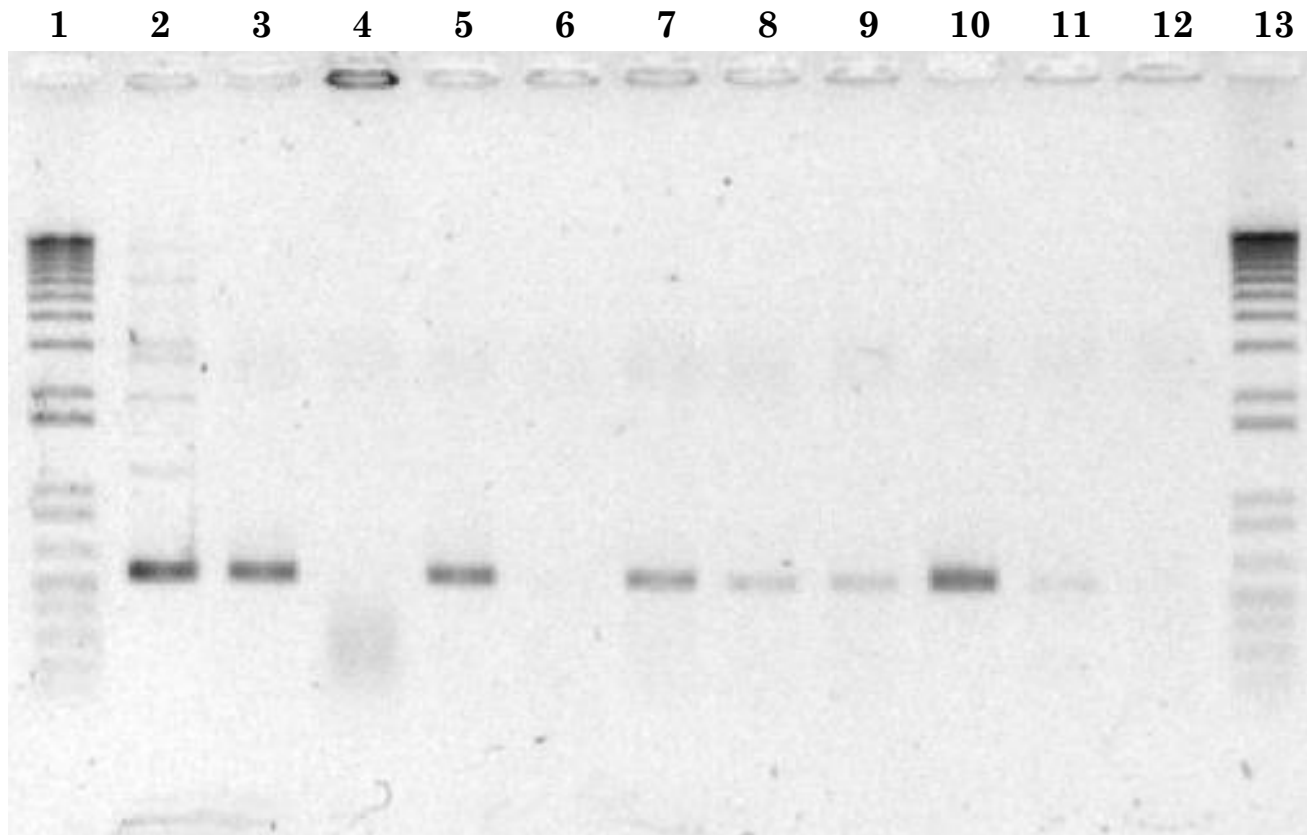


Fig. 1. pJET1.2/blunt Vector Map.  
Genetic elements of the pJET1.2/blunt cloning vector

# Evaluación de los insertos, por PCR a partir de colonias desarrolladas en el medio semisólido selectivo.



1: 1 Kb

2: Control positivo (pBSAtSerk1)

3: Ligación 1 (150 uL de inóculo) colonia 1

4: Ligación 1 (150 uL de inóculo) colonia 2

5: Ligación 1 (150 uL de inóculo) colonia 3

6: Ligación 1 (250 uL de inóculo) colonia 1

7: Ligación 1 (250 uL de inóculo) colonia 2

8: Ligación 1 (250 uL de inóculo) colonia 3

9: Ligación 2 (150 uL de inóculo) colonia 1

10: Ligación 2 (150 uL de inóculo) colonia 2

11: Ligación 2 (150 uL de inóculo) colonia 3

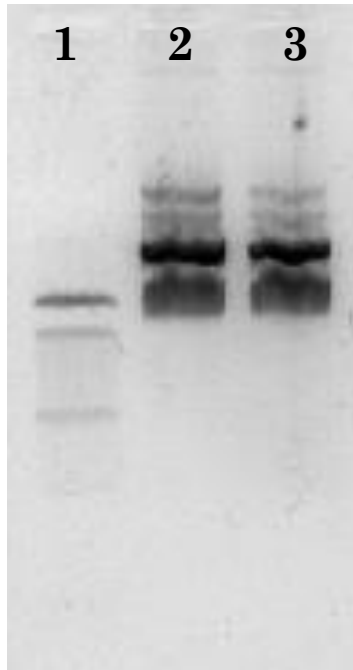
12: Ligación 2 (150 uL de inóculo) colonia 4

13: 1 Kb

Octubre 11,

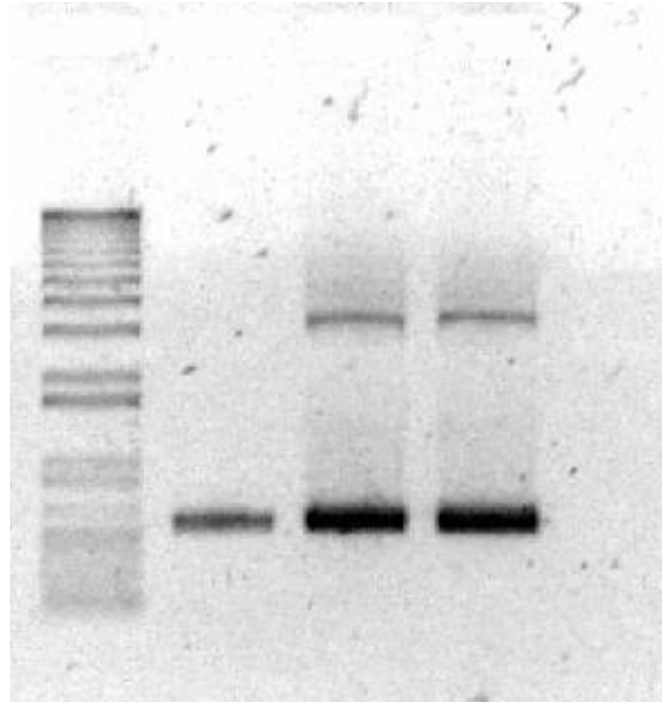
A.-Extracción de plásmidos por Kit QIAprep Spin Miniprep  
B.- Amplificación por PCR-Phire de un fragmento del gen SERK-1 /pJET1.2

A.



1: 100 pb  
2: Ligación 1  
3: ligación 2

B.

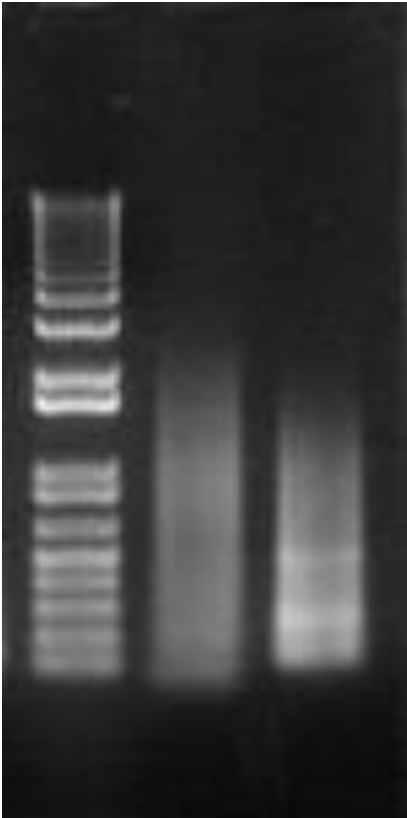


Fue confirmado la inserción de la secuencia de Serk1. Los plásmidos fueron enviados para su secuenciación.



## Síntesis de csADN c y dcADNc de ARN de ápice mediante SMART

1 2 3

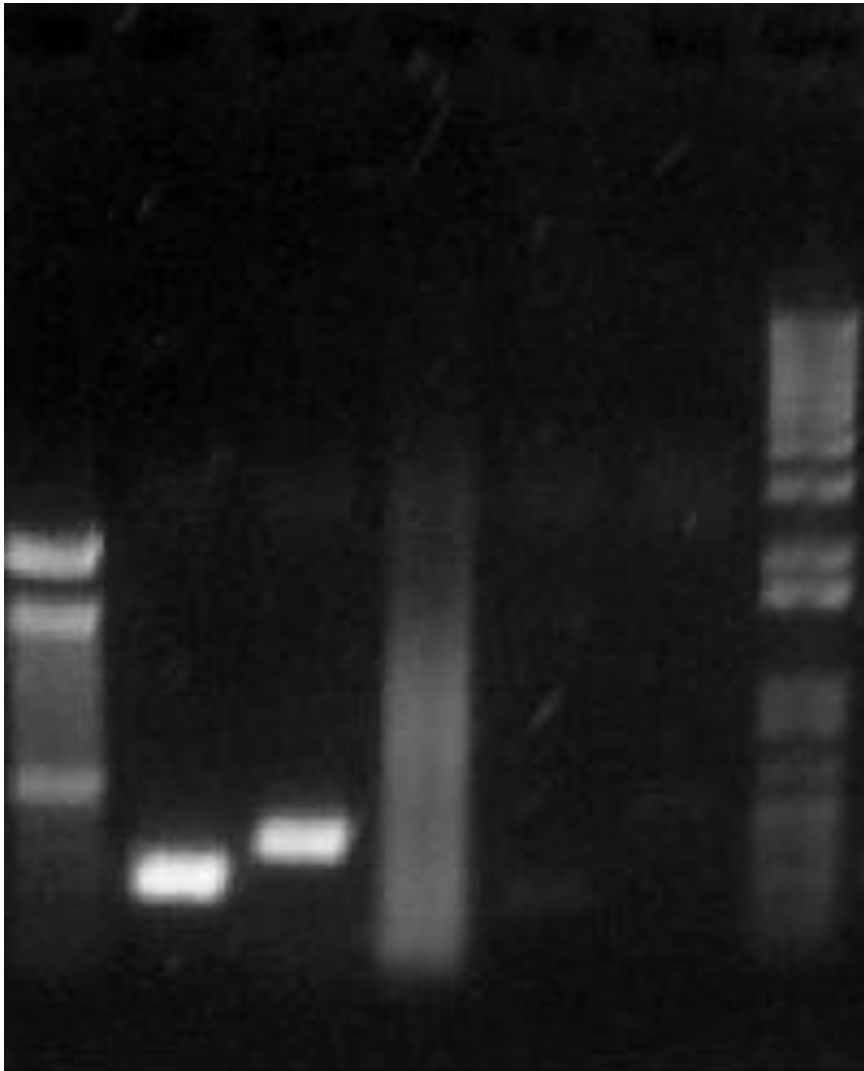


1: 1 Kb  
2: csADNc  
3: dsADNc

Cuantificación			
Muestra	Conc (ng/uL)	260/280	260/230
csADNc	1608.7	1.79	1.93
dsADNc	1980.9	1.81	1.40

# PCR – Phire de los genes LEC1, WUS y BBM usando dcADNc de apice

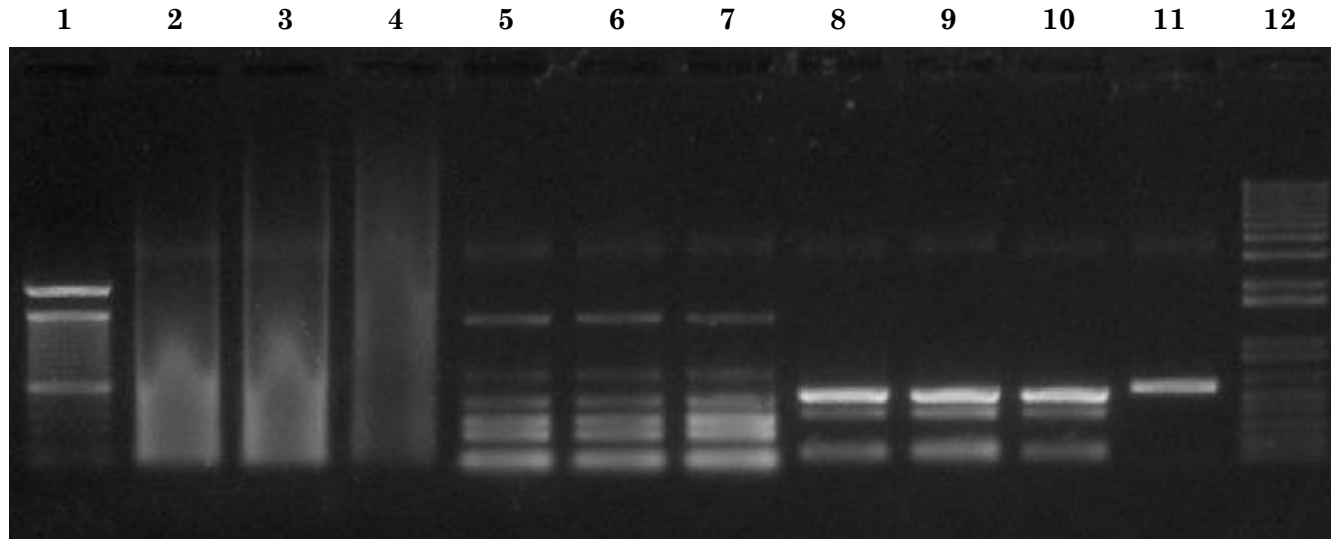
1      2      3      4      5      6      7



1: 100 pb  
2: 18 S  
3: MAPK  
4: LEC1  
5: WUS  
6: BBM  
7: 1 Kb



PCR – Phire de los genes Lec1, Wus, Bbm y Serk1 usando dcADNc de ápice  
(producto de PCR como templado)



1: 100 pb

2: Lec1 a 56 °C

3: Lec1 a 60 °C

4: Lec1 a 63 °C

5: Wus a 56 °C

6: Wus a 60 °C

7: Wus a 63 °C

8: Bbm 53 °C

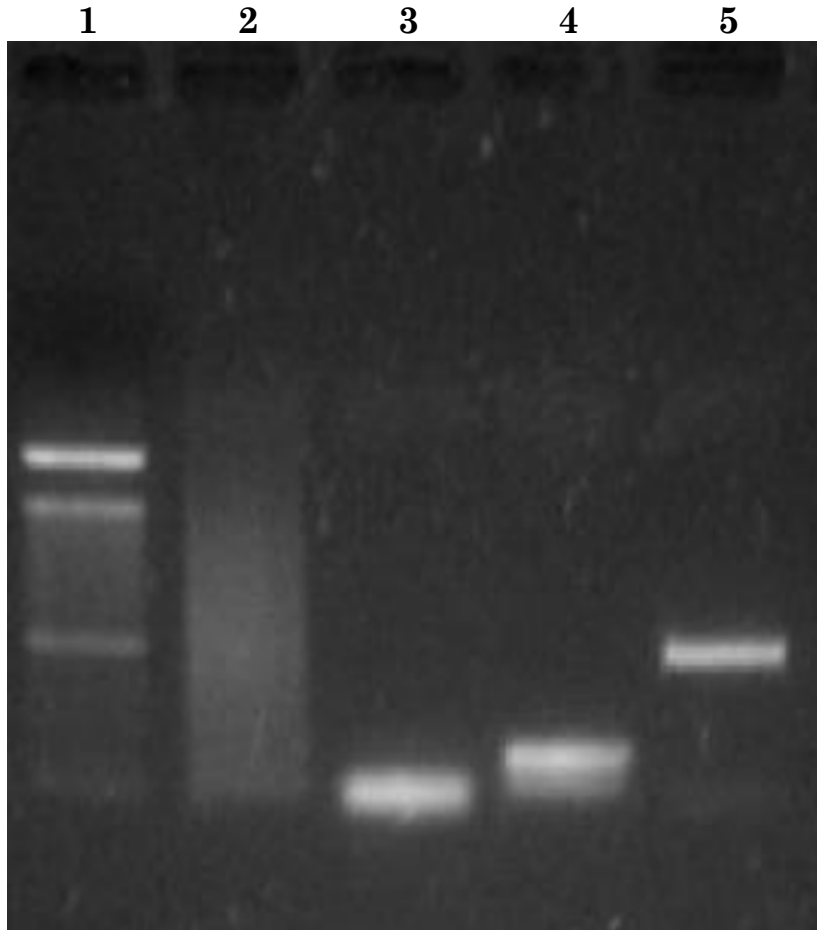
9: Bbm 55 °C

10: Bbm 58 °C

11: Serk1- específico de café 68 °C

12: 1Kb

# PCR-Phire (Touchdown) de Lec, Wus, Bbm y Serk1 a partir de dcADNc-SMART de ápice (1:100)



- 1: 100 pb
- 2: Lec: (60°C / 400pb)
- 3: Wus: (60°C / 270pb)
- 4: Bbm: (55°C / 320pb)
- 5: Serk-1: (68°C / 576pb)

98°C – 3 min

98°C – 5 seg  
75°C (-1°C / ciclo) – 5 seg } 25 ciclos  
72°C – 15 seg

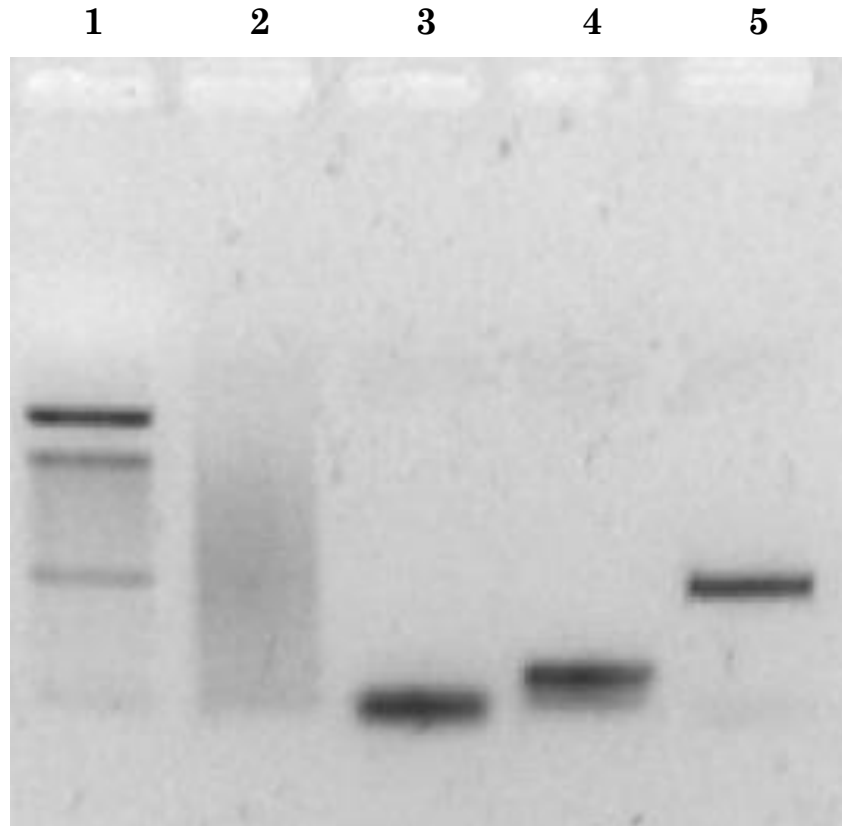
98°C – 5 seg  
55 - 68°C – 5 seg } 30 ciclos  
72°C – 15 seg

72°C – 5 min

4°C



PCR-Phire (Touchdown) de Lec, Wus, Bbm y Serk1 a partir de dcADNc de ápice (1:100)



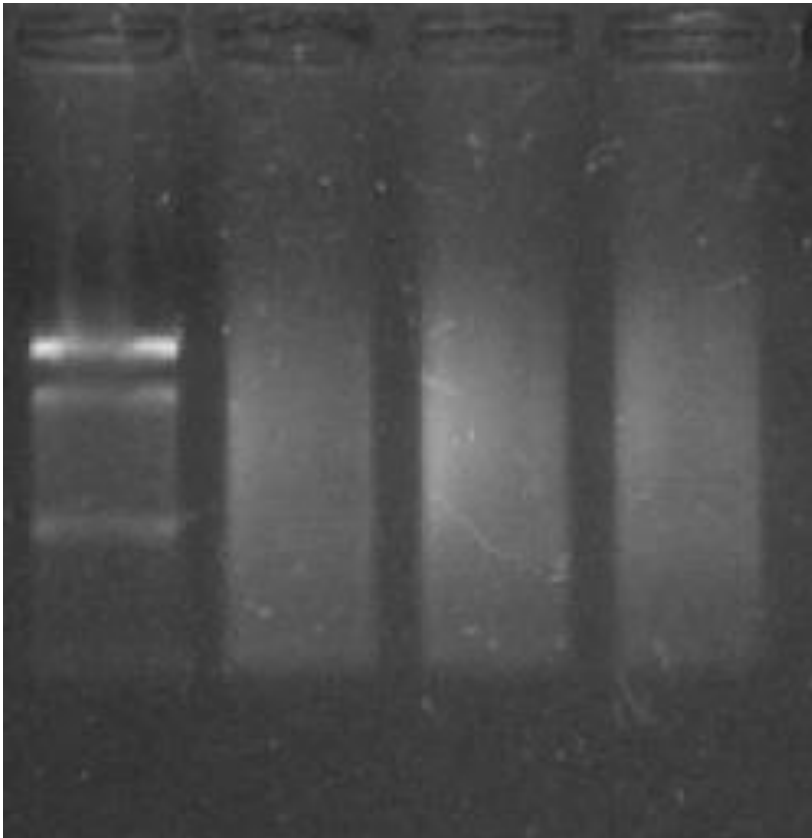
1: 100 pb  
2: Lec  
3: Wus  
4: Bbm  
5: Serk-1





# PCR-Phire (Touchdown) de Lec de diferentes cantidades de dcADNc ápice

1            2            3            4



- 1: 100 pb
- 2: Lec con 1.5 ng  
dcADNc
- 3: Lec con 3.5 ng  
dcADNc
- 4: Lec con 7 ng dcADNc

Obs: los volúmenes  
fueron tomados de una  
dilución 1:1000 de  
dcADNc



# CONCLUSIÓN

- Se logró la secuenciación de un segmento del gen *serk1*, con los que se diseñaron primers específicos de manera a lograr el aislamiento del gen completo mediante la tecnología “RACE” (Rapid Amplification of cDNA Ends)
- Los ensayos posteriores fueron realizados por otra persona becaria del programa de vinculación del Conacyt.

